



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSTGRADO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LA ALGARROBINA DE
PROSOPIS PALLIDA SOBRE ESCHERICHIA COLI Y
STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN

PRESENTADO POR

CÉSAR ENRIQUE CORREA ARELLANO

ASESOR

DRA. ROSA GUTARRA VILCHEZ

LIMA, PERÚ

2021



**Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA**

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNIDAD DE POSGRADO**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LA ALGARROBINA DE
PROSOPIS PALLIDA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* Y
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

TESIS

PARA OPTAR

**EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN**

**PRESENTADA POR
CÉSAR ENRIQUE CORREA ARELLANO**

**ASESOR
DRA. ROSA GUTARRA VILCHEZ**

**LIMA, PERÚ
2021**

JURADO

Presidente: Dr. José Luis Pacheco de la Cruz

Miembro: Dr. Emilio Teodoro Guija Poma

Miembro: Dr. Joel De León Delgado

A mi familia, por su apoyo y comprensión
que me permitió disponer de tiempo
apropiado para desarrollar esta
investigación

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Bertha Gutarra Vílchez, PhD, doctora en Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Medicina Preventiva y Salud Pública, una profesional de primer nivel, por su asesoría desde el inicio de esta investigación.

Al Dr. Ricardo Aurelio Carreño Escobedo, médico epidemiólogo, profesional de primer nivel, por su paciencia y valiosa asesoría en el planteamiento de esta investigación.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Resumen	vi
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. METODOLOGÍA	12
III. RESULTADOS	24
IV. DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36
FUENTES DE INFORMACIÓN	37
ANEXOS	47

RESUMEN

Objetivos: Determinar el efecto antibacteriano de una muestra comercial de algarrobina sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También, comparar la concentración mínima inhibitoria de la muestra comercial de algarrobina para ambas bacterias.

Metodología: Se realizó una investigación de tipo analítico, prospectivo, longitudinal que respondió a un diseño experimental. La muestra estuvo conformada por *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ a las que se le sometió a la acción de algarrobina de *Prosopis pallida*. El análisis se aplicó las pruebas ANOVA y HSD Tukey usando el software SPSS v. 26.

Resultados: *Escherichia coli* si es inhibida por la algarrobina, formando un halo de inhibición con 12.48 ± 0.71 mm en promedio. *Staphylococcus aureus* también es inhibida por la algarrobina, formando un halo de inhibición con 18.64 ± 0.49 mm en promedio. La tabla de análisis de varianza (ANOVA) mostró que *Escherichia coli* es menos inhibida que *Staphylococcus aureus* por efecto de la algarrobina, con un margen de error del 5%. La CMI de algarrobina frente a *Escherichia coli* es de 50% de concentración; y frente a *Staphylococcus aureus* es 25%. En ambas bacterias se confirmó que existen diferencias significativas en el grado de inhibición, acorde a la concentración de algarrobina que se esté utilizando, con un margen de error del 5%.

Conclusiones: La algarrobina presenta efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Existe diferencia significativa entre la CMI de la algarrobina para *Escherichia coli* y para *Staphylococcus aureus*, siendo mayor para la primera bacteria.

Palabras clave: algarrobina, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, CMI

ABSTRACT

Objectives: Determine if commercial carob syrup has an antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Likewise, compare the minimum inhibitory concentration of commercial carob syrup against both bacteria.

Methodology: An analytical, prospective, longitudinal investigation was carried out that responded to an experimental design. The sample consisted of *Escherichia coli* ATCC® 25922™ and *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, which were subjected to the action of carob syrup from *Prosopis pallida*. The analysis was performed with the ANOVA and HSD Tukey tests using the SPSS v. 26

Results: *Escherichia coli* is inhibited by carob syrup, forming an inhibition halo with 12.48 ± 0.71 mm on average. *Staphylococcus aureus* is also inhibited by carob syrup, forming an inhibition halo with 18.64 ± 0.49 mm on average. The analysis of variance table (ANOVA) showed that *Escherichia coli* is less inhibited than *Staphylococcus aureus* by the effect of carob syrup, with a margin of error of 5%. The minimum inhibitory concentration of carob syrup against *Escherichia coli* is 50% V / V concentration; and against *Staphylococcus aureus* it is at a concentration of 25% V / V. In both bacteria, it was confirmed that there are significant differences in the degree of inhibition, according to the concentration of carob syrup that is being used, with a 5% margin of error.

Conclusions: The carob syrup of *Prosopis pallida* has an antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. There is a significant difference between the MIC of carob syrup for *Escherichia coli* and for *Staphylococcus aureus*, being higher for the first bacterium.

Key words: carob syrup, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, MIC

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son un problema de salud a nivel mundial, y son amplios los esfuerzos que se hacen para controlar este mortal problema. Una de las áreas de investigación es la búsqueda de alimentos funcionales, es decir, aquellos que tienen un efecto potencialmente positivo en la salud más allá de la nutrición básica porque promueven una salud óptima y ayudan a reducir el riesgo de padecer enfermedades. Uno de ellos es la algarrobina que es un complemento nutricional obtenido a partir de la algarroba, que es la manera como se denomina al fruto maduro de *Prosopis pallida*, a la cual se le atribuyen varios beneficios y que en su composición podemos encontrar más minerales que los reportados en la miel de abejas y ofrece un valor nutricional mayor que el reportado para las peras de marañón (1).

Los vegetales pertenecientes al género *Prosopis* se originaron en mayor parte en el continente americano y en menor proporción en el continente africano y la zona sudeste de Asia. En Perú, el algarrobo perteneciente a la especie *Prosopis pallida* es el que más abunda de la zona costera peruana y se ha reportado en trece (13) departamentos, desde Tumbes a Tacna (2).

Vásquez y Ecurra (1986), en el libro Curso de Botánica General, afirman que el nombre científico del algarrobo que se encuentra en el norte del Perú es *Prosopis pallida* forma armata (3).

En América del Sur, se considera que *Prosopis pallida* es oriunda de Perú, Colombia y Ecuador. El algarrobo es una planta longeva, que taxonómicamente se le ubica en la familia de las leguminosas y presenta una amplia capacidad de supervivencia en zonas desérticas, debido a su desarrollada capacidad para absorber nitrógeno (N) y agua (H₂O) a través de sus bien desarrolladas raíces. Es un árbol que puede llegar a medir entre 8 a 20 m de altura cuando se encuentra en lugares que presenten condiciones óptimas, pero se hace un arbusto cuando se desarrolla en terrenos infértiles y

con poca agua. Generalmente, su tronco se presenta de forma irregular, tortuosa y nudosa. Su corteza externa se observa de un color pardo-gris-negrusco; con fisuras y ritidoma leñoso. La corteza interior presenta sabor amargo, con un olor parecido al barniz (4).

Las investigaciones confirman en forma reiterativa que los vegetales son grandes y sofisticados laboratorios naturales, considerándose como el recurso de compuestos químicos más importante que existe. La utilización de las plantas para fines medicinales se ha dado desde el principio de la humanidad hasta nuestros tiempos (5). Cada día aumenta el número de personas que ven en la medicina alternativa una buena opción para mejorar su salud. Esto ha motivado a que se incremente el número de investigaciones orientadas a la búsqueda de alternativas terapéuticas (6, 7). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el consumo de plantas medicinales o medicina alternativa (8).

Del algarrobo se pueden obtener una gran variedad de productos. Uno de ellos es la harina de algarrobo la cual se utiliza para aliviar problemas del aparato digestivo. Del tronco se extrae copal, que es una resina de uso medicinal. También se ha reportado que la corteza y las hojas de *Prosopis pallida* presentan propiedades medicinales (9).

Otro de los productos que se obtiene del algarrobo es la algarrobina, que se define como el extracto acuoso de la algarroba (10). La pulpa del fruto del algarrobo, conocido popularmente como “algarroba”, abarca el 56% del fruto y contiene un 60% de azúcares, entre los cuales predomina la sacarosa (11). La “algarrobina” contiene una gran concentración de azúcares reductores, saponina, hemaglutinina, polifenoles, nitrato, oxalato, fitato, entre otros (12).

Las hojas del algarrobo presentan el alcaloide vialina, que se considera que es el responsable del efecto antimicrobiano que presentan estas hojas. La algarroba se puede secar y moler para obtener la harina de algarroba, la cual presenta propiedades antidiarreicas. Las cataplasmas preparadas a partir del

jugo de la algarroba se utilizan en el tratamiento del dolor de la dentadura (13,14).

Variadas investigaciones desarrolladas en varias partes del mundo han demostrado que *Prosopis pallida* presenta variados compuestos con actividad biológica, entre los que destacan los taninos, los flavonoides, los fenoles y los terpenos (15).

Los polifenoles son compuestos químicos que se caracterizan por presentar anillos fenólicos como parte de su composición química. Los polifenoles se sintetizan en grandes cantidades (16). La clasificación de los polifenoles es compleja y en general, se puede afirmar que los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (17).

Los flavonoides son compuestos naturales sintetizados por las plantas y que presentan actividad antioxidante por lo cual, protegen al organismo del daño producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) (16). La estructura de los “principales flavonoides se diferencia entre ellos principalmente en el grupo –OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C (fig. 1).

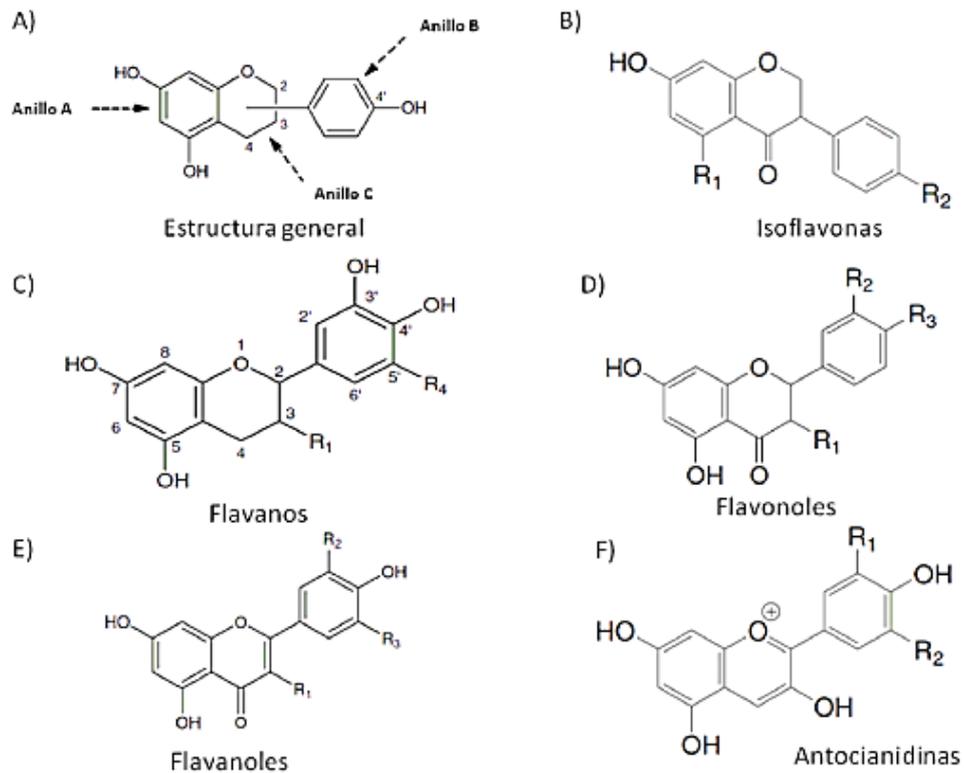


Figura 1. Estructura de los flavonoides. A) La estructura general de flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavanoles y F) Antocianidinas. Adaptado de Limón S, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J (18).

Los taninos son el segundo grupo de fenoles más abundante en la naturaleza y cumplen diversas e importantes actividades biológicas en la planta que los produce: actúan como defensa contra enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus además de proteger los tejidos contra el ataque de insectos y herbívoros (19). Actualmente existen varias clasificaciones para los taninos, sin embargo, la clasificación más aceptada es la que los organiza cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos (20), tal como se observa en la Figura 2.

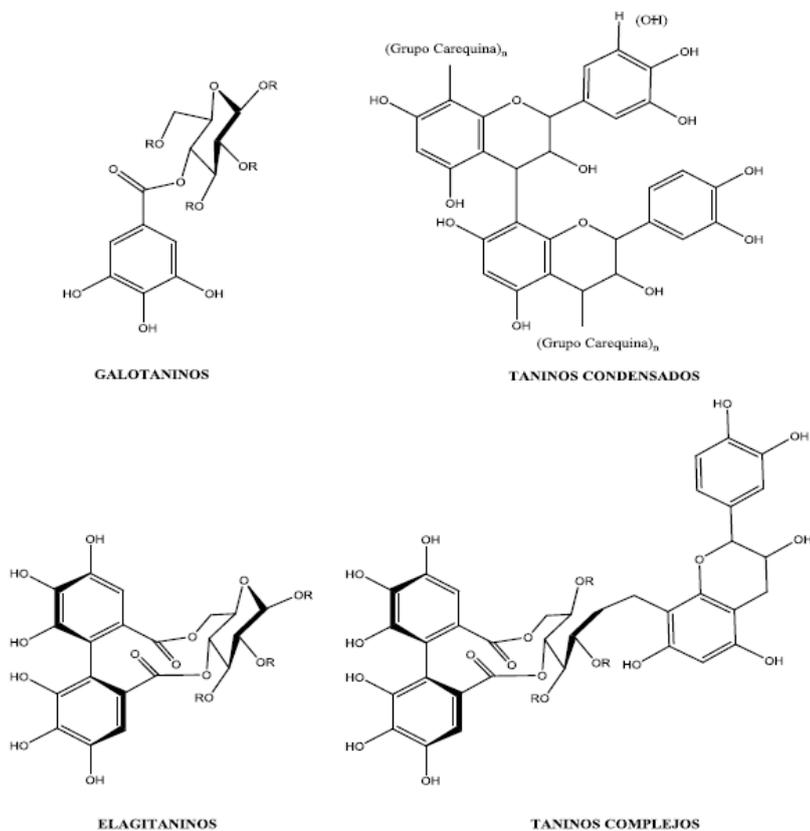


Figura 2. Clasificación de los taninos. Adaptado de Khanbabaee y Van Ree (21).

Otras investigaciones encontraron que *Prosopis pallida*, también conocida como algarrobo, presenta actividad antimicrobiana frente a algunos microorganismos (5,22,23), en especial las hojas, semillas secas y resinas frescas, las cuales son empleadas por la población como antitusivas, para aliviar el dolor de estómago, controlar la bronquitis, los resfríos y sanación de heridas. Los investigadores afirman que estos efectos podrían atribuirse al contenido de compuestos fenólicos, teniendo en consideración que estudios a dicha planta demuestran presencia de taninos, flavonoides y polifenoles, así mismo de tener una alta concentración de taninos (16, 24).

En nuestro país, Perú, se ha reportado tres (03) especies de *Prosopis*: *Prosopis chilensis*, *Prosopis limensis* y *Prosopis pallida*. Siendo la última especie la más abundante y la más utilizada. Es llamada “algarrobo” o “huarango”; y se utiliza principalmente en la parte norte del Perú, como parte

de la alimentación de los animales; así como para la preparación de la “algarrobina”. En algunos departamentos del sur peruano, como Ica y Arequipa, generalmente no se le da uso como alimento, más bien lo usan como combustible y algunas veces utilizan sus frutos como forraje (4). Presenta hojas que generalmente son bipinnadas; sus flores son pequeñas, con cinco (05) pétalos, actinomorfas y hermafroditas. El fruto del *Prosopis* se define como una legumbre carnosa e indehiscente (25).

Prosopis pallida presenta una gran capacidad de adaptación a las variadas clases de suelos que existen en nuestro planeta, logrando crecer muy bien y producir frutos en abundancia. Se considera que la causa de esta elevada capacidad adaptativa a diversos suelos es su desarrollado sistema radicular que le da la capacidad de llegar hasta a 50 m de profundidad asegurando la absorción del agua. El algarrobo ha desarrollado una amplia tolerancia a las sequías y a la alta concentración de sal en el suelo o en el agua utilizada para regarlo (4).

En Arequipa, se han desarrollado varias investigaciones orientadas a determinar la distribución de *Prosopis pallida* en esa región. Valdivia (2018) reportó que en algunos “distritos del sureste de la Provincia de Arequipa, se distribuyen poblaciones dispersas de algarrobos en biotopos distintos, localizados en Quequeña, Mollebaya y Yarabamba” (4). También se ha investigado la relación entre los “huarangos” y el tipo de suelo en el que crecen (26). Así mismo se publicó una interesante investigación orientada a establecer las condiciones ecológicas y biológicas de los “huarangos” que crecen en cinco (05) quebradas ubicadas en Yarabamba (27).

Algunos estudios reportan actividad antifúngica de *Prosopis pallida* frente a *Penicillium ochrocloron*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Aspergillus ochraceus* (28), *Candida albicans* (22,29). Otros estudios reportan actividad antibacteriana de *Prosopis pallida* frente a *Listeria monocytogenes* (28), *Staphylococcus aureus* (5, 16, 28, 30-32), *Escherichia coli* (5, 28, 30), *Salmonella typhimurium* (28), *Enterobacter cloacae* (28),

Porphyromonas gingivalis (33), *Streptococcus mutans* (34), *Enterococcus faecalis* (35).

En Perú se ha hecho variada investigación sobre las propiedades antimicrobianas de las distintas partes de *Prosopis pallida*, pero muy poca investigación sobre las propiedades funcionales de la algarrobina a pesar de ser un alimento bastante apreciado, barato y de fácil acceso, en especial en el norte de nuestro país.

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) han sido reconocidas como un problema de salud pública. Según la distribución de las IAAS, las infecciones del tracto urinario asociado a catéter urinario permanente (CUP) ocupan el tercer lugar de frecuencia con un 19% (36). Entre los adultos de 20 a 50 años, las infecciones urinarias son unas 50 veces más frecuentes en las mujeres. En tractos urinarios normales, las cepas de *Escherichia coli* con factores de adhesión específicos para el epitelio de transición de la vejiga y los uréteres son responsables del 75 a 95% de los casos y en pacientes internados, *E. coli* causa un 50% de los casos (37)

En Perú, la diarrea continúa siendo la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años, pese a los avances recientes en el manejo y prevención de esta enfermedad, siendo *Campylobacter* y *Escherichia coli* los patógenos más prevalentes a nivel comunitario en niños (38). Esta última se descubrió en 1885. Al principio se le asignó el nombre de "*Bacterium coli commune*". En 1919 fue nombrada como *Escherichia coli* en honor a su descubridor (39).

Esta especie bacteriana se caracteriza por presentar forma bacilar, gramnegativa, oxidasa negativa, sus dimensiones en promedio son de 1.1-1.5 μm de ancho y 2.0-6.0 μm de largo. Anaerobios facultativos, es decir necesitan oxígeno para poder multiplicarse, pero pueden sobrevivir en

ausencia de este elemento químico. Por su capacidad de desplazamiento, podemos encontrar dos grupos: móviles (peritricas) y no móviles (40).

Escherichia coli se encuentra conformando la mayor parte de la flora normal del tubo gastrointestinal (TGI) de los seres humanos, de la mayoría de los mamíferos y de muchas aves (39,41). Cuando se cultivan en agar Mac Conkey, después de incubarse a 37°C durante 24 horas, se puede apreciar a simple vista gran cantidad de colonias rosadas (40,41). *Escherichia coli* es el miembro predominante del género *Escherichia*. Cada gramo de los restos fecales humanos contiene hasta 10^8 células bacterianas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*. Algunas cepas de esta bacteria se asocian a múltiples enfermedades: infecciones del tracto urinario (ITU), inflamación de las meninges, sepsis, colitis hemorrágica, entre otras (41).

Staphylococcus aureus es también una importante bacteria patógena involucrada en una serie de infecciones e intoxicaciones, presenta múltiples factores de virulencia y su impacto se incrementa por su notable resistencia a los antimicrobianos (42). Las infecciones causadas por esta bacteria son un problema de salud pública. Se producen en el hospital y la comunidad, provocando una elevada morbilidad y mortalidad (43) Es una bacteria grampositiva de forma esférica, de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diámetro. Conforme se va multiplicando, comienza a reunirse en forma de racimos. Arroja resultado positivo para la prueba de la catalasa. En agar manitol salado tienden a formar colonias de color amarillo dorado y pueden ser beta-hemolíticas cuando se les siembra en agar sangre. Tiene capacidad para fermentar el manitol, convirtiéndolo en ácido láctico. Su crecimiento no se ve inhibido por concentraciones altas de cloruro de sodio (41). *Staphylococcus aureus* está relacionado a la producción de una amplia variedad de enfermedades que pasan por intoxicaciones alimentarias, endocarditis, osteomielitis (44). La bacteriemia es un problema emergente de salud pública, siendo este estafilococo uno de los patógenos más aislados (45)

Actualmente ha aumentado el estudio de las plantas y sus productos con la finalidad de mejorar nuestro conocimiento sobre los metabolitos secundarios que se encuentran en los vegetales y que podrían presentar una posible actividad medicinal, en especial actividad antimicrobiana, teniendo en cuenta que a nivel mundial se dan infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias, producidas en general por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (46).

Úrsula Gonzales Barrón y col. publicaron que los extractos de *Prosopis pallida* poseían efecto antifúngico contra *Penicillium ochrochloron* ATCC 9112, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (aislado de alimento), y *Aspergillus ochraceus* ATCC 12066. Así mismo concluyeron que los extractos de *Prosopis pallida* poseían efecto antibacteriano contra *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 y *Enterobacter cloacae* (aislado de muestra de paciente) (28).

Javad Sharifi-Rad y col. desarrollaron una amplia revisión bibliográfica sobre estudios que abordan la composición química y las propiedades farmacológicas de las plantas del género *Prosopis* y concluyeron que estas plantas tienen efectos benéficos para la salud muy prometedores y que hay muy pocos estudios desarrollados para apoyar efectivamente sus efectos farmacológicos y que se necesitan más estudios preclínicos para dar soporte adicional y confirmar los efectos biológicos de las plantas del género *Prosopis* (47).

Grillo y Livia encontraron que los extractos de *Prosopis pallida* poseen efecto antibacteriano contra *Porphyromonas gingivalis* (33).

Eduardo y col. encontraron que los extractos de *Prosopis pallida* (algarrobo) poseen efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* (34).

Vásquez, empleando el método de difusión en disco, concluyó que los extractos de *Prosopis pallida* poseen efecto antifúngico contra *Candida albicans* (22). Al siguiente año, Enríquez y col. encontraron el mismo resultado (29).

Alvarado Saavedra y col., empleando el método de difusión en disco, concluyeron que el extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* presenta actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (35), en tanto que Cárdenas publicó que el extracto etanólico de *Prosopis pallida* presenta actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, pero no contra *Escherichia coli* (16).

Castro desarrolló una investigación en la que encontró que la algarrobina tiene efecto antibacteriano frente a los coliformes (30).

Sandoval y Zúñiga publicaron una investigación en la que demostraron que los alcaloides totales obtenidos a partir de las hojas secas de *Prosopis pallida* fueron capaces de inhibir la multiplicación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (5).

Bussmann y col. publicaron en el 2009 que *Prosopis pallida* presenta actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* aislado de paciente con laringitis y no contra *Escherichia coli* aislado de orina de paciente con infección urinaria (31). Dos años después publicaron que la algarrobina tiene actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, pero no presenta esta actividad frente a *Escherichia coli* (32).

En este trabajo de investigación se pretende responder a la pregunta ¿la algarrobina de *Prosopis pallida* posee efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*? para ello se planteó la siguiente

hipótesis: la algarrobina comercial de *Prosopis pallida* posee efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, a partir de la cual se plantearon las siguientes hipótesis derivadas:

- La algarrobina comercial de *Prosopis pallida* tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*
- La algarrobina comercial de *Prosopis pallida* tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*
- Existe diferencia significativa entre la CMI de la algarrobina comercial para *Escherichia coli* y para *Staphylococcus aureus*, siendo mayor para la primera bacteria

Objetivo general.-

Determinar el efecto antibacteriano de una muestra comercial de algarrobina sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos. -

- Determinar el efecto antibacteriano de una muestra comercial de algarrobina sobre *Escherichia coli*
- Determinar el efecto antibacteriano de una muestra comercial de algarrobina sobre *Staphylococcus aureus*
- Comparar la concentración mínima inhibitoria de una muestra comercial de algarrobina sobre ambas bacterias.

II. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación de tipo analítico, prospectivo, longitudinal que respondió a un diseño experimental.

La población de estudio fueron bacterias de las especies *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, seleccionando como muestra cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ provenientes de viales con cultivo puro proporcionados por la empresa ATCC (www.atcc.org)

Se usó como criterios de inclusión que el material biológico debía provenir de cultivo puro y que debía tener certificación ATCC, además la algarrobina debía estar certificada con registro sanitario y haberse producido a partir de los frutos de *Prosopis pallida* “algarrobo”. Así mismo, se excluyó del estudio el material biológico contaminado, algarrobina que no contara con registro sanitario, que haya alcanzado fecha de vencimiento o que el recipiente que la contenía presentara abolladuras.

La técnica aplicada fue la observación directa de los procedimientos ejecutados. El desarrollo de las técnicas se aplicó considerando las pruebas convencionales de laboratorio usadas en microbiología.

La preparación de los medios de cultivo y el desarrollo de las técnicas descritas a continuación se hicieron en cabina de flujo laminar.

Los instrumentos utilizados fueron la Ficha de recolección de datos para demostración de la actividad antibacteriana (anexo 1), Ficha de recolección de datos para determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (anexo 2) y la norma técnica NTS N°071-MINSA/DIGESA-V-01 para las enterobacteriáceas en el grupo de alimentos VI.3 en el cual se encuentra la algarrobina (anexo 3)

Procedimiento

1. Preparación de medios de cultivo

Preparación del agar Mueller Hinton

El agar Mueller Hinton utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado, por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se disolvió 37 g del medio de cultivo deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se dejó en reposo de 15 minutos. Luego se llevó a ebullición durante 1 minuto agitando constantemente para lograr disolución total. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después se esperó a que la temperatura baje a 45°-50°C. Finalmente se dispensó en placas de Petri, previamente esterilizadas en horno, en cantidad suficiente hasta lograr que el espesor del medio de cultivo sea de 4 mm (48).

Las placas con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración las que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del agar Manitol Salado

El agar manitol salado utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 111 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se dejó reposar por 5 minutos y se calentó hasta ebullición por 2 minutos con agitación constante. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 45°-50°C. Finalmente se dispensó en placas de Petri, previamente esterilizadas en horno, en cantidad suficiente para que el espesor sea de 4 mm.

Las placas con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración las que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del agar eosina azul de metileno (EMB)

El agar eosina azul de metileno utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 36 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se dejó reposar por 5 minutos y se calentó hasta ebullición por 2 minutos con agitación constante. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 45°-50°C. Finalmente se dispensó en placas de Petri estériles, en cantidad suficiente para que el espesor sea de 4 mm.

Las placas con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración las que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del caldo Tripticasa Soya:

El caldo tripticasa soya utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino listo para utilizar.

Preparación del agar triple azúcar hierro (TSI)

El agar triple azúcar hierro utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 62,5 g del polvo en 1 litro de agua destilada y se dejó reposar 5 minutos. Se mezcló bien y luego se calentó con agitación frecuente y se hirvió 2 minutos hasta disolución total. Se distribuyó en tubos de ensayo 13x100, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos. Posteriormente se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Finalmente se dejaron enfriar y solidificar en posición inclinada con el fin de que el medio de cultivo adopte la forma de pico de flauta.

Los tubos con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración los que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del agar lisina hierro (LIA)

El agar lisina hierro utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 35 g del polvo en 1 litro de agua destilada y se dejó reposar 5 minutos. Se mezcló bien y luego se calentó con agitación frecuente y se hirvió 1 minuto hasta disolución total. Se distribuyó en tubos de ensayo 13x100, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos. Posteriormente se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Finalmente se dejaron enfriar y solidificar en posición inclinada con el fin de que el medio de cultivo adopte la forma de pico de flauta.

Los tubos con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración los que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del agar citrato de Simmons

El agar citrato de Simmons utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 24,2 g del polvo en 1 litro de agua destilada y se dejó reposar 5 minutos. Se mezcló bien y luego se calentó con agitación frecuente y se hirvió 1 minuto hasta disolución total. Se distribuyó en tubos de ensayo 13x100, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos. Posteriormente se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Finalmente se dejaron enfriar y solidificar en posición inclinada con el fin de que el medio de cultivo adopte la forma de pico de flauta.

Los tubos con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración los que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del medio movilidad indol ornitina (MIO)

El medio movilidad indol ornitina utilizado fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), el cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 31 g del polvo en 1 litro de agua destilada, se calentó agitando frecuentemente y se llevó a ebullición hasta disolución total. Se distribuyó en tubos de ensayo 13x100, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la mitad de estos. Posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Finalmente se dejaron enfriar y solidificar en posición vertical.

Los tubos con medio de cultivo se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración los que superaban esta prueba de esterilidad.

Preparación del agua peptonada

El agua peptonada utilizada fue de la marca Britania (proveniente de Argentina), la cual vino deshidratado por lo que se reconstituyó siguiendo las indicaciones del fabricante: se suspendió 15 g del polvo en 1 litro de agua destilada, se calentó agitando frecuentemente y se llevó a ebullición durante 1 minuto. Se distribuyó matraces Erlenmeyer de 200 mL de capacidad. Posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Los matraces se dejaron 24 horas a temperatura ambiente para confirmar la esterilidad y luego se conservaron en refrigeración los que superaban esta prueba de esterilidad.

2. Activación de las cepas bacterianas

Se trabajó con 2 cepas bacterianas ATCC que vinieron deshidratadas en viales, de la marca ATCC: *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, las cuales se reactivaron de la siguiente manera:

Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ se reactivaron poniendo en contacto el hisopo que contenía la cepa con caldo tripticasa soya, luego se sembró por estría simple en agar Müeller Hinton, usando el hisopo. Finalmente se incubó la placa Petri sembrada por 24 horas a 37 °C.

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ se reactivaron poniendo en contacto el hisopo que contenía la cepa con caldo tripticasa soya, luego se sembró por estría simple en agar Müeller Hinton, usando el hisopo. Finalmente se incubó la placa sembrada por 24 horas a 37 °C.

3. Confirmación de la pureza de los cultivos

a. De *Staphylococcus aureus*:

Se seleccionó 1 colonia del *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ y se diluyó en 1 mL de solución salina fisiológica estéril.

Se sembró por estría simple 1 azada de esta suspensión en agar manitol salado. Se incubó a 37°C por 24 horas. El viraje a color amarillo del medio de cultivo no indicaría la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Así mismo se hizo la prueba de la catalasa para confirmar que se trataba de un cultivo de *Staphylococcus aureus*: en el centro de una lámina portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrogeno y una azada del cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™. La aparición de burbujas en la mezcla nos indicaba que el resultado de la prueba de la catalasa era positivo y por lo tanto confirmaba la presencia de esta bacteria.

Ambas pruebas se hicieron por triplicado.

b. De *Escherichia coli*:

Se seleccionó al azar 1 colonia de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y se diluyó en 1 mL de solución salina fisiológica estéril.

Se sembró por estría simple 1 azada de esta suspensión en agar Eosina Azul de metileno (EMB). Se incubó a 37°C por 24 horas. Así mismo, se sembró en tubos de ensayo conteniendo los medios diferenciales: TSI, LIA, Citrato de Simmons y MIO para confirmar que se trataba de un cultivo puro de *Escherichia coli*. Este paso se hizo por triplicado.

4. Escala de Mc Farland

La escala de Mc Farland se preparó mezclando exactamente BaCl₂ al 1.175% y H₂SO₄ al 1% basándose en el Manual del Instituto Nacional de Salud (INS) (53):

- a. Se adicionó medio mililitro de BaCl₂ 0,048 M a 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 M en constante movimiento para mantener la suspensión.
- b. Se confirmó que la absorbancia a 625 nm esté en el intervalo de 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland. Esta confirmación se hizo con la ayuda de un espectrofotómetro.
- c. Se dispensó de 4 ml a 6 ml en tubos de ensayo 13x100 con tapa, similares a los tubos que se emplearon para preparar el inóculo.
- d. Se verificó que los tubos estuvieran bien tapados, anotamos la fecha de preparación y los guardamos en un sitio oscuro a temperatura ambiental.
- e. Se agitó vigorosamente el estándar previo a su uso.

5. Algarrobina

Se compró algarrobina comercial preparada a partir de los frutos de *Prosopis pallida*, elaborada en Piura, con una concentración de 78° Brix. Registro sanitario F6700720N. El envase fue de plástico por lo que se verificó que la botella no presentara abolladuras u otro detalle que alterara su integridad.

Se prepararon soluciones de algarrobina a las concentraciones de 75%, 50%, 25% y 12.5% V/V con agua destilada estéril de la siguiente manera:

La solución de algarrobina al 75% se preparó mezclando en un matraz Erlenmeyer 75 mL de algarrobina con 25 mL de agua destilada estéril. Se removió hasta completa disolución. La solución se guardó en frasco estéril con tapa.

La solución de algarrobina al 50% se preparó mezclando en un matraz Erlenmeyer 50 mL de algarrobina con 50 mL de agua destilada estéril. Se removió hasta completa disolución. La solución se guardó en frasco estéril con tapa.

La solución de algarrobina al 25% se preparó mezclando en un matraz Erlenmeyer 25 mL de algarrobina con 75 mL de agua destilada estéril. Se removió hasta completa disolución. La solución se guardó en frasco estéril con tapa.

La solución de algarrobina al 12,5% se preparó mezclando en un matraz Erlenmeyer 12,5 mL de algarrobina con 87,5 mL de agua destilada estéril. Se removió hasta completa disolución. La solución se guardó en frasco estéril con tapa.

Todas las diluciones se prepararon en cabina de flujo laminar respetando los protocolos de bioseguridad (anexo 3)

6. Preparación de los discos con algarrobina para determinar el efecto antimicrobiano

Se elaboraron discos de papel filtro Whatman N°1 de 6 mm de diámetro con la ayuda de un perforador convencional, que luego se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121°C, posteriormente fueron guardados en un frasco con tapa previamente esterilizado.

Se colocó 10 mL aproximadamente de algarrobina en una placa Petri. Después se sumergieron los discos de papel filtro por grupos de 10-15 discos en esta placa. Se dejaron por 5 minutos y luego se pusieron a secar en estufa a 37°C por 24 horas. Finalmente se guardaron en frascos estériles con tapa.

7. Preparación de los inóculos para la demostración de la actividad antibacteriana

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos de 24 horas conteniendo *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ provenientes de placas Petri con agar Mueller Hinton y de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ provenientes de placas Petri con agar Mueller Hinton.

Se recolectó una azada por separado de ambas cepas y se prepararon sendas suspensiones en tubos de ensayo 13x100 conteniendo 5 mL de agua peptonada al 0,1%, las cuales se ajustaron al 0.5 de la escala de McFarland comparando el grado de turbidez en el agua peptonada con el estándar, visualizándose los dos contra un fondo blanco en el cual se han dibujado líneas negras. De esta manera se obtuvo una suspensión con 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)

8. Demostración de la actividad antibacteriana

El método utilizado fue el de difusión en agar siguiendo las pautas propuestas por Koneman (50):

En un lapso no mayor de 15 minutos de ajustado el inóculo, se introdujo en el tubo de ensayo un hisopo de algodón, se eliminó el exceso de suspensión y se sembró por distribución uniforme en la superficie de placas de Agar Müller Hinton de 4 mm de grosor, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (anexo 4).

Se colocaron 5 discos impregnados con algarrobina en cada placa Petri, con la ayuda de pinzas estériles y en condiciones de esterilidad. Se dejó una distancia mínima de 25 mm entre cada disco.

A una placa Petri sembrada con *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y a una sembrada con *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ no se les colocó discos impregnados con algarrobina para que sirvieran de control.

Se incubaron las placas Petri a 37°C durante 24 horas, tiempo después del cual se observaron las placas buscando la presencia de halos de inhibición. (50)

Cada experiencia se repitió 5 veces y los resultados se registraron en la ficha de recolección de datos para demostración de la actividad antibacteriana que se detalla en el anexo 1.

9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se prepararon soluciones de algarrobina en agua destilada estéril al 75%, 50%, 25% y 12.5%. Se elaboraron discos de papel filtro Whatman N°1 de 6 mm de diámetro, que luego se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121°C. Después se impregnaron sendos discos con 10 µL de cada una de las soluciones de algarrobina de *Prosopis pallida* (algarrobo), y luego se dejaron secar debidamente protegidos para evitar contaminaciones.

Se prepararon suspensiones de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ con una concentración de 10⁸ UFC/mL siguiendo las indicaciones expuestas en el punto 7 para la preparación del inóculo para la demostración de la actividad antibacteriana.

Se rotularon dos series de seis (06) placas Petri conteniendo agar Müller Hinton en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal. Una serie se rotuló EC y la otra se rotuló SA. En las seis (06) placas EC se sembró por distribución uniforme la suspensión de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ con turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala Mac Farland. En las seis (06) placas SA se sembró por distribución uniforme la suspensión de

Staphylococcus aureus ATCC® 25923™ con turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala Mac Farland.

Se separó una (01) placa Petri EC y una (01) placa Petri SA para que sirvan de control. En cada una de las 10 placas restantes se colocaron equidistantes cinco discos de papel filtro impregnados con algarrobina al 100%, 75%, 50%, 25% y 12.5% respectivamente. Se incubaron todas las placas Petri a 37°C durante 24 horas, tiempo después del cual se observaron las placas buscando la presencia de halos de inhibición.

Cada experiencia se repitió 5 veces y los resultados se registraron en las fichas de recolección de datos para determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) que se detallan en el anexo 2.

Se consideró que la aparición de un halo inhibitorio era un indicador de efecto antibacteriano.

10. Procesamiento y análisis de datos

Concluido el trabajo de campo, los datos se procesaron en el paquete de software denominado SPSS v.26, para realizar los siguientes análisis:

- a) Obtención de medidas descriptivas como la media aritmética, varianza, error y la desviación estándar para variables cuantitativas.
- b) Comparación de medias con análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.
- c) Prueba HSD de Tukey para evaluar si hay diferencia significativa entre los promedios de los diámetros de los halos de inhibición formados durante la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Se consideraron resultados significativos aquellos valores de $p < 0.05$

11. Aspectos éticos

Se tuvo presente en todo momento, los principios éticos para proteger el medio ambiente y la salud, procediendo responsablemente en la eliminación de los materiales conteniendo microbios patógenos, los cuales fueron previamente esterilizados en autoclave; siguiendo lo que ordena la Ley General del Ambiente N° 28611:

Artículo 66.- De la Salud ambiental: “La prevención de riesgos y daños a la salud de las personas es prioritaria en la gestión ambiental. Es responsabilidad del Estado, a través de la Autoridad de Salud y de las personas naturales y jurídicas dentro del territorio nacional, contribuir a una efectiva gestión del ambiente y de los factores que generan riesgos a la salud de las personas.”

Artículo 74.- De la responsabilidad general. “Todo titular de operaciones es responsable por las emisiones, efluentes, descargas y demás impactos negativos que se generen sobre el ambiente, la salud y los recursos naturales, como consecuencia de sus actividades. Esta responsabilidad incluye los riesgos y daños ambientales que se generen por acción u omisión.” (51)

III. RESULTADOS

III.1 Confirmación de la pureza de los cultivos

Todos los medios de cultivo se reconstituyeron sin inconvenientes y superaron la prueba de esterilidad.

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ llegaron liofilizadas y se reactivaron exitosamente según lo detallado en la metodología. En el agar Mueller Hinton en el que se sembraron las dos bacterias mencionadas en sendas placas, se observó el crecimiento de un solo tipo de colonia, interpretándose como un indicio de que se trataba de un cultivo puro.

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ desarrolló en el agar Manitol Salado formando colonias de color amarillo (figura 1). En la prueba de la catalasa se observó la aparición de burbujas en la suspensión bacteriana preparada en H₂O₂, indicando resultado positivo. Estos resultados confirman la presencia de *Staphylococcus aureus*.

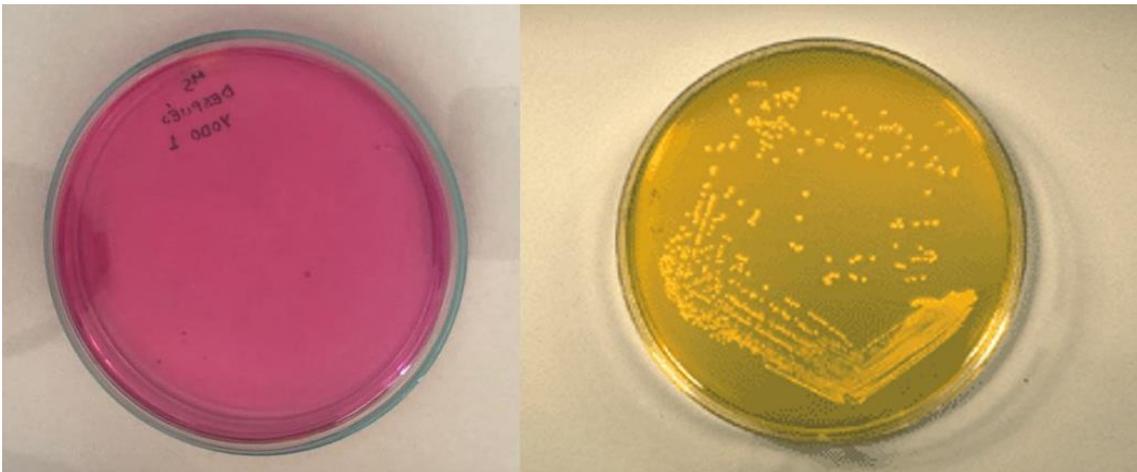


Figura 1. Agar Manitol Salado. Izquierda: recién sembrado por estría. Derecha: después de incubación a 37°C por 24 horas.

La cepa de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ desarrolló en el agar Eosina Azul de Metileno formando colonias de verde plateado (figura 2). La prueba de identificación bioquímica por siembra en medios diferenciales confirmó la presencia de *Escherichia coli* (figura 3).

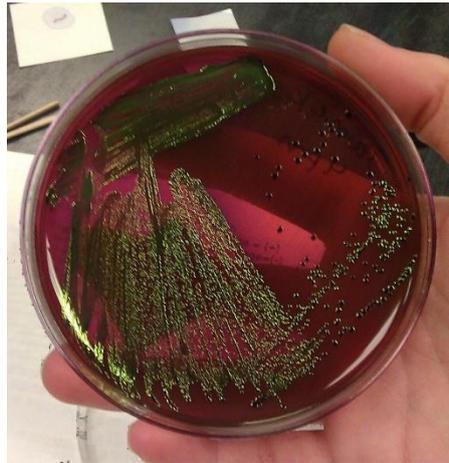


Figura 2. Agar Eosina Azul de Metileno en el que se sembró una cepa de *Escherichia coli* y se incubó a 37°C durante 24 horas.



Figura 3. Medios diferenciales. Izquierda: Agar Citrato de Simmons, MIO, TSI, LIA y Agar Urea en los que recién se ha sembrado *Escherichia coli*. Derecha: después de 24 horas a 37°C.

El tubo 0.5 de la escala de Mc Farland, los discos con algarrobina y los inóculos para la demostración de la actividad antibacteriana se prepararon sin inconvenientes, cumpliendo con las características esperadas.

III.2 Demostración de la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos muestran que la algarrobina comercial que se utilizó presentó efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* ATCC® 25922™ en los 25 ensayos que se hicieron, es decir en el 100% de las pruebas. El diámetro promedio de los halos de inhibición fue de 12.48 ± 0.71 mm, con un error estándar de 0.14 (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias absolutas de los halos de inhibición formados por la interacción de la algarrobina con *Escherichia coli* con sus medidas estadísticas descriptivas.

Diámetro del halo de inhibición	Frecuencia	Resultado
11 mm	2	+
12 mm	10	+
13 mm	12	+
14 mm	1	+
TOTAL	25	
PROMEDIO \pm D.E.	$12,48 \pm 0,71$	
ERROR ESTÁNDAR	0.1428	

III.3 Demostración de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*

Los resultados obtenidos muestran que la algarrobina presentó efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ en los 25 ensayos que se hicieron, es decir en el 100% de las pruebas. El diámetro promedio de los halos de inhibición fue de 18.64 ± 0.49 mm, con un error estándar de 0.10 (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de los halos de inhibición ocasionados por la interacción de la algarrobina con *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ con sus medidas estadísticas descriptivas.

Diámetro del halo de inhibición	Frecuencia	Resultado
18 mm	9	+
19 mm	16	+
TOTAL	25	
PROMEDIO ± D.E.	18,64 ± 0,49	
ERROR ESTÁNDAR	0.098	

La tabla de análisis de varianza (ANOVA) muestra que el grado de inhibición de las bacterias estudiadas por acción de la algarrobina es distinto (anexo 5). *Escherichia coli* ATCC® 25922™ es menos inhibida que *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ por efecto de la algarrobina.

III.4 Determinación de la CMI de la algarrobina frente a *Escherichia coli*.

Los diámetros de los halos de inhibición que se formaron al final de los ensayos se presentan con detalle en la tabla 3. Se obtuvo un diámetro promedio de 12.6±0.55 mm con algarrobina pura, 11.4±0.55 mm con algarrobina concentrada al 75%, 8.2±0.84 mm con algarrobina concentrada al 50% y no se observó halo de inhibición cuando se utilizó algarrobina al 25% y 12.5% de concentración.

Tabla 3. Diámetro de los halos de inhibición expresado en mm formados por la interacción de la algarrobina a diferentes concentraciones con *Escherichia coli* y sus medidas estadísticas descriptivas, expresados en mm.

	CONCENTRACIÓN DE LA ALGARROBINA				
	100%	75%	50%	25%	12.5%
ENSAYO 1	12	11	8	0	0
ENSAYO 2	13	12	9	0	0
ENSAYO 3	13	11	7	0	0
ENSAYO 4	13	12	9	0	0
ENSAYO 5	12	11	8	0	0
PROMEDIO ± D.E.	12,6±0,55	11,4±0,55	8,2±0,84	0	0
ERROR ESTÁNDAR	0.2449	0.2449	0.3742	0	0

Los resultados muestran que el efecto inhibitorio varía acorde al grado de concentración de la algarrobina, tal es así que el efecto inhibitorio va disminuyendo conforme va bajando la concentración de la algarrobina, y cae a cero cuando la concentración de la algarrobina alcanza el 25% o menos, por lo que la concentración mínima inhibitoria de algarrobina frente a *Escherichia coli* es a una concentración del 50%.

El análisis de varianza muestra que las diferencias en el grado de inhibición de *Escherichia coli* cuando es sometida a tratamiento con diferentes concentraciones de algarrobina son significativas (anexo 6).

La prueba HSD Tukey muestra que existe diferencia significativa entre el grado de inhibición de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ por algarrobina pura y por algarrobina al 75% de concentración, con un margen de error del 5%. También existe diferencias significativas con una margen de error del 1% entre los grados de inhibición de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ sometida a la acción de la algarrobina cuando se comparan otras combinaciones de concentraciones,

excepto cuando se compara la inhibición producida por la algarrobina al 25% y 12.5%, entre las que no existe diferencia significativa (anexo 7).

III.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la algarrobina frente a *Staphylococcus aureus*.

Se preparó exitosamente la suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ y los ensayos para determinar la concentración mínima inhibitoria se hicieron sin inconvenientes.

Los diámetros de los halos de inhibición que se formaron al final de los ensayos se presentan con detalle en la tabla 4. Se obtuvo un diámetro promedio de 18.6 ± 0.55 mm con algarrobina pura, 16.2 ± 0.84 mm con algarrobina concentrada al 75%, 13.6 ± 0.55 mm con algarrobina concentrada al 50%, 9.6 ± 0.55 mm con algarrobina concentrada al 25% y no se observó halo de inhibición cuando se utilizó algarrobina al 12.5% de concentración.

Tabla 4. Diámetro de los halos de inhibición expresado en mm formados por la interacción de la algarrobina a diferentes concentraciones con *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ y sus medidas estadísticas descriptivas, expresados en mm.

	CONCENTRACIÓN DE LA ALGARROBINA				
	100%	75%	50%	25%	12.5%
ENSAYO 1	18	16	13	10	0
ENSAYO 2	19	16	14	9	0
ENSAYO 3	19	17	14	10	0
ENSAYO 4	18	15	13	9	0
ENSAYO 5	19	17	14	10	0
PROMEDIO ± D.E.	$18,6 \pm 0,55$	$16,2 \pm 0,84$	$13,6 \pm 0,55$	$9,6 \pm 0,55$	0
ERROR ESTÁNDAR	0,2449	0,3742	0,2449	0,2449	0

Los resultados muestran que el efecto inhibitorio varía acorde al grado de concentración de la algarrobina, tal es así que el efecto inhibitorio va disminuyendo conforme va bajando la concentración de la algarrobina, y cae a cero cuando la concentración de la algarrobina alcanza el 12.5%, por lo que la concentración mínima inhibitoria de algarrobina frente a *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ es a una concentración del 25%.

El análisis de varianza muestra que las diferencias en el grado de inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ cuando es sometida a tratamiento con diferentes concentraciones de algarrobina son significativas (anexo 8).

La prueba HSD Tukey demuestra que existe diferencias significativas con un margen de error del 1%, entre los grados de inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ sometido a la acción de la algarrobina cuando se comparan cualquier par de combinaciones de concentración (anexo 9).

La concentración mínima inhibitoria de la algarrobina determinada en este trabajo de investigación fue diferente para cada una de las especies bacterianas utilizadas. *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ es más susceptible que *Escherichia coli* ATCC® 25922™ a la acción de la algarrobina (tabla 5)

Tabla 5. Valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la algarrobina sobre *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™. Los valores están expresados en porcentaje (%) v/v.

CEPA BACTERIANA	CMI (% v/v)
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	50%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™	25%

IV. DISCUSIÓN

El método utilizado en esta investigación para evaluar la actividad antimicrobiana fue el de difusión en agar, el cual es muy usado para estudiar la actividad antimicrobiana de extractos y está orientado para bacterias de crecimiento rápido como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (52).

Los resultados de esta investigación muestran que la algarrobina comercial de *Prosopis pallida* si presenta efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estos resultados eran los esperados debido a que otras investigaciones demostraron que *Prosopis pallida* presenta actividad bacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (5, 16, 23, 28, 30-32) y frente a *Escherichia coli* (5, 28, 30)

La actividad antimicrobiana de la algarrobina de *Prosopis pallida* podría deberse a su contenido de polifenoles, flavonoides y taninos (23). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios abundantes en los vegetales, los cuales poseen propiedades antibacterianas (53). Los polifenoles reportados en *Prosopis pallida* son el ácido gálico, catequinas, taninos condensados, etc. (54).

Se ha reportado que los fenoles tienen la propiedad de bloquear la actividad enzimática de la beta-glucano sintasa que es una enzima clave para la formación de la pared celular bacteriana (55).

Los flavonoides también presentan actividad antibacteriana (56). Varias investigaciones han demostrado que esta propiedad antimicrobiana se debe a sus capacidades quelantes de hierro y sus capacidades para capturar radicales libres e inhibir las oxidasas; evitando de esta manera la formación de ROS y de hidroxiperóxidos orgánicos (57, 58). *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

utilizan su peroxidasa para sobrevivir al estrés oxidativo (59), la cual, al ser inhibida, podría afectar el crecimiento de estas bacterias.

R. Diaz afirma que “el ácido gálico, las catequinas y otros compuestos fenólicos, presentes a la algarrobina, actúan sobre las membranas celulares, inhibiendo los 18 canales iónicos” (60). A. García complementa la explicación sobre el mecanismo de acción antibacteriana de los polifenoles afirmando que “los compuestos fenólicos pueden alterar las membranas y pared celular de las bacterias e inhibir la síntesis de enzimas, con la consecuente salida de proteínas, ácidos nucleicos, iones inorgánicos y otros elementos vitales para la célula bacteriana, con lo que conduciría a la muerte bacteriana” (61)

Los taninos también colaboran en la inhibición del crecimiento microbiano gracias a su capacidad para capturar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica (62).

Además, se observó que *Staphylococcus aureus* es más sensible que *Escherichia coli* a la acción antibacteriana de la algarrobina. Algunas investigaciones reportan que esta susceptibilidad diferenciada podría estar asociada a la diferente composición de las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las primeras, a la cual pertenece *Escherichia coli*, presentan una membrana exterior y una alta concentración de lípidos que proporcionan una barrera que dificulta el paso de algunas moléculas antimicrobianas. Las segundas, a las que pertenece *Staphylococcus aureus*, no presentan esta membrana externa (63).

La prueba de Tukey, conocida también como la prueba de diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD de Tukey), es un método que permite comparar las medias individuales provenientes de un análisis de varianza de varias muestras sometidas a tratamientos distintos, permitiendo discernir si los

resultados obtenidos son significativamente diferentes o no. Por ello es que se seleccionó esta prueba para establecer si existe diferencia estadísticamente significativa en el grado de inhibición del crecimiento de las dos bacterias utilizadas en este trabajo de investigación cuando son puestas en contacto con diversas concentraciones de algarrobina.

Si bien es cierto, que se demostró que cuando se trabaja con un intervalo de confianza del 95%, la prueba de Tukey confirma que cada dilución de algarrobina utilizada inhibe con diferente grado de intensidad a las bacterias utilizadas en este estudio y que disminuye conforme se diluye más la algarrobina; nos llamó la atención que en el tratamiento de *Escherichia coli*, la prueba de Tukey muestra que no hay diferencia estadísticamente significativa cuando se emplea algarrobina al 100% o algarrobina al 75% con un intervalo de confianza del 99% (anexo 7). Pensamos que ello se debe a que es más difícil que la algarrobina a altas concentraciones pueda atravesar la pared celular y la membrana externa con alto contenido de lípidos que poseen las bacterias gram negativas.

Todos los trabajos de investigación revisados durante el desarrollo de esta investigación reportan que los extractos de *Prosopis pallida* presentan actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, sin embargo, algunos investigadores como C. Cárdenas reportaron que no presentaba actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* (16). Este resultado opuesto al encontrado por nosotros podría deberse a que Cárdenas trabajó con *Escherichia coli* ATCC® 8739™, que en la página oficial de ATCC (www.atcc.org) se reporta como una cepa acondicionada para ensayos de bioresistencia, a diferencia de la cepa ATCC® 25922™ que la reportan como una cepa acondicionada para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por discos.

R. Bussmann y col. tampoco encontraron actividad contra *Escherichia coli* (32). Ellos trabajaron con *Escherichia coli* aislada de paciente con infección urinaria. Milagros Yábar y col. encontraron que el 45.9% de las *Escherichia coli* aisladas

de pacientes con infección urinaria eran multirresistentes (65), es decir, habían desarrollado mecanismos para resistir a tratamientos con sustancias antibacterianas. Este hallazgo podría explicar este resultado opuesto al encontrado por nosotros.

Otra posible explicación a la diferencia de resultados respecto a la sensibilidad de *E. coli* a la algarrobina es que los trabajos citados en esta investigación utilizaron algarrobina comercial, motivo por el cual no se sabe fehacientemente su composición. Nosotros también hemos utilizado algarrobina comercial, lo cual tampoco descarta que tuviera algún componente, adicional a la algarroba, que haya contribuido a nuestros resultados. Ello no resta importancia a los hallazgos reportados porque la algarrobina comercial es la que está disponible para la población.

No obstante, consideramos que la algarrobina que hemos utilizado solo contiene algarroba y agua debido a se compró de una marca piurana reconocida y se elaboró en Piura, departamento peruano donde abunda el algarrobo y se puede ver que hay gente que va por las calles recogiendo las algarrobas (los frutos maduros del algarrobo) que caen maduras, ocasionando que sea una materia prima muy barata lo que hace difícil que se encuentre otros ingredientes de menor valor.

Las algarrobas son completamente ricas en glucosa, sacarosa, fructuosa y fibra; siendo también una fuente de proteínas; además de calcio, fósforo, hierro, magnesio y potasio (66) hecho que nos conlleva a pensar que su valor nutricional no solo aplica para los humanos y animales como normalmente se usa, sino también son nutritivas para las bacterias, pero a pesar de ello, su contenido de polifenoles, flavonoides y taninos (23) es suficiente como para inhibir el crecimiento antibacteriano con mayor intensidad que su potencial nutricional bacteriano.

El mercado para la algarrobina viene experimentando un crecimiento a nivel nacional –aunque algo lento–, y a nivel internacional se ha despertado cierto interés (España, Italia y EE.UU). Su atractivo está no sólo en su calidad nutricional y su origen natural, sino también en algunas propiedades medicinales (67), una de las cuales se ha demostrado en esta investigación.

La algarrobina se consume como reconstituyente y fortificante, a manera de medicamento, por cucharadas; asimismo, como saborizante de jugos y de un típico cóctel de algarrobina (68) y en Piura, es común escuchar a la gente decir que es bueno consumir algarrobina porque da energía y los hace más “fuertes” a las infecciones. En este trabajo se ha demostrado una posible explicación a esa “fuerza” para recuperarse de las infecciones, aunque se sugiere estudios clínicos en base a nuestros resultados.

Consideramos que este estudio tiene 3 limitaciones: la primera es que se ha desarrollado con cepas bacterianas ATCC, por lo que se reforzaría con otro estudio en el que se trabaje con cepas aisladas de pacientes infectados con las especies bacterianas estudiadas. La segunda limitación de este estudio es que se ha desarrollado “in vitro”, por lo que sería ampliamente complementado con un estudio clínico. La tercera limitación es que se trabajó solo con una marca de algarrobina.

CONCLUSIONES

- La algarrobina comercial de *Prosopis pallida* presenta efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* con una concentración mínima inhibitoria de 50% v/v
- La algarrobina comercial de *Prosopis pallida* tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, con una concentración mínima inhibitoria de 25% v/v
- Existe diferencia significativa entre la CMI de la algarrobina comercial para *Escherichia coli* y para *Staphylococcus aureus*, siendo mayor para la primera bacteria.

RECOMENDACIONES

Se sugiere ampliar este estudio utilizando cepas aisladas de pacientes infectados con estas bacterias.

Así mismo se podría ampliar este estudio utilizando algarrobina de diferentes marcas y comparar los resultados.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Guilherme A, Honorato T, Dornelles A, Pinto G, Brito E, Rodrigues S. Quality Evaluation of Mesquite (*Prosopis juliflora*) Pods and Cashew (*Anacardium occidentale*) apple syrups. *Journal of food process engineering*. 2009; 32(1):11-14.
2. Dostert N, Roque J, Cano A, Torre MIL, Weigend M. Hoja botánica: Algarrobo - *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth. [internet] 2012 [citado 2020 feb 20]; Available from: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.11095.78249>
3. Vásquez L, Ecurra J. Los algarrobos del Perú. Curso de Botánica General. Facultad de Agronomía Piura: UNP; 1986
4. Valdivia M. Evaluación de la población de *Prosopis pallida* var. *armata* ("huarango") para conservación y manejo en cuatro quebradas del distrito de Yarabamba [Internet]. Universidad Nacional de San Agustín; 2018. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5484>
5. Sandoval Zavaleta EJ, Zuñiga Julca EM. Efecto antibacteriano in vitro de los alcaloides totales extraídos de hojas de *prosopis pallida* (Humb. & bonpl. Ex willd.) kunth "algarrobo" frente a *staphylococcus aureus* y *escherichia coli*. Universidad Nacional de Trujillo [Internet] 2016 [citado 2020 feb 20]; Available from: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1497>
6. Pandey AK, Kumar S. Perspective on plant products as antimicrobials agents: a review. *Pharmacologia* 2013;4(7):469-80.
7. Gallegos-Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina* 2016;77(4):327-32.

8. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013
9. Alvarado S. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Prosopis pallida* (ALGARROBO) sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Internet]. Universidad César Vallejo. 2017 [citado 28 Feb 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/726>
10. Flor E. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K. Quito, Pichincha [Internet]. Universidad Central del Ecuador; 2013. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/989/1/T-UC-0004-14.pdf>
11. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Díaz C y Puicón J. Productos industrializables de la algarroba peruana (*Prosopis pallida*): algarrobina y harina de algarroba. [Internet]. Multequina 2000; 9(2): 119-132. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en: http://www.cricyt.edu.ar/multequina/indice/pdf/09_02/9_2_8.pdf
12. González A, Duarte A, Patto C, Piccolo. Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis* spp. procedente de Bolivia y Brasil. [Internet]. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 2008; 58(3): 309-315. [citado 2 Mar 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org/ve/pdf/alan/v58n3/art15.pdf>
13. Arambarri AM, Novoa MC, Bayón ND, Hernández MP, Colares MN y Monti C. Anatomía foliar de arbustos y árboles medicinales de la región chaqueña semiárida de la Argentina. [Internet]. Dominguezia 2011; 27(1): 11. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en: <http://dominguezia.org/volumen/articulos/2711.pdf>
14. Romero C, Alejandra M. Revalorizando el bosque seco de algarrobo : estudio y análisis de la biodiversidad, distribución y conservación de los

bosques secos en Lambayeque. Pontificia Universidad Católica del Perú [Internet] 2015 [citado 2020 feb 20]; Available from: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/6313>

15. Henciya S, Seturaman P, James AR, Tsai Y-H, Nikam R, Wu Y-C, et al. Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, leguminosa). *Journal of Food and Drug Analysis* 2017;25(1):187-96
16. Cárdenas C. Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo” [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/5857>
17. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 2012;27(1):76-89
18. Limón S, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J. Los flavonoides: Mecanismo de acción Neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*. 2010; 34: 143-154.
19. Swain T. Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology*. 1977; 28(1):479 - 501.
20. Rodríguez L, Valdivia B, Contreras J, Esquivel J, Rodríguez E, Aguilar C. Química y biotecnología de la Tanasa. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2010; 2(4):46-51
21. Khanbabaee K, Van Ree T. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports Articles*. 2001; 18(6):641 - 649.
22. Vásquez Cachay L. EFECTO ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Prosopis pallida* (ALGARROBO) SOBRE *Candida albicans* ATCC 90028. [Internet]. Universidad César Vallejo.

2017 [citado 28 Jul 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/11057>

23. Cárdenas C, Ruiz J, Castro A, Ramos N, Rojas J, Ramos D. Actividad antibacteriana y antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* (algarrobo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2017; 22(4): 22-24
24. Lima P. Comportamiento silvicultural de especies de *Prosopis*. Tesis de grado. Brasil: Universidad Federal de Paraná; 1994.
25. Ferreyra R. El algarrobal y su estructura florística. AGRIS – FAO. [Internet]. 2008 [citado 28 Jul 2020]; Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PE2000102375>
26. Málaga V, Antonio M. Evaluación de la población de *Prosopis pallida* var. *armata* (“Huarango”) para conservación y manejo en cuatro quebradas del Distrito de Yarabamba (Arequipa, 2015). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa [Internet] 2018 [citado 2020 feb 20]; Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5484>
27. Cueva D. Evaluación de las características morfométricas y poblacionales de los relictos de *Prosopis pallida* en cinco quebradas de Yarabamba. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa [Internet]. 2001 [citado 20 Feb 2020]; Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/5484>
28. Gonzales-Barrón U, Dijkshoorn R, Maloncy M, Finimundy T, Calhelha R, Pereira C et al. Nutritive and Bioactive Properties of Mesquite (*Prosopis pallida*) Flour and Its Technological Performance in Breadmaking. *Foods*. [Internet]. 2020; 9(5):597. [citado 20 Feb 2020]; Disponible en <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/5/597>

29. Enríquez Díaz M, Gómez Zapata G, Guerrero Manrique M. Efecto antifúngico in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Plantago major* (llantén), *Ruta graveolens* (ruda) sobre *Candida albicans* ATCC 10231. [Internet]. Universidad César Vallejo. 2018 [citado 28 Jul 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/26354>
30. Castro E. Efecto antibacteriano de miel de *Apis mellifera* y algarrobina de *Prosopis pallida* sobre coliformes en quesillos preparados artesanalmente expendidos en el mercado “La Unión” – Trujillo [Internet]. Universidad César Vallejo. 2017 [citado 28 Feb 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/614>
31. Bussmann R, Glenn A, Meyer K, Rothrock A, Townesmith A, Sharon D et al. Antibacterial Activity of Medicinal Plants of Northern Peru – Part II. *Arnaldoa* 2009; 16 (1): 93 – 103
32. Bussmann R, Glenn A, Sharon D, Chait G, Diaz D, Pourmand K et al. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnobotany Research & Applications*. 2011; 9(1):67-96
33. Grillo M y Livia N. Efecto antibacteriano in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Plantago major* (llantén) y *Ruta graveolens* (ruda) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. [Internet]. Universidad César Vallejo. 2018 [citado 28 Jul 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/26356>
34. Eduardo P, Juárez D, Morante N, Tejero P. Efecto antibacteriano in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Ruta graveolens* (ruda), *Plantago major* (llantén) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Internet]. Universidad César Vallejo. 2018

[citado 28 Jul 2020]. Disponible en <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/26353>

35. Alvarado Saavedra S, Herrera-Plasencia P, Enoki Miñano E, Ruiz-Barrueto M, Millones Gómez P. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Prosopis pallida* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. [Internet]. 2018; 70(2): 1-12. [citado 28 Jul 2020]; Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602018000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
36. Quispe Pardo Z. Situación epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud e indicadores de referencia, Perú. 2016. *Boletín Epidemiológico del Perú*. 2017: 401 -404
37. Imam T. Infecciones urinarias (IU) bacterianas. Manual MSD versión para profesionales. [Internet]. 2018. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-urogenitales/infecciones-urinarias/introducci%C3%B3n-a-las-infecciones-urinarias>
38. Riveros M, Ochoa T. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2015; 32(1): 34-36
39. Kaper J. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Medical Microbiol*. 2005; 95(1):355-356
40. Scheutz F, Strockbine N, Genus I. The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª ed. Edit. Springer; 2005. p. 607-623.
41. Picazo J, Prieto J. *Compendio de Microbiología*. 2ª ed. Edit Elsevier Health Sciences; España. 2016. Pag. 346-367

42. Agapito T, Horna Quintana J, Tapia G, Vicente E, Silva W, Zerpa M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Revista Médica Herediana*. 2010; 21(1): 4-10
43. Sandival-Ampuero G, Mucching-Toscano S, Champi-Merino R, Alvarado-Gamarra G. Colonización simultánea por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus resistente* a vancomicina. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. [Internet]. 2015; 32(2): 400-401. [citado 28 Feb 2020]; Disponible en <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.322.1643>
44. Jawetz E. *Microbiología Médica*. México. 5a ed. Ed. El Manual Moderno. 2002. Pág. 56- 67
45. Verástegui Albites R, Balmaceda Nieto M, Guardia Márquez C. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en el Hospital Cayetano Heredia entre junio 2017 - diciembre 2018. [Internet]. Tesis. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019. [citado 28 Feb 2020]. Disponible en <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/6373>
46. Wenzel R. Prevención y tratamiento de Infecciones adquiridas en el Hospital. En Smith Wy. *Tratado de Medicina Interna*. 18a ed. Madrid: Edit. Interamericana; 2000
47. Javad Sharifi-Rad, Farzad Kobarfard, Athar Ata, Seyed Abdulmajid Ayatollahi, Nafiseh Khosravi-Dehaghi, Arun Kumar Jugran et al. Prosopis Plant Chemical Composition and Pharmacological Attributes: Targeting Clinical Studies from Preclinical Evidence. *Biomolecules*. [Internet]. 2019; 9(12): 777. [citado 28 Feb 2020]; Disponible en <http://dx.doi.org/10.3390/biom9120777>

48. Laboratorios Britania. Mueller Hinton Agar. [Internet]. 2021. [citado 28 Abr 2021]. Disponible en https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070756160103.pdf
49. Ministerio de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [Internet]. 2002. [citado 20 feb 2020]; Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/informes-publicaciones/353004-manual-de-procedimientos-para-la-prueba-de-sensibilidad-antimicrobiana-por-el-metodo-de-disco-difusion>
50. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P et al. Koneman Diagnóstico microbiológico. Argentina. 6ª ed. Ed. Médica Panamericana. 2008. P. 902-969
51. Ministerio del Ambiente. Ley General del Ambiente – Ley N° 28611. [citado 20 feb 2020]; Disponible en <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2013/06/ley-general-del-ambiente.pdf>
52. Herrera L. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. Revista Médica del Hospital Nacional del Niño. [Internet]. 1999; 34(Suppl): 33-41 [citado el 10 de octubre del 2020];. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
53. Doroteo VH, Díaz C, Terry C, Rojas R. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú 2013;79(1):13-20

54. Flor Caravia E. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*) H.B.K. Quito, Pichincha. [Internet]. 2013 [citado 20 feb 2020]; Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/989>
55. Mason TL, Bruce P. W. Inactivation of red beet β -glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 1987;26(8):2197-202.
56. Cushnie T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;26(5):343-56
57. Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2009;52(2):73-5.
58. Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2003;22(1):48-37
59. Agranoff D, Krishna S. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Molecular Microbiology*, 1998. 28: 403-412
60. Díaz Gómez RO. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. [Internet]. Universidad de Chile. 2012 [citado 28 feb 2020]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112192/diaz_r.pdf?sequen ce=1&isAllowed=y
61. García A. Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación. Tesis doctoral. [Internet]. Universidad Autónoma de Madrid. 2012. [citado 28 feb 2020]. Disponible en: <http://digital.csic.es/handle/10261/60799>

62. Santamaría E. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris L.*) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*) [Tesis]. Riobamba. Escuela superior politécnica de Chimborazo; 2013
63. Tajbakhsh S, Barmak A, Vakhshiteh F, Gharibi M. Invitro antibacterial activity of the prosopis juliflora seed pods on some common pathogens. Journal of clinical and diagnostic research. [Internet] 2015. 9(8): 13-5 [citado 20 feb 2020]; Disponible en: http://www.jcdr.net/back_issues.asp?issn=0973-709x&year=2015&month=August&volume=9&issue=8&page=DC13&id=6370
64. Galera F. Las especies del género Prosopis (algarrobos) de América latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. Buenos Aires: FAO. Departamento de Agricultura; [Internet]. 2000. 269 pp. [citado 20 feb 2020]; Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad314s/AD314S00.htm#TOC>
65. Yábar M, Curi-Pesantes B, Torres C, Calderón-Anyosa R, Riveros M, Ochoa T. Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. [Internet]. 2017 34(4). [citado el 10 de octubre del 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342017000400012
66. Alzate-Tamayo L, Arteaga-González D, Jaramillo-Garcés Y. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. Revista Lasallista de Investigación [Internet]. 2008;5(2):100-11. [citado el 26 de agosto del 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69550213>

67. Ruiz W. Evaluación económica de procesos para la obtención de productos de algarroba. Ponencia presentada en el Coloquio Internacional: "El algarrobo en el desarrollo sostenible después de El Niño". Abril 1998. Piura, Perú.

68. Grados N, Ruiz W, Cruz G, Diaz C, Puicón J. Productos industrializables de la algarroba peruana (*Prosopis pallida*): algarrobina y harina de algarroba. [internet]. 2000. *Multequina* 9(2): 119-32. [citado el 26 de agosto del 2021]. Disponible en: https://www.mendoza.conicet.gov.ar/portal/multequina/indice/pdf/09_02/9_2_8.pdf

ANEXOS

1. Ficha de recolección de datos para demostración de la actividad antibacteriana

PLACA N° _____

N° DE ENSAYO	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™		
	DIÁMETRO HALO DE INHIBIC. *	RESULTADO POSITIVO (+)**	RESULTADO NEGATIVO (-)**	DIÁMETRO HALO DE INHIBIC. *	RESULTADO POSITIVO (+)**	RESULTADO NEGATIVO (-)**
1						
2						
3						
4						
5						

NOTA: * El diámetro se medirá en mm. ** Se marcará como resultado positivo cuando el diámetro del halo de inhibición sea mayor a cero (0) mm de diámetro, caso contrario se marcará como resultado negativo

2. Ficha de recolección de datos para determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Especie bacteriana: _____

NÚMERO DE ENSAYO	CRITERIO	DILUCIÓN PORCENTUAL DE LA ALGARROBINA				
		100%	75%	50%	25%	12.5%
ENSAYO 1	Diámetro del halo de inhibición*					
	Resultado positivo (+) **					
	Resultado negativo (-) **					
ENSAYO 2	Diámetro del halo de inhibición*					
	Resultado positivo (+) **					
	Resultado negativo (-) **					
ENSAYO 3	Diámetro del halo de inhibición*					
	Resultado positivo (+) **					
	Resultado negativo (-) **					
ENSAYO 4	Diámetro del halo de inhibición*					
	Resultado positivo (+) **					
	Resultado negativo (-) **					
ENSAYO 5	Diámetro del halo de inhibición*					
	Resultado positivo (+) **					
	Resultado negativo (-) **					

NOTA: * El diámetro se medirá en mm. ** Se marcará como resultado positivo cuando el diámetro del halo de inhibición sea mayor a cero (0) mm de diámetro, caso contrario se marcará como resultado negativo-

3. Preparación de las soluciones de algarrobina en cabina de bioseguridad para disminuir probabilidad de contaminación.



4. Siembra de cepas bacterianas por distribución uniforme en cabina de bioseguridad.



5. **Análisis de varianza (ANOVA) entre los diámetros de los halos de inhibición ocasionados por la interacción de la algarrobina con *Escherichia coli* ATCC® 25922™ y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™.**

	suma de cuadrados	Gl	media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	474.32	1	474.32	1264.853	0
Dentro de los grupos	18	48	0.375		
Total	492.32	49			

6. **Análisis de varianza (ANOVA) entre los diámetros de los halos de inhibición ocasionados por la interacción de la algarrobina a diferentes concentraciones con *Escherichia coli* ATCC® 25922™**

	suma de cuadrados	Gl	media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	742.96	4	185.74	714.3846	0
Dentro de los grupos	5.2	20	0.26		
Total	748.16	24			

7. **Prueba HSD Tukey para el tratamiento de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ con algarrobina a diferentes concentraciones (M1=100%, M2=75%, M3=50%)**

FACTOR	HSD (0.05) = 0.97	HSD (0.01) = 1.21
	Diferencia de medias	Sig.
M1 vs M2	1.2	P<0.05
M1 vs M3	4.4	P<0.01
M2 vs M3	3.2	P<0.01

8. Análisis de varianza (ANOVA) entre los diámetros de los halos de inhibición ocasionados por la interacción de la algarrobina a diferentes concentraciones con *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™

	suma de cuadrados	Gl	media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1063.6	4	265.9	830.9375	0
Dentro de los grupos	6.4	20	0.32		
Total	1070	24			

9. Prueba HSD Tukey para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ con algarrobina a diferentes concentraciones (M1=100%, M2=75%, M3=50%, M4=25%)

HSD (0.05) = 1.07; HSD (0.01) = 1.34		
FACTOR	Diferencia de medias	Sig.
M1 vs M2	2.4	P<0.01
M1 vs M3	5	P<0.01
M1 vs M4	9	P<0.01
M2 vs M3	2.6	P<0.01
M2 vs M4	6.6	P<0.01
M3 vs M4	4	P<0.01