



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN EXTRACTO
ETANÓLICO A PARTIR DE HOJAS DE *Annona muricata* FRENTE A
Pectobacterium carotovorum

Línea de investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora

Andia Gonzales, Maria Claudia Milagros

Asesor

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

ORCID: 0000-0002-5672-5516

Jurado

Iannacone Oliver, José Alberto

Murrugarra Bringas, Victoria

Yana Neira, Evelin Amparo

Lima - Perú

2025



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN EXTRACTO ETANÓLICO A PARTIR DE HOJAS DE *Annona muricata* FRENTE A *Pectobacterium carotovorum*

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	15%	7%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
2	rein.umcc.cu Fuente de Internet	1%
3	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
7	Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal Trabajo del estudiante	<1%
8	repositorio.unfv.edu.pe:8080 Fuente de Internet	<1%
9	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1%
10	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1%
11	bonga.unisimon.edu.co Fuente de Internet	



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN EXTRACTO
ETANÓLICO A PARTIR DE HOJAS DE *Annona muricata* FRENTE A *Pectobacterium*
carotovorum

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor(a)

Andia Gonzales, Maria Claudia Milagros

Asesor(a)

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

(ORCID: 0000-0002-5672-5516)

Jurado

Iannacone Oliver, José Alberto

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Yana Neira, Evelin Amaparo

Lima - Perú

2025

Dedicatoria

A Dios, por permitirme seguir admirando la vida cada día, incluso en los momentos difíciles.

Y a esa pequeña niña que un día dudó de su futuro: hemos crecido mucho, y aunque el camino no ha sido fácil, aún quedan muchos sueños por conquistar. Hoy caminamos con más fuerza, con más amor y con la certeza de que lo mejor aún está por venir.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mi asesor, el Dr. Óscar Nolasco, y al grupo de investigación GIBBS por abrirme las puertas y acompañarme en este camino con su guía y confianza.

A las amistades que la universidad vida me regalaron, por acompañarme y hacer más llevadero este camino.

A mi familia, en especial a mi abuela, por su amor incondicional hasta el final, y a mi tía Paty, por creer en mí y darme la oportunidad de seguir creciendo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Descripción y formulación del problema.....	8
1.2 Antecedentes	10
1.3 Objetivos.....	12
<i>Objetivo general</i>	<i>12</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>12</i>
1.4 Justificación.....	12
1.5 Hipótesis	13
II. MARCO TEORICO	14
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	14
<i>Pudrición blanda bacteriana</i>	<i>14</i>
<i>Pectobacterium carotovorum.....</i>	<i>14</i>
<i>Annona muricata</i>	<i>15</i>
<i>Sensibilidad bacteriana.....</i>	<i>16</i>
III. METODO	17
3.1 Tipo de investigación.....	17
3.2 Ámbito temporal y espacial	17
3.3 Variables.....	17
<i>Variable Independiente:.....</i>	<i>17</i>

<i>Variable Dependiente:</i>	17
3.4 Poblaciones y muestras	17
3.5 Instrumentos	18
3.6 Procedimientos	19
3.6.1 Muestra vegetal y extracto etanólico	19
3.6.2 Aislado bacteriano	21
3.6.3 Enfrentamiento del extracto etanólico con la bacteria	23
3.7 Análisis de datos	24
3.8 Consideraciones éticas	24
IV. RESULTADOS	26
4.1 Muestra vegetal y extracto etanólico	26
4.2 Aislado bacteriano	29
4.3 Enfrentamiento del extracto etanólico con la bacteria	30
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	38
VIII. REFERENCIAS	39
ANEXO 1	47

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos de hojas de *Annona muricata* frente a *Pectobacterium carotovorum*, bacteria fitopatógena responsable de la pudrición blanda en cultivos agrícolas. Se prepararon dos extractos etanólicos utilizando etanol al 70° y 90°, y se evaluó su efecto antibacteriano utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en concentraciones de 1000 mg/mL a 62.5 mg/mL. El aislamiento de *P. carotovorum* se realizó a partir de un tubérculo de papa con síntomas de pudrición blanda, y su identificación molecular se confirmó mediante el análisis secuenciación del gen 16S rRNA. El extracto etanólico a 90° mostró halos de inhibición a 500 mg/mL, mientras que el extracto a 70° evidenció una actividad inhibitoria no reproducible. Sin embargo, luego de seis meses, ninguno de los extractos mostro capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Se concluye que el extracto etanólico obtenido a partir de hojas de *Annona muricata* presenta actividad antibacteriana contra *Pectobacterium carotovorum*.

Palabras clave: *Annona muricata*, *Pectobacterium carotovorum*, extracto etanólico, efecto antibacteriano, antimicrobianos de origen vegetal, bacterias fitopatógenas, pudrición blanda.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the antibacterial activity of ethanolic extracts obtained from *Annona muricata* leaves against *Pectobacterium carotovorum*, a phytopathogenic bacterium responsible for soft rot in agricultural crops. Two ethanolic extracts were prepared using 70° and 90° ethanol, and their antibacterial effect was evaluated using the agar diffusion method (Kirby-Bauer) at concentrations ranging from 1000 mg/mL to 62.5 mg/mL. The isolation of *P. carotovorum* was carried out from a potato tuber showing symptoms of soft rot, and its molecular identification was confirmed through 16S rRNA gene sequencing analysis. The 90° ethanolic extract showed inhibition halos at 500 mg/mL, whereas the 70° extract exhibited non-reproducible inhibitory activity. However, after six months, none of the extracts showed the ability to inhibit bacterial growth. It is concluded that the ethanolic extract obtained from *Annona muricata* leaves presents antibacterial activity against *Pectobacterium carotovorum*.

Keywords: *Annona muricata*, *Pectobacterium carotovorum*, ethanolic extract, antibacterial effect, plant-derived antimicrobials, phytopathogenic bacteria, soft rot.

I. INTRODUCCIÓN

Pectobacterium carotovorum es una bacteria fitopatógena que induce la pudrición blanda en diversos cultivos (Davidsson et al., 2013). Esta enfermedad es difícil de controlar y, en la etapa post cosecha, solo algunos agroquímicos han demostrado cierta eficacia, además de tóxicos y nocivos para salud (Nghondzweni et al., 2018). Debido a esto, ha crecido la necesidad de desarrollar estrategias alternativas de control, como el uso de biocontroladores o enfoques genéticos, para mitigar su impacto en la agricultura.

Por otro lado, el uso de extractos vegetales en productos agrícolas representa una estrategia eficaz y sostenible para el manejo de plagas y enfermedades, ya que permite reducir el impacto ambiental y los riesgos para la salud humana, al tiempo que contribuye a la seguridad alimentaria y la conservación de la biodiversidad. En este contexto, diversos estudios han demostrado que los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Annona muricata* contienen compuestos bioactivos con actividad antibacteriana frente a diferentes especies bacterianas, incluidas algunas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Dado el interés en desarrollar biocontroladores para *P. carotovorum*, el presente estudio evaluó el efecto de extractos etanólicos de *A. muricata* frente a esta bacteria fitopatógena.

1.1 Descripción y formulación del problema

La pudrición blanda bacteriana es una enfermedad altamente agresiva para diversos cultivos agrícolas (Davidsson et al., 2013), su capacidad de propagación es rápida afectando al tejido vegetal en casi toda su totalidad. Las bacterias fitopatógenas que ocasionan esta enfermedad pertenecen mayormente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, reportándose con mayor frecuencia a la especie *Pectobacterium carotovorum* (Charkowski, 2018; Cubero-Agüero, 2019).

La pudrición blanda puede ser controlada con agroquímicos post cosecha (Nghondzweni et al., 2018), sin embargo, el uso prolongado de estos productos ha generado preocupación debido a sus efectos negativos en la salud humana, la resistencia microbiana y el impacto ambiental. Por otro lado, para obtener cultivos libres de agroquímicos, se opta por implementar protocolos de manejo ambiental para evitar la propagación de la enfermedad (Acuña, 2021).

En la búsqueda de nuevas herramientas y protocolos para evitar la propagación bacteriana, diversos metabolitos secundarios de las plantas han adquirido mayor relevancia. En *Annona muricata* se presentan diversos metabolitos secundarios sobre todo en hojas, destacando la presencia de una sustancia muy particular denominada acetogeninas siendo el metabolito principal producido por la familia Annonaceae (Ortiz & Campos, 2018). Debido a conocimientos previos de medicina tradicional sobre el uso de hojas de guanábana para tratar enfermedades bacterianas aunado a diversos datos de análisis bioquímicos, algunos estudios han evaluado el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de *Annona muricata* sobre especies bacterianas pertenecientes al grupo de las enterobacterias como *Salmonella typhi* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Shigella boydii* ATCC 9207 (Callo-Condori & Farfán-Barrientos, 2011; Castillo-Ruiz & Cruz-Castillo, 2019; León et al., 2019; Llanque, 2016), logrando la inhibición bacteriana evidenciada al generar halos de inhibición en cultivo bacteriano.

Así mismo, se ha observado que el uso de extractos etanólicos de otras plantas como *Magnolia schiedeana* Schlttl. y *Lippia origanoides* (Escalona et al., 2019; Ramírez-Reyes et al., 2015), han sido evaluados sobre *Pectobacterium carotovorum* produciendo un efecto antibacteriano representado en la inhibición de su crecimiento. Sabiendo que hay antecedentes que reportan el uso de extractos de otras especies vegetales sobre *P. carotovorum* y el uso efectivo de extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* sobre un grupo de otras especies de

enterobacterias, se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de *Anona muricata* en *Pectobacterium carotovorum*, bacteria que fue aislada de una papa con síntomas de pudrición blanda en el Laboratorio de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular (LIBBM-SL10LA105).

Frente al problema que representa la enfermedad de pudrición blanda bacteriana causada por *P. carotovorum* y ante la ausencia de otros métodos alternativos de prevención a la enfermedad que eviten el uso de agroquímicos, se planteó la necesidad de evaluar extractos naturales con características antibacterianas. Por lo tanto, se formuló la siguiente pregunta: ¿Los extractos etanólicos de *Annona muricata* generan un efecto antibacteriano ante *Pectobacterium carotovorum*?

1.2 Antecedentes

En la Guía de Identificación de Plagas que afectan a la papa en la zona andina, presentada por el Centro Internacional de la Papa (CIP), se presenta como una de las plagas más comunes a la pudrición blanda bacteriana y la pierna negra, teniendo como agente causal a *Pectobacterium carotovorum sub. carotovorum* y *Pectobacterium astrosepticum* respectivamente (Pérez & Forbes, 2011).

En Mayabeque, Cuba, durante la época de cosecha de papa a inicios del 2016, se colectó 15 ejemplares enfermos que presentaban pudrición blanda y pie negro. Para identificar quienes eran los causantes de esta patología, se procedió a realizar aislados bacterianos de la zona enferma y se procedió a la identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de cada muestra, obteniendo que las bacterias responsables de la pudrición blanda bacteriana pertenecían a los géneros de *Dickeya* y *Pectobacterium* (Corzo & Quiñones, 2017).

Un segundo reporte de pudrición blanda se dio en el banano, en el valle del Chira, Piura. Se encontró pseudotallos con síntomas de pudrición blanda, a los cuales se les extrajo una muestra de las zonas acuosas para realizar aislados bacterianos y poder caracterizar de manera

cultural, morfológica y bioquímica a que especie correspondía, teniendo como resultado que los responsables se identificaron como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* y *P. chrysanthemi* (Aguilar et al., 2021).

Por otro lado, tenemos un estudio donde se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las semillas *Annona muricata* (“Guanábana”) frente a cepas de *Escherichia coli* utilizando el método de difusión en placa. Los resultados obtenidos fueron positivos para la actividad antibacteriana presentando un halo de inhibición superior a 18 mm cuando se aplica a una concentración de 50 mg/mL, concluyendo que el extracto presenta actividad antibacteriana frente al crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Llanque, 2016).

Se sabe que dentro de las plantas, las zonas con mayor cantidad de metabolitos secundarios son la hojas (Ortiz & Campos, 2018), por ello, otro reporte evaluó el efecto antibacteriano de extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* a distintas concentraciones sobre *Shigella boydii* ATCC 9207, empleando el método de difusión en agar Kirby Bauer y mediante el método de macro dilución en caldo, obteniendo que la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 200 mg/mL, demostrando que los extractos de *Annona muricata* inhibe considerablemente el crecimiento de esta enterobacteria (Castillo-Ruiz & Cruz-Castillo, 2019).

Teniendo estos reportes previos de la prevalencia de *Pectobacterium carotovorum* como uno de los principales agentes que provocan la pudrición blanda bacteriana y reportes sobre la actividad antibacteriana que presentan los extractos etanólicos de *Annona muricata* sobre otras especies del grupo de las enterobacteriáceas, familia a la cual también pertenece esta bacteria fitopatógena, se buscó antecedentes donde utilicen diversos extractos etanólicos frente a esta bacteria. En un estudio, se evaluó el efecto de extractos crudos de *Magnolia schiedeana* Schldl. en el control de bacterias fitopatógenas; los resultados mostraron que el extracto etanólico floral

inhibió el crecimiento de *P. carotovorum* en una proporción equivalente a la del control positivo; representado por tetraciclina (Ramírez-Reyes et al., 2015).

Por último, en otro estudio se evaluaron extractos etanólicos de *Lippia origanoides*, conocida como orégano silvestre, una planta a la que se le ha atribuido actividad antibacteriana debido a la síntesis de compuestos como carvacrol y timol a través de su metabolismo secundario. En dicho estudio, los extractos fueron probados contra bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas* sp., *Pectobacterium* sp. y *Xanthomonas* sp., demostrando su capacidad para inhibir el crecimiento in vitro y, por lo tanto, corroborando su efecto antimicrobiano (Escalona et al., 2019).

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* frente obtenidos a 70° y 90° frente a *Pectobacterium carotovorum*.

Objetivos específicos

Confirmar la identidad del aislado bacteriano empleado como cepa experimental mediante secuenciamiento del gen 16S rRNA.

Evaluar el efecto de distintas concentraciones (1000–62.5 mg/mL) de los extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* obtenidos a 70° y 90° sobre el crecimiento in vitro de *Pectobacterium carotovorum*.

Evaluar la estabilidad de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos tras seis meses de almacenamiento.

1.4 Justificación

Existe poca evidencia respecto al uso de compuestos orgánicos como solución ante bacterias fitopatógenas, por lo que es necesario incrementar la investigación en este ámbito científico. El desarrollo de las actividades de este estudio permitió relacionar el conocimiento

existente de *Annona muricata* como antimicrobiano de otras bacterias ajenas y propias del grupo de las Enterobacteriaceae, confrontando esta teoría con la hipótesis de que también puede dar efectos antibacterianos ante *Pectobacterium carotovorum*. A modo práctico, se buscó evaluar un método alternativo para inhibir la bacteria que origina la pudrición blanda bacteriana y así proponer el uso de los extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* como una estrategia que podría contribuir en la solución a esta problemática.

Se tiene por último la justificación medio ambiental y económica, debido a que la familia Annonaceae presenta una gran cantidad de metabolitos secundarios, siendo uno de los representantes *Annona muricata*, mencionando que estos metabolitos tienen efectos bioactivos como antibacterianos, antiparasitarios e insecticidas. Dentro de los cultivos agrarios es común el uso de productos químicos como plaguicidas para eliminar todo tipo de plagas como insectos, hongos y bacterias, sin embargo, hay un escaso estudio sobre la resistencia de estos patógenos a estos compuestos, sobre todo por parte de las bacterias, tal como se ha observado por parte de *Enterobacter sp.*, una enterobacteriácea con resistencia a sales triisopropanolaminas, atrazina y carbofuran (Ortiz-Pérez et al., 2019). Por ello, el presente trabajo de investigación busco dar una alternativa de tratamiento de origen natural ante la pudrición blanda bacteriana originada por *Pectobacterium carotovorum*, con menor toxicidad y de bajo costo.

1.5 Hipótesis

Ho: El extracto etanólico de hoja de *Annona muricata* no tiene efecto antibacteriano sobre *Pectobacterium carotovorum*

H1: El extracto etanólico de hoja de *Annona muricata* tiene efecto antibacteriano sobre *Pectobacterium carotovorum*

II. MARCO TEORICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

Pudrición blanda bacteriana

La pudrición blanda bacteriana es una enfermedad de distribución mundial que causa daños graves en plantaciones agrícolas como papa, pimiento, berenjena, tomate, cebolla, piña, y también plantas ornamentales como cala, nardo y ciclamen (Charkowski, 2018; Kunstmann et al., 2006). El tejido afectado se oscurece, se vuelve blando, puede producir exudados con mal olor debido a la humedad de la parte podrida, o puede causar necrosis en el tejido vascular del órgano de la planta o marchitez, siendo los órganos más comunes los tubérculos, bulbos, raíces, tallos y hojas (Al-Mijalli, 2014; Charkowski, 2018; Charkowski et al., 2014; *Podredumbre blanda bacteriana*, 2023).

Pectobacterium carotovorum

Pectobacterium carotovorum (Tabla 1), antes denominado *Erwinia carotovora*, es una enterobacteria patógena que causa pudrición blanda en varias plantas a través de un sistema de secreción tipo II que mediante la despolimerización de pectina degrada la pared vegetal (Aizawa, 2014).

Tabla 1

Taxonomía de Pectobacterium carotovorum

Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	<i>Pectobacterium</i>
Especie	<i>P. carotovorum</i>

Nota. Datos tomados de *Base de datos mundial de la EPPO (Pectobacterium carotovorum (ERWICA), 2002).*

Es una bacteria pectinolítica de 0,7 a 1,0 μ m de ancho y de 1 a 2,5 μ m de largo, móvil debido a la presencia de flagelos peritricos, anaerobio facultativo, no esporulado y fermentativo. Su crecimiento in vitro forma colonias blanquecinas cremosas con elevación convexa formando colonias únicas o creciendo en grupo de dos, teniendo una temperatura optima de crecimiento entre los 27°C y 30°C (Guerrero et al., 2021; Imhoff, 2005).

La virulencia de *P. carotovorum* se ve ligada a alguna de sus estructuras como el pili, el flagelo, las capas de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y las porinas. El polisacárido O de esta bacteria, está constituido por azúcares como la ramnosa, fucosa, glucosa y metilramnosa de manera general, sin embargo, cada serogrupo puede variar su composición química debido a su especificidad (Guerrero et al., 2021; Toth et al., 2006).

Annona muricata

Annona muricata es perteneciente a la familia Annonacea (Tabla 2) con origen en Centro América y que su cultivo se adapta a los climas tropicales por ello se extiende por todos los trópicos del mundo (Sanusi & Abu Bakar, 2018).

Tabla 2

Taxonomía de Annona muricata

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Genero	<i>Annona</i> L.
Especie	<i>Annona muricata</i> L.

Nota. Clasificación taxonómica según Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV)

Su descripción botánica es de un árbol caducifolio siempre verde, erecto de 3 a 10 m de altura, formando una copa de hojas obovadas y glabras, con un largo de 6 a 12 cm y de 2,5

a 5 cm de ancho. Las flores son solitarias y crecen a lo largo del tallo, formando el fruto conocido como guanábana en Perú y en otros países como graviola (Linneo, 1753).

La planta de *A. muricata* contiene diversos metabolitos secundarios, de los cuales se resalta la presencia de acetogeninas, alcaloides y flavonoides, por lo cual, todas las partes como fruto, semilla, hoja, tallo y raíz han sido utilizados en la medicina tradicional para combatir dolores de cabeza, infecciones urinarias como cistitis, cáncer, infecciones bacterianas y parasitarias (Moghadamtousi et al., 2015; Mutakin et al., 2022).

En las hojas se ha reportado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: terpenos como fitoesteroles, estigmasterol, arronol e ipuranol; dentro de los compuestos fenólicos se observa la presencia de rutina, ácido cafeico, ácido p-cumarico, leucoantocianidinas y taninos carcinogénicos; presencia de algunos alcaloides de tipo isoquinolínico como annomonicina, annomurina, annonafina, annonina, coclaurina, coreximina, reticulina y también alcaloides misceláneos como muricina, muricinina, estefarina, aterospermina, aterosperminina; por último la presencia de acetogeninas como Annomuricin A, Annomuricin B, Annomuricin E, Annomutacin, Bullatacin, Bullatacinone, Muricapentocin, Muricatocin A, Muricatocin C, Muricoreacin, Murihexocin C, Annomontacina y Muricatacina (Balvin & Tardeo, 2018; Borda & Mendoza, 2019; Llanque, 2016; Mio & Cunyarache, 2017).

Sensibilidad bacteriana

La sensibilidad bacteriana es la medición del enfrentamiento de una bacteria con un fármaco y sus concentraciones respectivas obteniendo resultados de si la bacteria es sensible, con sensibilidad media o resistente. Esta prueba se conoce también como antibiograma y se realiza de manera in vitro. Dentro de los métodos más utilizados esta la técnica de Kirby Bauer, dilución en agar, macro y micro dilución en caldo y el E test o prueba de Épsilon (Herrera, 1999).

III. METODO

3.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de enfoque cuantitativo y experimental. Es de tipo experimental porque se manipularon variables independientes (tipo y concentración del extracto etanólico de *Annona muricata*) para observar su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *Pectobacterium carotovorum*,

El carácter cuantitativo se da respecto a la prueba fotoquímica donde se realiza la cuantificación de los polifenoles a los extractos etanólicos.

Respecto a la dimensión temporal, el diseño es longitudinal. Se realizó una comparación a dos momentos específicos (inicial y a los seis meses), lo que permitió observar variaciones en la actividad inhibitoria de los extractos a lo largo del tiempo.

3.2 Ámbito temporal y espacial

Este proyecto se ejecutó entre los meses de abril a diciembre del 2024 en el “Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular” (LBBM-SL10LA105), El Agustino.

3.3 Variables

Variable Independiente:

Extractos etanólicos de hojas de *Annona muricata* a distintas concentraciones.

Variable Dependiente:

Inhibición bacteriana de *Pectobacterium carotovorum*.

3.4 Poblaciones y muestras

La población la conformaron las hojas de *Annona muricata* obtenidas de los jardines de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática y por el aislado de *Pectobacterium*

carotovorum, caracterizado por sus características microbiológicas y análisis de la secuencia de 16sRNA en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM).

La muestra de estudio estuvo comprendida por el cultivo bacteriano activo y por las diferentes diluciones de los extractos etanólicos de *Annona muricata*.

La unidad experimental correspondió a un enfrentamiento de una dilución del extracto etanólico de hojas de *A. muricata* frente a el cultivo de *P. carotovorum*.

3.5 Instrumentos

La colecta del material vegetal se hizo con la utilización de tijeras para desprender cuidadosamente las hojas, luego se procedió a lavar con agua estéril y solución desinfectante hecha con hipoclorito de sodio (Sapolio al 4%) llevándola a una concentración de 1.5%. Se utilizo papel toalla para la absorción de agua excedente y luego se realizó la esterilización de las hojas en cabina UV por 10 minutos. El secado se llevó a cabo en estufa (Memmert) a 45°C por 24 horas y luego trituración de estas con ayuda de una licuadora (Oster). Una vez obtenido el material en polvo, se calculó el peso en una balanza analítica (Adam/RS232, AE4382559, 2011) y se almaceno en frascos de vidrio previamente esterilizados en autoclave (Greetmed, YX-280D, 2015). Para la extracción alcohólica se utilizó etanol absoluto (J.T. Baker) y para evaporar el resto de etanol de las muestras se hizo uso del baño maría (Gemmyco, YCW-010E). Los datos de la masa de los extractos obtenidos por la balanza fueron reportados en un instrumento de análisis, usando una hoja de Excel para el cálculo de las diluciones.

Para el crecimiento bacteriano, se utilizó reactivos como Caldo de Triptona y Soja (TSB - Tryptic Soy Broth) y Agar Triptona-Soja (TSA - Trypto-Casein Soy Agar). También equipos, como balanza analítica (Adam/RS232, AE4382559, 2011), autoclave (Greetmed, YX-280D, 2015), agitador (Labnet International INC., PC-420D- 2017), refrigeradora (Bosch/541L, 2014) e incubadora (P Selecta, 2012), además de placas Petri estériles de vidrio y descartables,

frascos de dilución de boca ancha de 500 mL, probetas de 100 mL, tubos tapa rosca de 15 mL, mecheros, asas de siembra, espátula de Digralsky y cabina con UV.

Por último, para el enfrentamiento del extracto etanólico con las bacterias se hizo uso de discos elaborados a base de papel filtro Whatman N°1 de 6 mm de diámetro y la determinación de los halos de inhibición se realizó empleando una regla milimétrica reportando los datos en una hoja de Excel para el análisis.

3.6 Procedimientos

3.6.1 Muestra vegetal y extracto etanólico

Identificación taxonómica. Se recolecto como muestra una parte del tallo (rama) del ejemplar de donde se colecto las hojas, conteniendo partes de hoja, flor y fruto bien definidas y se llevó al Herbario San Marcos donde se realizó el servicio de Estudio Taxonómico y Determinación de Muestras Botánicas con su respectiva certificación.

Obtención y preparación de la muestra. Se recolecto 30 hojas frescas de *Annona muricata* en buen estado, que no presentaban marcas de daños por insectos o plagas. Se limpio del polvo y luego se procedió a lavarlas para quitar los restos que quedaban.

Para el proceso de desinfección se preparó hipoclorito de sodio al 1.5%, utilizando lejía que fue diluida en agua destilada para un total de 2L de la solución cubriendo totalmente las hojas y se dejó remojando por 15 minutos.

Por último, se enjuago con agua destilada hasta que quedaron sin residuo alguno y se escurrió sobre papel toalla hasta que se evaporo el agua excedente de la misma forma en que procedió Castro & Ayasta (2018). Una vez secas, fueron llevadas a la estufa a 45 °C por 24 horas (procedimiento de desecado), temperatura previamente estandarizada por (Díaz, 2019) para una mayor obtención de polifenoles. Cuando estuvieron secas las hojas, se procedió a triturarlas hasta que quedo un polvo homogéneo.

Preparación del extracto etanólico. La muestra triturada que fue obtenida en el procedimiento anterior se dividió en dos partes iguales y se colocó cada parte en un beaker. Se cubrió cada muestra con el doble de volumen de etanol al 70° y 90° preparado a partir de etanol absoluto. Se dejó macerando por cinco días homogenizando de manera diaria para que el etanol extraiga todos los metabolitos que se hallaban en la muestra.

Pasado el periodo de incubación, el alcohol del extracto se evaporó empleando un baño maría a 37°C, creándose una masa ligera que se resuspendió en etanol a 50° llegando a una concentración de 1g/mL, generándose los extractos crudos que fueron colocados en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

Como parte de otro trabajo de investigación realizado de manera simultánea en el laboratorio, se preparó un extracto etanólico a 90° de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), siguiendo exactamente el mismo procedimiento de obtención y bajo las mismas condiciones experimentales empleadas para *Annona muricata*. Dicho extracto fue almacenado a 4°C en conjunto con los extractos etanólicos de *A. muricata*, permaneciendo bajo las mismas condiciones de conservación durante todo el periodo de estudio.

Aunque este extracto no formaba parte de los objetivos iniciales del presente proyecto, su procesamiento y almacenamiento equivalentes permitieron considerarlo adecuadamente para su inclusión en los ensayos finales, con el fin de contar con un extracto vegetal comparativo.

Observación de esterilidad del extracto etanólico. Con el propósito de garantizar la esterilidad de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Anona*, ambos extractos pasaron por un proceso para verificar la inocuidad de los extractos para prevenir cualquier interferencia con el crecimiento bacteriano; para ello se colocó gotas de cada extracto crudo (70° y 90°) en una placa con agar nutritivo (TSA) y se dejó incubando por 24 horas de 27°C a 30°C con el objetivo de detectar cualquier indicio no deseado de crecimiento bacteriano o fúngico en las

muestras. Se realizó el mismo procedimiento seis meses después para corroborar el correcto almacenamiento de los extractos de *A. muricata* y para el extracto de clavo de olor.

Determinación cuantitativa de polifenoles totales en microplaca por el método de Folin-Ciocalteu. La evaluación del contenido de polifenoles totales se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gutiérrez-Román et al. (2023).

Inicialmente, se utilizó ácido gálico a 20 $\mu\text{g/mL}$ para la preparación de la curva estándar, sin embargo, se observó que los valores obtenidos fueron considerablemente bajos respecto a la muestra, por lo tanto, se procedió a realizar una nueva curva estándar a partir de 60 $\mu\text{g/mL}$ (0, 15, 30, 45 y 60 $\mu\text{g/mL}$). El ensayo se llevó a cabo en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano, y la lectura se realizó en el lector de microplacas a 750 nm, realizando cada medición por triplicado.

En cuanto a los extractos etanólicos, se realizó una modificación en el procedimiento de dilución. Originalmente se había planificado una dilución 1:20 del stock de cada extracto, sin embargo, debido a la alta concentración de pigmentos verdes que saturaban la lectura al espectrofotómetro, se modificó la dilución a una relación de 1:300 del stock original de 1 g/mL para cada extracto (70° y 90°), lo que permitió una lectura adecuada por el equipo y evitó posibles interferencias en los resultados. Esta evaluación se repitió a los seis meses posteriores a la obtención de los extractos, con el fin de analizar la estabilidad del contenido fenólico a lo largo del tiempo.

3.6.2 *Aislado bacteriano*

Obtención bacteriana. El aislado bacteriano se obtuvo a partir de un tubérculo de papa con signos de pudrición blanda, adquirido en el mercado de Tayacaja, en el distrito de El Agustino. Para el aislamiento, en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM), se eliminó la cubierta externa del tubérculo con una hoja de bisturí. En condiciones de esterilidad, se colocó una sección de la parte interna sobre una placa Petri, y se extrajo

aproximadamente 100 uL del tejido blando, los cuales se mezclaron con 500 uL de caldo de cultivo Tripticasa de soya (TSB). La muestra se sometió a agitación a 120 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente, se tomaron 100 uL de la suspensión y se sembró en una placa con agar nutritivo (TSA) la cual se incubaron a 28 °C durante 24 horas para aislar colonias únicas y pasar a un proceso de purificación con el objetivo de obtener una cepa pura (Nolasco-Cárdenas et al., 2025; Senasica, 2020).

Caracterización microbiológica. El aislado bacteriano se evaluó mediante la tinción Gram, la actividad pectinolítica y actividad de oxidasas.

Caracterización molecular. El aislado bacteriano fue sometido a un análisis molecular para confirmar su identidad, mediante el secuenciamiento del gen 16S rRNA. La bacteria fue cultivada en medio TSA mediante la técnica de estriado por agotamiento para obtener colonias aisladas. Luego de 24 h de incubación, se seleccionó una colonia para la extracción de ADN mediante shock térmico. Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR utilizando primers universales 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') que amplifican casi la totalidad del gen 16S rRNA. La obtención del producto amplificado se confirmó al observar la banda de amplificación en un gel de agarosa 1%, el producto fue purificado y enviado a la empresa Macrogen para que realicen el servicio de secuenciación por el método de Sanger (Maisuria & Nerurkar, 2013). Para obtener la secuencia completa del producto obtenido del gen 16S rRNA, con una longitud aproximada de 1492 pb, se ordenaron realizar tres lecturas del producto de PCR utilizando cebadores universales internos. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y ensambladas mediante el software bioinformático MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>). Posteriormente, las secuencias consenso de cada producto fueron analizadas por similitud utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico de nucleótidos (BLAST),

accesible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a través de www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

Activación del aislado bacteriano. Se sembró una placa de *Pectobacterium carotovorum* a partir de una alícuota de la bacteria previamente aislada, para observar que esta no se haya contaminada con otras bacterias en el proceso de conservación. Se obtuvo un crecimiento bacteriano puro y se aisló una colonia única la cual se dejó crecer por 24h en caldo nutritivo (TSB) para activarla. Pasado este tiempo, del caldo con el crecimiento bacteriano se repico en otro tubo con caldo nutritivo y se dejó creciendo por dos horas obteniendo las bacterias en un aproximado de crecimiento de 10^8 UFC/mL.

3.6.3 *Enfrentamiento del extracto etanólico con la bacteria*

Método de Kirby Bauer o difusión en agar. Se prepararon diluciones seriadas de los extractos etanólicos a 70° y 90° obteniendo concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL y 62.5 mg/mL de cada extracto.

Una vez que la bacteria creció en caldo nutritivo, una alícuota de 100 uL se inoculó en la superficie de la placa de agar mediante la técnica de siembra en césped, utilizando una espátula de Drigalsky para distribuir homogéneamente la suspensión bacteriana. Posteriormente, se colocaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, que previamente fueron embebidos con 20 uL de cada una de las soluciones de los extractos de *A. muricata*. Como control positivo, se utilizaron discos de antibiograma con Ciprofloxacino (5µg), mientras que discos embebidos en 20 uL de etanol a 50° fueron usados como control negativo, Las placas se incubaron a una temperatura de 27°C por 24 horas, tras lo cual se midieron los halos de inhibición para determinar la actividad antibacteriana de cada extracto, reportándose el diámetro de la inhibición en milímetros (mm) incluyendo el diámetro del papel filtro.

Transcurridos seis meses, se seleccionaron las concentraciones y grados de etanol con mayor actividad inhibitoria para realizar un segundo ensayo con 10 repeticiones, evaluando la

persistencia de la actividad antibacteriana a lo largo del tiempo. En este ensayo, se mantuvo el control negativo con etanol al 50°; sin embargo, el Ciprofloxacino fue reemplazado por un extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) a una concentración de 500 mg/mL en etanol al 90°, utilizado como control positivo vegetal, dado que había sido preparado y conservado bajo las mismas condiciones que el extracto etanólico de *A. muricata*.

3.7 Análisis de datos

Debido a los resultados obtenidos, no fue posible aplicar un análisis estadístico inferencial para aprobar o rechazar la hipótesis. En su lugar, se optó por un análisis observacional basado en la presencia o ausencia de halos de inhibición en los distintos tratamientos evaluados.

Inicialmente, se planteó clasificar los diámetros de inhibición según los criterios de sensibilidad, intermedio o resistencia en comparación con el control positivo (Ciprofloxacino). Sin embargo, esta estrategia fue descartada al considerar las diferencias sustanciales entre los mecanismos de acción de un antibiótico de amplio espectro y un extracto vegetal. En su lugar, se consideró más apropiado emplear como control un extracto de clavo de olor, preparado bajo las mismas condiciones experimentales que el extracto de *Annona muricata*.

Por tanto, la hipótesis se define de forma descriptiva y cualitativa: la hipótesis es aceptada si el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* muestra una inhibición visible y reproducible del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* en comparación con el control negativo, y es rechazada si no se observa ningún efecto antibacteriano evidente bajo las condiciones experimentales evaluadas.

3.8 Consideraciones éticas

Las actividades de investigación se desarrollaron manteniendo las normas de conducta responsable de investigación.

El proyecto no empleo muestras de personas y/o de origen animal para la realización de las actividades. Para la investigación, se utilizó un aislado bacteriano obtenido de papa con síntomas de pudrición blanda en el LIBBM, adicionalmente, se utilizaron hojas de guanábana que fueron extraídas cuidadosamente sin generar daño alguno a la planta.

IV. RESULTADOS

4.1 Muestra vegetal y extracto etanólico

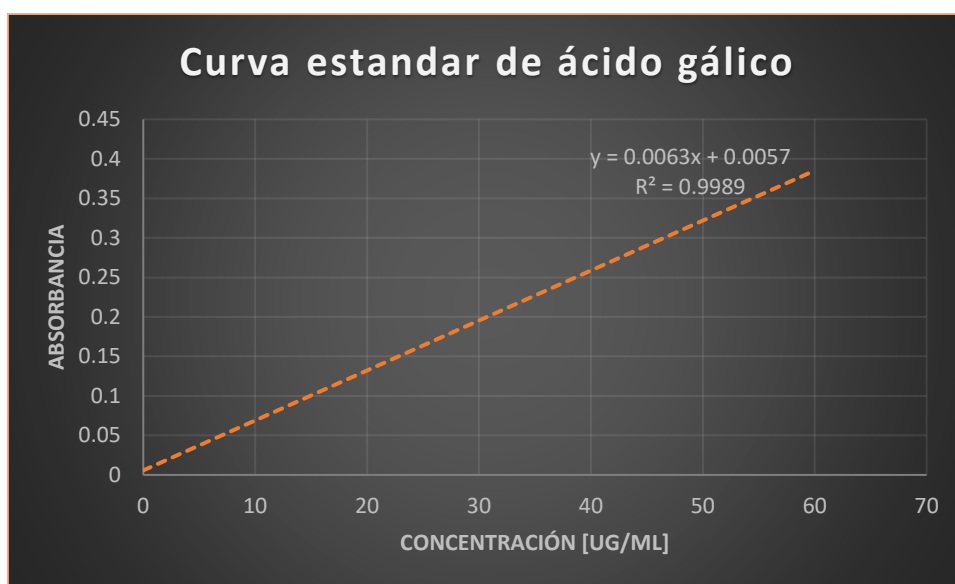
La muestra vegetal utilizada (hojas) se obtuvieron de una planta del cual se obtuvo una muestra floral que fue determinada como *Annona muricata* por el Herbario San Marcos, como se muestra en el certificado del estudio taxonómico (Anexo 1).

El extracto etanólico obtenido de las hojas según lo descrito en la metodología, paso la prueba de esterilidad al no haber presentado ningún crecimiento de bacterias u hongos en la placa sembrada tras 24 y 48 horas de incubación.

En la determinación cuantitativa de polifenoles totales, la curva estándar de ácido gálico mostro un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9989 (Figura 1).

Figura 1

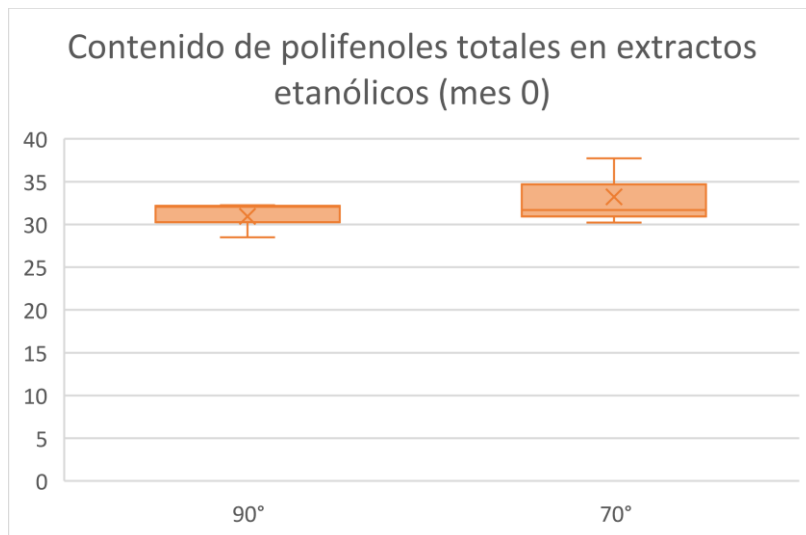
Curva estándar de ácido gálico



El extracto etanólico a 70°, dio como resultado un contenido de polifenoles totales de 33.205 ± 3.987 mg equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra (mg EAG/mL), mientras que en el extracto etanólico a 90° el contenido fue de 30.935 ± 2.119 mg EAG/mL (Figura 2).

Figura 2

Contenido de polifenoles totales según el grado de etanol en extractos de *Annona muricata* (mes 0)



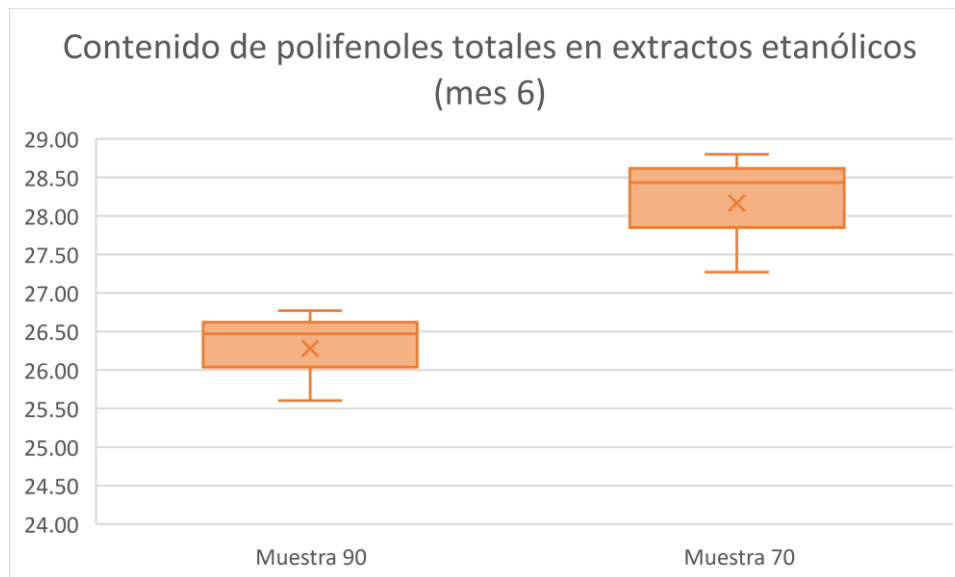
Nota. Representación en gráfico de caja y bigotes del contenido de polifenoles totales (mg EAG/mL) obtenidas mediante el método de Folin-Ciocalteu. Cada caja representa la distribución de las repeticiones individuales para cada tratamiento.

Seis meses después de la primera medición, se volvió a cuantificar el contenido de polifenoles totales en los extractos etanólicos de *Annona muricata* a 70° y 90°. Para esta evaluación, se elaboró una nueva curva estándar de ácido gálico, obteniéndose un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9987, valor muy similar al registrado inicialmente, lo que permitió una comparación confiable entre ambos ensayos.

En el extracto etanólico a 70°, el contenido de polifenoles totales obtenido a los seis meses fue de 28.170 ± 0.801 mg EAG/mL, mientras que el extracto a 90° presentó un contenido de 26.281 ± 0.606 mg EAG/mL (Figura 3).

Figura 3

Contenido de polifenoles totales según el grado de etanol en extractos de *Annona muricata* (mes 6)

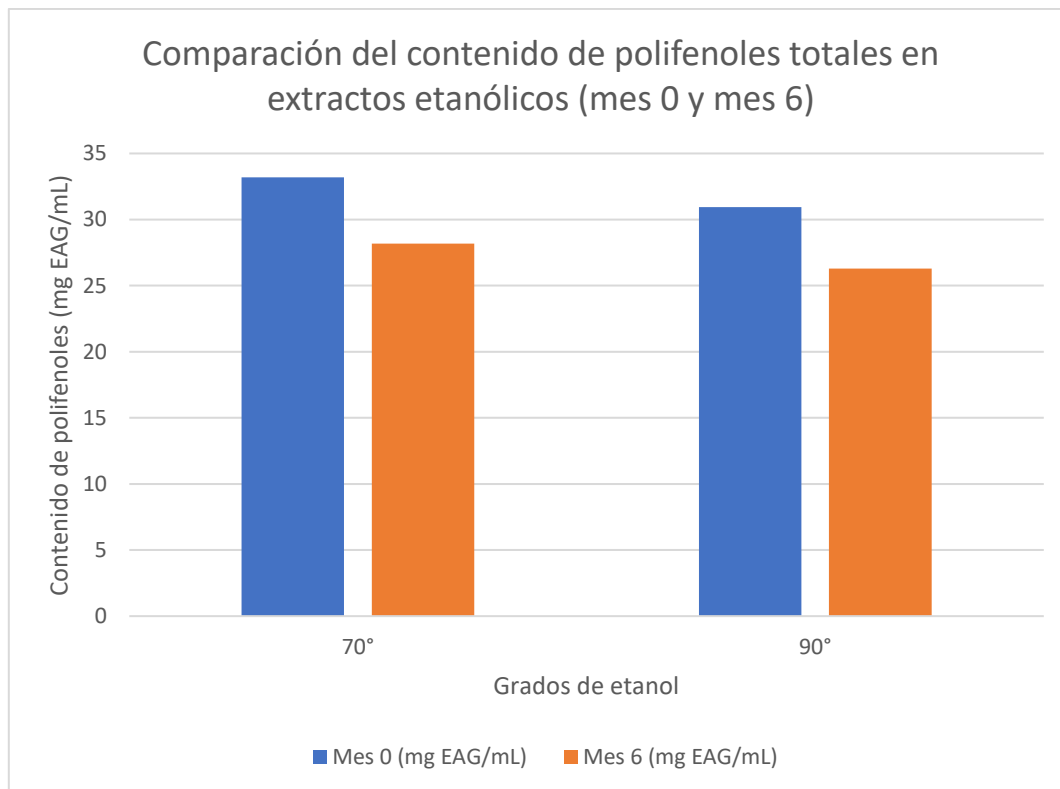


Nota. Representación en gráfico de caja y bigotes del contenido de polifenoles totales (mg EAG/mL) obtenidas por el método de Folin-Ciocalteu, seis meses después de su obtención. Cada caja representa la distribución de las repeticiones individuales para cada tratamiento.

Se compararon los valores obtenidos inicialmente (mes 0) con aquellos registrados a los seis meses, observándose una disminución en el contenido de polifenoles totales en ambos extractos etanólicos de *Annona muricata*. Esta variación se observa en la Figura 4.

Figura 4

Contenido de polifenoles totales (mg EAG/mL) en extractos etanólicos de 70° y 90°, evaluados al mes 0 y tras seis meses de almacenamiento



4.2 Aislado bacteriano

El aislado bacteriano empleado en este estudio se identificó como bacteria gramnegativa mediante la tinción de Gram y resultó negativo en la prueba de oxidasa. Estas características coinciden con las descritas en la literatura para enterobacterias fitopatógenas, como *Pectobacterium* spp. (Czajkowski et al., 2011; Luna-Rodríguez et al., 2009).

El aislado bacteriano mostro crecimiento en agar cristal violeta pectato (CVPM); sin embargo, no generó la formación de cavidades. La actividad pectinolítica es una característica distintiva de *Pectobacterium*; sin embargo, esta puede variar dentro de la especie y, en algunos casos, no manifestarse (Czajkowski et al., 2015).

El análisis de secuenciación del producto de amplificación del gen 16S rRNA del aislado bacteriano permitió obtener 1046 pares de bases que encontraron similitud al 100 % con una secuencia reportada para *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum strain* Ka10 en el GENBANK (secuencia parcial, acceso: JF460763.1).

4.3 Enfrentamiento del extracto etanólico con la bacteria

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Annona muricata* obtenidos con etanol a 70° y 90°, en concentraciones de 1000 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL y 62.5 mg/mL. Cada tratamiento se probó en 5 repeticiones.

Para los extractos obtenidos con etanol a 70°, la concentración de 500 mg/mL y 250 mg/mL mostraron una ligera inhibición en cada ensayo. En el resto de las concentraciones no se observó inhibición bacteriana (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3

Diámetro de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de hojas de Annona muricata a 70° frente a Pectobacterium carotovorum

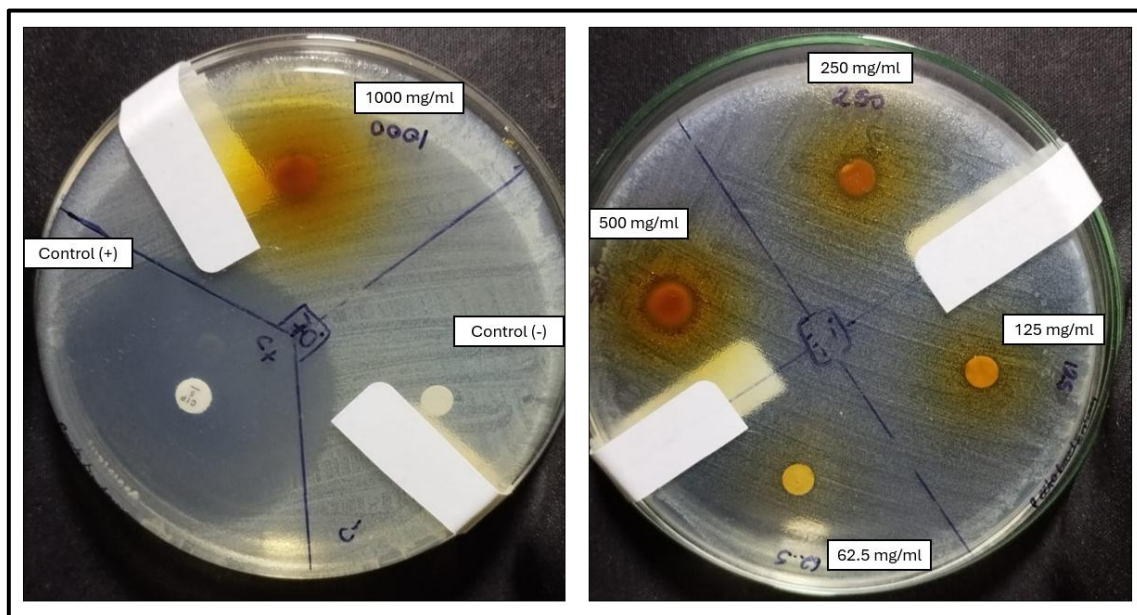
Concentración [mg/mL]	Repetición 1 (diámetro en mm*)	Repetición 2 (diámetro en mm)	Repetición 3 (diámetro en mm)	Repetición 4 (diámetro en mm)	Repetición 5 (diámetro en mm)
1000	0	0	0	0	0
500	11	12.5	0	0	0
250	9	9	0	0	0
125	0	0	0	0	0
62.5	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0
Control positivo	50	49	44	48	50

*La distancia obtenida considera el diámetro total del halo, incluyendo el disco impregnado.

Esta forma de medición se emplea de acuerdo con los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Figura 5

Difusión en agar (método de Kirby-Bauer) para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de Annona muricata a 70°C frente a Pectobacterium carotovorum (mes 0)



Nota. Las placas muestran halos de inhibición generados por diferentes concentraciones del extracto etanólico. El control positivo (Ciprofloxacino) y el control negativo están indicados en la imagen

Por otro lado, los extractos obtenidos con etanol a 90° mostraron que la concentración de 500 mg/mL produjo halos de inhibición, mientras que en las demás concentraciones no se evidenció inhibición del crecimiento bacteriano (Tabla 4, Figura 6).

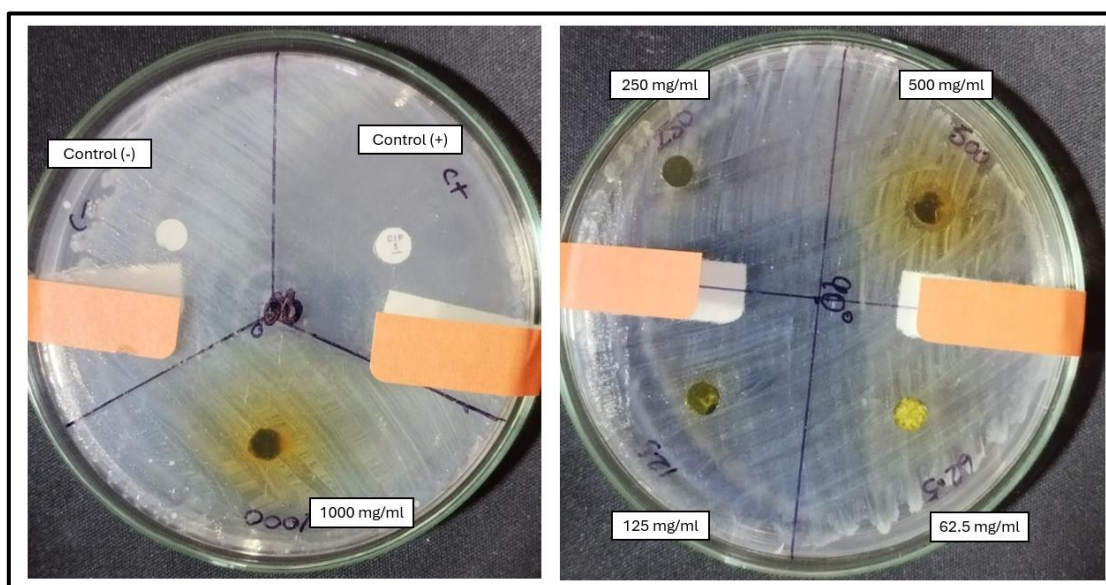
Tabla 4

Diámetro de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de hojas de Annona muricata a 90° frente a Pectobacterium carotovorum

Concentración mg/mL	Repetición 1 (diámetro en mm)	Repetición 2 (diámetro en mm)	Repetición 3 (diámetro en mm)	Repetición 4 (diámetro en mm)	Repetición 5 (diámetro en mm)
1000	0	0	0	0	0
500	8	9	12	10	8
250	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0
62.5	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0
Control positivo	54	47	46	47	57

Figura 6

Difusión en agar (método de Kirby-Bauer) para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de Annona muricata a 90°C frente a Pectobacterium carotovorum (mes 0)

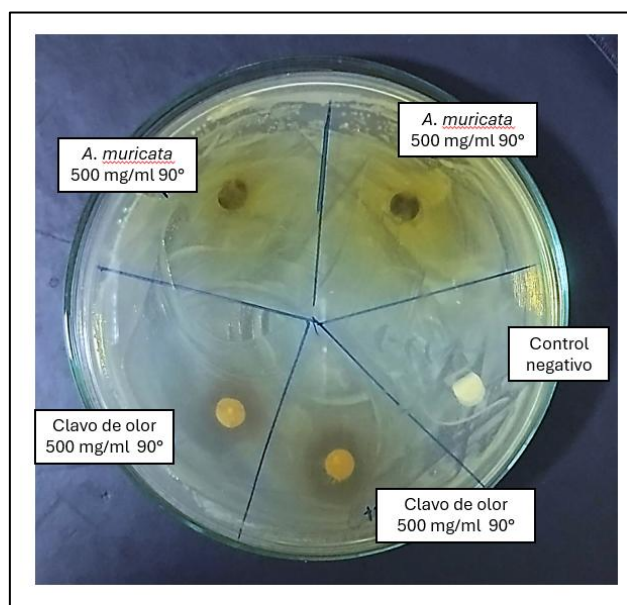


Nota. Las placas muestran halos de inhibición generados por diferentes concentraciones del extracto etanólico. El control positivo (Ciprofloxacino 5 µg) y el control negativo están indicados en la imagen.

Habiendo obtenido mayor actividad en el extracto etanólico de 90° a una concentración de 500 mg/mL, seis meses después se realizó un nuevo enfrentamiento de este extracto frente a *P. carotovorum*, realizando 10 repeticiones que se evaluaron junto con un extracto etanólico de clavo de olor a 500 mg/mL con etanol a 90°, el cual se empleó como control positivo de extracto vegetal. En este ensayo, no se observó inhibición del crecimiento bacteriano en ninguna de los discos tratados con *A. muricata*, mientras que el control positivo mostró halos de inhibición en todas las repeticiones de diámetros entre 15 mm a 20 mm (Figura 7).

Figura 7

Actividad antibacteriana del extracto etanólico de Annona muricata a 90°C en la concentración de 500 mg/mL frente a Pectobacterium carotovorum mediante difusión en agar (mes 6)



Nota. La imagen muestra el ensayo de difusión en agar (método de Kirby-Bauer) con el extracto etanólico de *Annona muricata* (500 mg/mL, 90°C) y clavo de olor (500 mg/mL, 90°C) frente a *Pectobacterium carotovorum*. El control negativo no presenta inhibición, mientras que el control positivo (clavo de olor) exhibe halos de inhibición. No se observó actividad antimicrobiana por parte del extracto de *A. muricata* en ninguna de las repeticiones.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados en la primera evaluación a los cero meses mostraron una aparente actividad antibacteriana del extracto etanólico de *A. muricata* obtenido a 90° y a una concentración de 500 mg/mL. No obstante, al realizar una segunda evaluación seis meses después, bajo las mismas condiciones y con el empleo de un control positivo vegetal —un extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* (90°, 500 mg/mL), seleccionado por su conocida actividad antimicrobiana en extractos vegetales (Bhat et al., 2017)—, no se observó inhibición del crecimiento bacteriano por parte del extracto de *A. muricata*. Adicionalmente este extracto no reporto inhibición bacteriana para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, una cepa de referencia ampliamente utilizada en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y reconocida como sensible en diversos antibiogramas. Sin embargo, este resultado no es comparable con lo reportado por Llanque (2016), quien empleó la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 utilizada también para diversas pruebas antimicrobianas; por lo que podríamos argumentar que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Annona muricata* obtenido no es reproducible, probablemente por las condiciones de extracción empleadas o por las condiciones del cultivo vegetal utilizado.

La eficacia del efecto antibacteriano de una planta depende significativamente de factores como la concentración del extracto, el grado de etanol utilizado, las características intrínsecas de la bacteria y las características de la planta en su momento de recolección, como la edad de la planta, ubicación de crecimiento, tipo de tierra, la estación del año, la observación de daño por patógenos o el uso de plaguicidas, etc. (Ríos & Recio, 2005).

Respecto al primer ensayo, los extractos obtenidos con etanol al 90° mostraron halos de inhibición más consistentes, especialmente a 500 mg/mL, mientras que las concentraciones más bajas y los extractos con etanol al 70° tuvieron una actividad inhibitoria menor a 500

mg/mL, lo cual es consistente con los estudios de Moghadamtousi et al. (2015), Llanque (2016) y Castillo-Ruiz & Cruz-Castillo (2019), que señalan cómo la polaridad del solvente afecta la extracción de metabolitos bioactivos, tales como acetogeninas y flavonoides, presentes en las hojas de *A. muricata*., además de que la actividad antimicrobiana es mayor en extractos con solventes más concentrados, debido a que los metabolitos secundarios tienen un umbral de concentración mínima para ser efectivos. En este sentido, Hernandez-Fuentes et al. (2024) realizaron un análisis comparativo de infusiones y extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* de diferentes regiones de Colima, México, encontrando que las infusiones presentaron una mayor capacidad antioxidante y un contenido más alto de polifenoles totales en comparación con los extractos etanólicos. Esto reafirma que el método de extracción y las condiciones geográficas influyen significativamente en la composición y actividad de los bioactivos de los extractos.

Además, Sepúlveda y Zapata (2019) estudiaron el efecto del pH, de la temperatura y el contenido en sólidos sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del extracto de *Bixa orellana L.*, observando que los fenoles totales se degradan siguiendo una cinética de primer orden y que la actividad antioxidante se ve afectada por la temperatura de almacenamiento. Estos hallazgos son relevantes, ya que, aunque los extractos se almacenaron a 4 °C, se evidenció una disminución en el contenido de polifenoles totales después de seis meses, lo que podría significar que no solo los polifenoles se degradan, si no también otros metabolitos secundarios, pudiendo influir en la pérdida de actividad antibacteriana.

Por último, el uso de etanol al 50° como control negativo confirma que la actividad antibacteriana observada en el ensayo preliminar no se debía al solvente, sino a la presencia de metabolitos en los extractos. La variabilidad observada entre ensayo inicial como en el ensayo a los seis meses, donde no se observó actividad alguna, resalta la necesidad de un análisis fitoquímico detallado para determinar la estabilidad, concentración y naturaleza de los

metabolitos presentes en los extractos, utilizando técnicas avanzadas como GC-MS o HPLC. Sin embargo, estos análisis requieren una inversión adicional en equipamiento y financiamiento, lo que representa una limitación en el presente estudio.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se rechaza la hipótesis nula (H_0), ya que se evidenció actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Annona muricata* frente a *Pectobacterium carotovorum* en la concentración de 500 mg/mL del extracto a 90°.
- ✓ El análisis del gen 16S rRNA confirmó que el aislado bacteriano empleado corresponde a *Pectobacterium carotovorum*, validando su uso como cepa experimental para la evaluación de los extractos etanólicos.
- ✓ El extracto etanólico obtenido a 90° presentó actividad inhibitoria únicamente a la concentración de 500 mg/mL al momento de su preparación, mientras que el extracto a 70° no mostró una actividad reproducible.
- ✓ Luego de seis meses de almacenamiento, ninguno de los extractos etanólicos evaluados mostró capacidad de inhibir el crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*, lo que sugiere una pérdida de actividad antibacteriana posiblemente asociada a la degradación de metabolitos bioactivos o a cambios en su composición química.
- ✓ Adicionalmente, se estandarizó el procedimiento de obtención de extractos etanólicos en el laboratorio, permitiendo obtener dos tipos de extractos etanólico (70° y 90°) de hojas de *A. muricata* y de *Syzygium aromaticum* utilizado como control positivo del extracto etanólico vegetal.

VII. RECOMENDACIONES

✓ Se recomienda realizar un análisis fitoquímico exhaustivo para caracterizar y determinar la cantidad de los metabolitos obtenidos en los extractos de *A. muricata*, utilizando técnicas como HPLC o GC-MS. Esto permitirá determinar si la variabilidad observada entre el ensayo inicial y el realizado a los seis meses se debe a diferencias en la composición química, degradación de metabolitos o interacciones no evaluadas en este estudio.

✓ Asimismo, se sugiere investigar las interacciones entre los metabolitos de *A. muricata* y los mecanismos de resistencia de *P. carotovorum*, a través de estudios complementarios como microscopía electrónica para evaluar posibles alteraciones en la estructura bacteriana. Adicionalmente, el uso de qRT-PCR permitiría cuantificar la carga bacteriana tras la exposición a los extractos y analizar la expresión de genes involucrados en patogenicidad, resistencia o adaptación bacteriana, lo que podría ayudar a comprender por qué no se observó inhibición en el ensayo definitivo.

✓ Finalmente, se recomienda evaluar la estabilidad de los metabolitos bioactivos en función de factores como temperatura, tiempo de almacenamiento y condiciones de extracción, con el fin de optimizar los protocolos de obtención de extractos y evitar la posible degradación de compuestos con potencial actividad antimicrobiana.

VIII. REFERENCIAS

- Acuña, I. (2021). *Cómo evitar la expresión del pie negro y las pudriciones blandas de la papa*. Instituto de Investigaciones Agropecuaria. Centro Regional de Investigación Remehue. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/68302>
- Aguilar, R., Ruiz, W. R., Morales, A., Rafael, R., Tirado, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., Teodor, K. K., Aguilar-Ancota, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., & Teodor, K. K. (2021). Pudrición blanda en el pseudotallo de banano orgánico (*Musa* sp): Sintomatología, caracterización cultural y bioquímica, patogenicidad y alternativas de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 571–578. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.061>
- Aizawa, S.-I. (2014). Chapter 18—*Pectobacterium carotovorum*—Subpolar Hyper-Flagellation. En S.-I. Aizawa (Ed.), *The Flagellar World* (pp. 58–59). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00018-9>
- Al-Mijalli, S. H. S. (2014). Isolation and characterization of plant and human pathogenic bacteria from green pepper (*Capsicum annum* L.) in Riyadh, Saudi Arabia. *3 Biotech*, 4(4), 337–344. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0136-2>
- Balvin, Y., & Tardeo, Y. (2018). *Efecto cicatrizante del gel a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de Annona muricata (Guanábana) en ratas albinas*. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- Bhat, K., S., V., Bhat, N., & Wani, T. (2017). Bioactivity of Various Ethanolic Plant Extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* Causing Soft Rot of Potato Tubers. *Indian Phytopathology*, 70. <https://doi.org/10.24838/ip.2017.v70.i4.76990>

- Borda, M., & Mendoza, I. (2019). *Determinación químico-bromatológica, fitoquímica y actividad antioxidantes de las semillas de Annona muricata (Guanábana) que crece en Grocio Prado-Chincha*. Universidad Nacional San Luis Gonzaga.
- Callo-Condori, J., & Farfán-Barrientos, K. E. (2011). Evaluación de la actividad insecticida In Vitro sobre larvas de *Aedes aegypti* (vector de la fiebre amarilla y dengue) y determinación del efecto antibacteriano frente a cepas de *Salmonella typhi* spp. De las acetogeninas obtenidas a partir de extractos etanólicos de semillas de *Annona muricata* L. (masasamba). *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/1064>
- Castillo-Ruiz, M. del C., & Cruz-Castillo, S. J. (2019). Efecto in vitro del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* sobre crecimiento de *Shigella boydii* ATCC 9207. *Universidad Nacional de Trujillo*.
<https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2697822>
- Castro, C., & Ayasta, J. (2018). *Suceptibilidad de cepas de Staphylococcus aureus, Streptococcus Beta Hemolítico y Escherichia coli frente al extracto etanólico de hojas de Annona muricata "Guanábana"*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Charkowski, A. O. (2018). The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906>
- Charkowski, A. O., Lind, J., & Rubio-Salazar, I. (2014). Genomics of Plant-Associated Bacteria: The Soft Rot Enterobacteriaceae. En D. C. Gross, A. Lichens-Park, & C. Kole (Eds.), *Genomics of Plant-Associated Bacteria* (pp. 37–58). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-55378-3_2

- Corzo, M., & Quiñones, M. L. (2017). Identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de aislados bacterianos asociados a la pudrición blanda y pierna negra en papa. *Revista de Protección Vegetal*, 32(3), 00–00.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522017000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Cubero-Agüero, D. (2019). *Diversidad de bacterias fitopatógenas, agentes causales de pudrición blanda en hortalizas de la zona de Cartago y Alajuela, Costa Rica*. [Thesis]. Universidad de Costa Rica.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. c. m., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J. m., & Sledz, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: A review. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 18–38. <https://doi.org/10.1111/aab.12166>
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
- Davidsson, P., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00191>
- Díaz, X. (2019). *Efecto de tres niveles de temperaturas de secado en la actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales presentes en hojas de guanábana (Annona muricata), Pucallpa, Perú* [Thesis]. Universidad Nacional de Ucayali.
- Escalona, Y., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., & Rincón Numpaque, N. (2019). Prevalencia de patógenos bacterianos en cultivos hortícolas a cielo abierto del municipio Jiménez,

Estado Lara y evaluación de control alternativo mediante uso de extracto etanólico de *Lippia origanoides*. *Revista de la Universidad del Zulia*, 10(26), 58–81.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8809706>

Guerrero, A. P. A., Pineda, M. E. B., & Vargas, N. C. A. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: Agente fitopatógono causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(2), Article 2.

https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710

Gutiérrez-Román, A. I. F., Cruz-Carpio, C. M. S., Velarde-Vilchez, M., & Nolasco-Cárdenas, O. (2023). Capacidad antioxidante de la pulpa de *Vasconcellea candicans* “Mito”.

BIOTEMPO, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v20i2.5872>

Hernandez-Fuentes, G. A., Delgado-Enciso, O. G., Larios-Cedeño, E. G., Sánchez-Galindo, J. M., Ceballos-Magaña, S. G., Pineda-Urbina, K., Alcalá-Pérez, M. A., Magaña-Vergara, N. E., Delgado-Enciso, J., Díaz-Llerenas, U., Diaz-Martinez, J., Garza-Veloz, I., Martinez-Fierro, M. L., Rodriguez-Sanchez, I. P., & Delgado-Enciso, I. (2024). Comparative Analysis of Infusions and Ethanolic Extracts of *Annona muricata* Leaves from Colima, Mexico: Phytochemical Profile and Antioxidant Activity. *Life*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/life14121702>

Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33–41. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1017-85461999000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Imhoff, J. F. (2005). “Enterobacteriales”. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, P. De Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, & K.-H. Schleifer (Eds.), *Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The*

Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria (pp. 587–850). Springer US.

https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_13

Kunstmann, J. P., Ciampi, L., Böhm, L., Barrera, S., & Collado, L. (2006). Determinación de Especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como Agentes Causales de Pudrición Blanda en Cala (*Zantedeschia* spp.). *Agricultura Técnica*, 66(3), 247–255.

<https://doi.org/10.4067/S0365-28072006000300003>

León, A., Arteaga, R., Zepeda, L., Martínez, L., Gutiérrez, P., & Montalvo, E. (2019). Efecto antibacterial, antifúngico, citotóxico y antioxidante de extractos de pulpa de guanábana. *Revista Bio Ciencias*, 6, 17 pág-17 pág.

<https://doi.org/10.15741/revbio.06.e400>

Linneo, C. (1753). *Annona muricata*. En *Species Plantarum 1* (pp. 536–537).

Llanque, D. S. (2016). *Actividad antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de las semillas de Guanábana Annona Muricata L.* [Universidad Alas Peruanas].

<https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/4067>

Luna-Rodríguez, M., Toledo-González, A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2009). Identificación de Enterobacterias Causantes de Pudriciones Blandas en Cucurbita pepo L. en Veracruz, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 64–68.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-33092009000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Maisuria, V. B., & Nerurkar, A. S. (2013). Characterization and differentiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 87–102. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0140-0>

- Mio, V., & Cunyarache, D. (2017). *Formulación y caracterización de un filtrante a partir de las hojas de guanábana (Annona muricata L.)*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms160715625>
- Mutakin, M., Fauziati, R., Fadhilah, F. N., Zuhrotun, A., Amalia, R., & Hadisaputri, Y. E. (2022). *Pharmacological Activities of Soursop (Annona muricata Lin.)*. *Molecules*, 27(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules27041201>
- Nghondzweni, T., Gouws-Meyer, R., & Slabbert, R. (2018). *Efficacy of selected postharvest agrochemicals in reducing potato tuber soft rot caused by Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum in storage*. *Acta Horticulturae* 1269, 1, 67–74. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1269.9>
- Nolasco-Cárdenas, O., Andia-Gonzalez, M. C., Murrugarra-Bringas, Y., Velarde-Vílchez, M., & Gutiérrez-Román, A. I. F. (2025). *Identificación de Pectobacterium Waldee 1942 aislado de un tubérculo de papa con síntomas de pudrición blanda*. *BIOTEMPO*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v22i1.7298>
- Ortiz, G., & Campos, S. (2018). *Propiedades curativas de las hojas de guanábana (Annona muricata) y su impacto potencial fármaco-industrial*. *RD-ICUAP*.
- Ortiz-Pérez, E., Bocanegra-García, V., Mendoza-Herrera, A., & Cruz Hernández, M. (2019). *Identification of bacterial strains tolerant to pesticides from agricultural soils*. *Mexican journal of biotechnology*, 4, 57–66. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.3.57>

Pectobacterium carotovorum (ERWICA). (2002). Base de datos mundial de la EPPO.

<https://gd.eppo.int/taxon/ERWICA>

Pérez, W., & Forbes, G. (2011). *Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina*. International Potato Center.

Podredumbre blanda bacteriana. (2023). [BAYER]. Vegetables España.

<https://www.vegetables.bayer.com/es/es-es/recursos/disease-guides/brasicas/tobamoviruses-2-2.html>

Ramírez-Reyes, T., Flores-Estévez, N., Luna-Rodríguez, M., Noa-Carrazana, J. C., Sánchez-Velásquez, L. R., & Trigos-Landa, Á. (2015). Extractos crudos de *Magnolia schiedeana* Schltld. Para el control de bacterias fitopatógenas. *Madera y bosques*, 21(2), 159–164.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-04712015000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

Sanusi, S. B., & Abu Bakar, M. F. (2018). Soursop—*Annona muricata*. En *Exotic Fruits* (pp. 391–395). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00053-8>

Senasica. (2020). *Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad*. Versión 1.0.

Sepúlveda, C. T., Zapata, J. E., Sepúlveda, C. T., & Zapata, J. E. (2019). Efecto de la Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de *Bixa orellana* L. *Información tecnológica*, 30(5), 57–66. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000500057>

Toth, I. K., Pritchard, L., & Birch, P. R. J. (2006). Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, *44*, 305–336.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143444>

ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



“Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho”

CONSTANCIA N° 207-USM-MHN-2024

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

La muestra vegetal (fértil) recibida de **Maria Claudia Milagros Andia Gonzales**, Tesista de la Universidad Nacional Federico Villarreal ha sido estudiada y clasificada como: *Annona muricata* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Magnoliales Bromhead

FAMILIA : Annonaceae Juss.

GÉNERO : *Annona* L.

ESPECIE : *Annona muricata* L.

Nombre vulgar: “Guanabana”

Procedencia: Rimac, Lima, Perú

Determinado por: Bach. Julio Torres.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 25 de julio de 2024

Dra. Joaquina Albán Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)