



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de mango *Mangífera indica* L. y tamarindo *Tamarindus indica* L.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Castillo Rivas, Andrea Isabel

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Edgar Santiago Ojeda Riascos.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de mango (*Mangífera indica* L.) y tamarindo (*Tamarindus indica* L.) realizado por Andrea Isabel Castillo Rivas, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero del 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Castillo Rivas Andrea Isabel declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: Actividad antimicrobiana de extractos de subproductos de mango (*Mangífera indica* L.) y tamarindo (*Tamarindus indica* L.), de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Mgtr. Edgar Santiago Ojeda Riascos director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Autora: Castillo Rivas Andrea Isabel

Cédula: 1105655623

DEDICATORIA

A Dios, por bendecirme con el regalo de la vida y guiarme en esta etapa profesional.

Con inmenso amor y gratitud le dedico a mi abuelita Marianita Vera quien me cuida desde la eternidad y le agradezco por todos sus consejos.

Con mucho respeto y amor a mis padres, José Castillo y Dolores Rivas, por su confianza depositada en mí, por invertir todos sus esfuerzos y su tiempo en mi formación humana y espiritual, por haberme enseñado que se requiere de perseverancia y disciplina para la realización de mis sueños, como este, por brindarme comprensión y amor incondicional todos los días, y darme la posibilidad de ser lo que soy hoy.

A mis hermanos Diego, José y Juan Pablo, por su cariño y apoyo constante en el trayecto de mi carrera universitaria, quienes han sido mi motor para seguir.

A mis compañeros y amigos por regalarme una palabra de aliento o simplemente brindarme momentos que quedaran guardados en mi corazón, estos años de estudio han sido una etapa gratificante de amistades para toda la vida.

AGRADECIMIENTO

A lo largo de mi vida le agradezco a Dios, y a la intercesora Virgencita del Cisne por haberme dado la oportunidad de vivir, por la guía, y bendecirme en cada pequeño paso que doy que a la vez es gigante y por permitirme cumplir una etapa profesional en mi vida muy importante.

Debo agradecer a la Universidad Técnica Particular de Loja, honorable institución que me abrió las puertas y me permitió formarme académicamente para ser profesional, a la Titulación de Bioquímica y Farmacia y a mis maestros quienes me han brindado sus conocimientos o brindarme un consejo cuando más lo he necesitado.

A mis padres, por haberme brindado comprensión, sacrificio y amor incondicional todos los días por siempre haberme apoyado, y me dieron la posibilidad de ser lo que soy hoy.

A Mgtr. Edgar Ojeda, Mgtr. Luis Cartuche y Mgtr. Maritza Castillo, quienes han sabido compartir sus conocimientos para llevar a cabo este proyecto de la mejor manera, gracias también por su paciencia, orientación y confianza.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1. Mango.....	6
1.2. Tamarindo.....	7
1.3. Extracción de compuestos (sólido-líquido).....	9
1.4. Conservantes alimentarios sintéticos.....	9
1.5. Metabolitos secundarios	10
1.6. Compuestos fenólicos.....	11
1.6.1. Flavonoides.	12
1.7. Actividad antimicrobiana	13
1.7.1. Generalidades.	13
1.7.2. Métodos de evaluación antimicrobiana.....	13
1.7.2.1. Método de difusión en agar.....	13
1.7.2.2. Método de microdilución en caldo.....	14
1.8. Microorganismos de interés en los alimentos.....	14
1.8.1. <i>Escherichia coli</i>	15
1.8.2. <i>Micrococcus luteus</i>	16
1.8.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.8.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	18
1.8.5. <i>Candida albicans</i>	18
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Materia prima y su procedencia	21
2.1.1. Obtención de subproducto de mango.	21
2.1.2. Obtención de subproducto de tamarindo.	21

2.2. Obtención de extractos	22
2.3. Pruebas antimicrobianas.....	23
2.3.1. Microorganismos de prueba.	23
2.3.2. Preparación del extracto.....	24
2.3.3. Método de difusión en agar.	24
2.3.3.1. Preparación e inoculación de cultivo overnight.....	24
2.3.3.2. Siembra de placas.....	24
2.3.3.3. Interpretación de resultados.....	25
2.3.4. Método de microdilución en caldo.	25
2.3.4.1. Preparación e inoculación de cultivo overnight.....	25
2.3.4.2. Preparación de microplaca.....	26
2.3.4.3. Siembra de microplaca.....	27
2.3.4.4. Interpretación de resultados.....	27
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1. Rendimiento de los extractos.....	29
3.2. Actividad antimicrobiana	30
3.2.1. Método de difusión en agar.	30
3.2.2. Microdilución en caldo.	34
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFIA	42
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales agentes antimicrobianos sintetizados químicamente.....	9
Tabla 2. Actividad biológica de algunos compuestos fenólicos.	11
Tabla 3. Condiciones de extracción: Solvente y Temperatura.....	22
Tabla 4. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de incubación.....	23
Tabla 5. Rendimiento de los extractos de los subproductos de mango y tamarindo.....	29
Tabla 6. Halo de inhibición (mm) en los extractos obtenidos a diferentes temperaturas del subproducto de mango frente a cada cepa ensayada por el método de difusión en agar.....	31
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de mango y tamarindo frente a cada microorganismo ensayado mediante el método de microdilución en caldo.....	35
Tabla 8. Resultados de controles positivos para las diferentes cepas utilizando el método de microdilución en caldo.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto de mango.....	6
Figura 2. Partes del fruto de tamarindo.....	7
Figura 3. <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 4. <i>Micrococcus luteus</i>	16
Figura 5. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Figura 6. <i>Enterococcus faecalis</i>	18
Figura 7. <i>Candida albicans</i>	18
Figura 8. Obtención del subproducto de mango	21
Figura 9. Obtención del subproducto de tamarindo	22
Figura 10. Esquema del método de difusión en agar.....	25
Figura 11. Microplaca de 96 pocillos con 12 columnas y 8 filas (A-H).....	27
Figura 12. Halos de inhibición de extractos de mango: etanol a 40°C (c) y 60°C (f); agua a 20°C (a), a 40°C (h) y 60°C (d); etanol:agua (50:50 v/v) a 20°C (g), 40°C (e) y 60°C (b) frente a <i>M. luteus</i>	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Determinación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir del subproducto de mango y tamarindo	51
Anexo B. Método de Difusión en Agar: tamaño del halo de inhibición en mm de las cepas bacteriana frente a los extractos liofilizados de los subproductos de mango y tamarindo. (3 repeticiones)	52
Anexo C. Resultados de halos de inhibición de controles positivos contra las cepas estudiadas.....	56
Anexo D. Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de mango y tamarindo.	59

ABREVIATURAS

ATTC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración mínima inhibitoria
MTT	3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-bromuro difeniltetrazolio
µg	Microgramos
mg	Miligramos
U	Unidades
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mg/mL	Miligramos / mililitros
UFC	Unidades formadoras de colinas
mm	Milímetros
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>

RESUMEN

Promoviendo el desarrollo de ingredientes alimenticios a partir de subproductos de mango y tamarindo, se desarrollaron 18 extractos mediante maceración con etanol, etanol-agua (50:50 v/v) y agua a diferentes temperaturas (20°C, 40°C y 60°C), además se determinó su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, mediante difusión en agar y microdilución en caldo, en dosis de 80 mg/mL; los extractos de mango en agua a 60°C, etanol y etanol-agua a 20°C, 40°C y 60°C se obtuvieron halos de inhibición entre 6 a 8 mm mostrando resistencia y en microdilución en caldo presentaron una CMI entre 2000 y 4000 µg/mL para extractos en etanol a 20°C, 40°C, etanol-agua a 60°C y agua a 40°C y 60°C mostraron inactividad; en cambio en los extractos en etanol a 60°C y etanol-agua a 20°C y 40°C presentaron una CMI de 1000 µg/mL, como débil frente a *M. luteus*. En extractos de tamarindo etanol a 20°C, 40°C y 60°C y etanol-agua a 40°C y 60°C presentaron una CMI de 4000 µg/mL mostrando inactividad frente a *M. luteus*.

PALABRAS CLAVES: mango, tamarindo, actividad antimicrobiana, difusión en agar, microdilución en caldo.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the utilization of byproducts of exhausted pulp and mango rind from the Provincia de Guayas and the tamarind vein from the Provincia de Sullana, Departamento de Piura, Peru. For dynamic maceration with ethanol, ethanol-water (50:50 v/v) and water at different temperatures (20 °C, 40 °C and 60 °C), were obtained 18 extracts reaching a concentration of 80 mg/mL. The antimicrobial activity was determined against *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, by diffusion in agar using discs of gentamicin, ampicillin, amikacin, voriconazole and nystatin like positive control. In the case of broth microdilution (CMI) it was used gentamicin, terbinafine and itraconazole. The results obtained from the mango extracts showed an inhibition halo of 5.6 to 8 mm for the ethanol and ethanol-water extracts (50:50 v/v) at 20 °C, 40 °C and 60 °C and water at 60 °C reported as resistant to *M. luteus* and a MIC between 1000-4000 µg/mL for ethanol and ethanol-water extracts (50:50 v/v) at 20 °C, 40 °C and 60 °C and water at 40 °C and 60 °C presenting an inactive activity against *M. luteus*. In the case of tamarind, the ethanolic extracts at 20 °C, 40 °C and 60 °C and ethanol-water (50:50 v/v) at 40 °C and 60 °C showed an MIC of 4000 µg/mL, showing a inactive antimicrobial activity against *M. luteus*.

KEYWORDS: *Mangífera indica*, *Tamarindus indica*, minimum inhibitory concentration (MIC), antimicrobiall activity.

INTRODUCCIÓN

La transformación de alimentos a nivel mundial hace necesaria la búsqueda de distintos métodos de conservación, uno de los más usados es la incorporación de conservantes químicos como los benzoatos, nitritos, nitratos, anhídrido sulfuroso, entre otros; los cuales inhiben el crecimiento y la actividad de los microorganismos que causan descomposición y enfermedades de origen alimentario. Muchos de los productos químicos usados como conservantes son considerados cancerígenos y teratogénicos dada su toxicidad residual (Castaño, Ciro, Zapata, & Jiménez, 2010; Rodríguez, 2011) por lo cual son mal vistos por parte de los consumidores; los cuales hoy en día, prefieren productos con un mínimo proceso de transformación y sin sustancias químicas añadidas (Rodríguez, 2011). El interés actual de la industria alimentaria se enfoca en la búsqueda de alternativas que permitan cubrir las actuales demandas del consumidor, entre ellas el reemplazo de los conservantes químicos por extractos naturales de plantas, especies, frutas y hierbas que contengan ciertos compuestos con potencial bacteriostático, fungistático y/o fungicida (Rodríguez, 2011); tal es el caso de compuestos fenólicos, terpenos o alcaloides, que pueden cumplir la función antimicrobiana deseada.

Los subproductos del mango (*Mangifera indica L.*) como semillas y cáscara, son ricos en compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides y vitaminas (Ajila, Aalami, Leelavathi, & Rao, 2010). Por ejemplo los extractos etanólicos de semillas de mango en una concentración de 5 mg/mL, han mostrado inhibición contra *Staphylococcus aureus* con halos de 10 mm y 11 mm (El-Gied et al., 2012). Por otro lado, los subproductos del tamarindo (*Tamarindus indica L.*) contienen compuestos fotoquímicos como taninos, saponinas y alcaloides; estudios realizados con extractos acuosos de hojas frescas de tamarindo mostraron sensibilidad para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de >0,15 a 0,019 g/ml (Escalona, 2011).

El método de difusión en agar es utilizado para pruebas “*in vitro*”, para determinar de forma preliminar la eficacia de un compuesto, algunos factores importantes que afectan los resultados de esta prueba son: el medio en que se prueba su eficacia, la especie, extracto a evaluar y el microorganismo (Rodríguez, 2011). El método de microdilución en caldo es otro método importante para evaluar la acción de cualquier sustancia a distintas concentraciones y determinar la mínima cantidad necesaria para conseguir la inhibición microbiana (Castaño et al., 2010)

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de extractos de mango (*Mangifera indica L.*) y tamarindo (*Tamarindus indica L.*), frente a

cepas de importancia en la contaminación y descomposición de alimentos y con ello contribuir a promover el aprovechamiento de subproductos de la industria alimentaria para la elaboración de alimentos saludables y con potencial funcional. Se obtuvieron extractos con diferentes solventes como agua, etanol y mezcla de agua-etanol 50:/50 (v/v) mediante maceración dinámica a diferentes temperaturas (20, 40 y 60°C), la actividad antimicrobiana se evaluó mediante las técnicas de difusión en placa y de microdilución en caldo.

El trabajo consta de tres capítulos, el primero se describe los fundamentos teóricos que sustentan la investigación, en el segundo capítulo se detallan los materiales y métodos empleados en la investigación y en el tercer capítulo se presentan los resultados obtenidos con su respectivo análisis y conclusiones alcanzados en el trabajo.

**CAPÍTULO 1:
REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1. Mango

El mango (*Mangífera indica* L.) pertenece a la familia Anacardiaceae (**Figura 1**), es originario del sudeste de Asia y su fruto consta de tres partes: cáscara o exocarpo, pulpa o mesocarpo y hueso cartilaginoso o endocarpo que contiene la semilla (Ashoush & Gadallah, 2011; Dorta, 2014; Galán, 2009; Martínez Morales, 2016). Entre las variedades más conocidas se pueden nombrar las siguientes: Kent, Keitt, Ataulfo, Haden y Tommy Atkins (Corrales-Bernal, Maldonado, Urango, Franco, & Rojano, 2014; PROECUADOR, 2012; Rueda, 2008) . A nivel mundial ocupa el quinto puesto en consumo y el tercer puesto de las frutas tropicales seguido del plátano y la piña (Galán, 2009; Gómez de Zea, 1994). Las industrias han generado por año millones de toneladas de residuos de gran importancia como la cáscara que constituye el 15 al 20% y la semilla con 20 al 60% (Ashoush & Gadallah, 2011). En el Ecuador anualmente se produce trece millones de cajas de mango, como producto de exportación (84%) su mayor destinatario Estados Unidos de Norteamérica (ANDES, 2016; PROECUADOR, 2012).

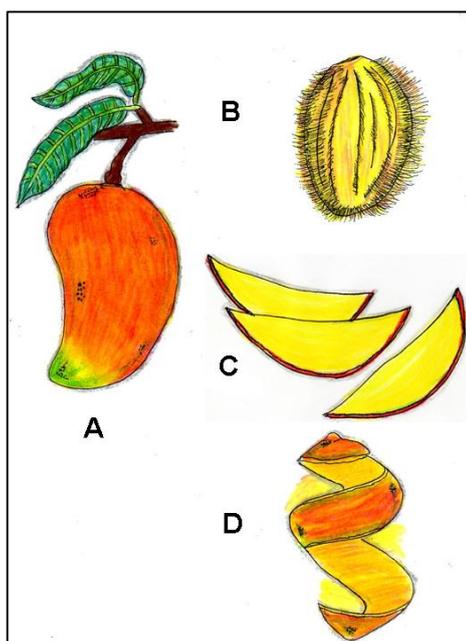


Figura 1. Partes del fruto de mango
A. Mango; B. endocarpo hueso cartilaginoso; C. Pulpa o mesocarpo; D. Cáscara o exocarpo.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

El mango tiene un aporte nutricional en carbohidratos, fibra y proteínas, su pulpa contiene compuestos fitoquímicos como vitamina A, C y E, minerales como el potasio y magnesio, así como ácidos fenólicos con actividades antioxidantes (gálico, benzoico, 3-4 dihidrobenzoico), carotenoides (manguiferina, catequina y epicatequina); también pectinas (fibra soluble), ácidos orgánicos (málico y tartárico) y flavonoides como la quercetina (Ashoush & Gadallah,

2011; Olivera, 2012; Sumaya-Martínez, Sánchez Herrera, Torres García, & García Paredes, 2012). Su principal compuesto es la manguiferina encontrado en el mango y subproductos que poseen acciones farmacológicas, atribuyendo también analgésicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiviral y antitumoral (Masibo & He, 2009; Olivera, 2012).

De los subproductos del mango, la cáscara se la utiliza como ingrediente en jaleas, fibra comestible, vinagre y galletas de alta fibra dietaría con índices bajos en calorías; de la semilla se extrae aceite el cual es utilizado en la industria cosmetológica y de jabonería (Ashoush & Gadallah, 2011; Medina & De La Cruz, 2002). En el estudio de Dorta (2014), se utilizó extractos fenólicos en productos cárnicos en la industria alimenticia, demostrando efectos antimicrobianos y antioxidantes con el propósito de alargar la vida útil del producto.

1.2. Tamarindo

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) pertenece a la familia Fabaceae, tiene origen en India y África (Encalada, 2011). En Ecuador la mayor producción de tamarindo se da en las provincias de Manabí y Guayas con valores de 36 y 210 toneladas por hectárea respectivamente (Tm/Ha) (Encalada, 2011). Su fruto tiene alto contenido en fibra, su vaina es alargada y curvada llegando a 20 cm de longitud y 4 cm de ancho, esta adquiere en su madurez un color marrón (González-Palomares, 2009; Luzia & Jorge, 2011).

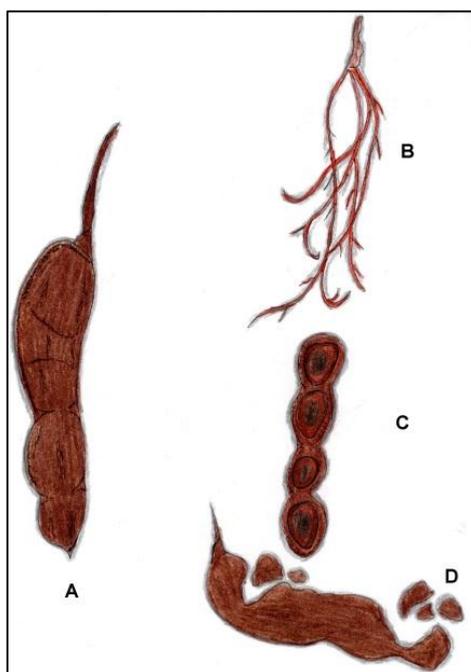


Figura 2. Partes del fruto de tamarindo
A. Tamarindo; B. Vena; C. Pulpa y semilla; D. Cáscara.

Fuente: La autora
Elaboración: La autora

Es un fruto con bajo contenido de agua, por lo que presenta elevada cantidad de azúcares, proteínas, carbohidratos, calcio, fósforo (Encalada, 2011; Olivares & Santos, 2015; Páez-Peñuñuri, Mercado-Mercado, Blancas-Benitez, Villegas-González., & Sáyago-Ayerdi, 2016). Su pulpa es rica en ácidos como tartárico, acético y cítrico (González-Palomares, 2009; Hernández-Estrada & González-Palomares, 2010; Luzia & Jorge, 2011). Además, en sus hojas posee: ácido oxoglutárico, glioxílico, málico, oxalacético y oxalosuccínico (Encalada, 2011).

En estudios citados por Escalona (2011) se determinó que los frutos poseen efectos laxantes, diuréticos y antisépticos comprobados, además a las hojas se les atribuye propiedades hepatoprotectoras, espasmolíticas, antigripales, antidiabéticas y antibacterianas; las semillas tienen propiedades antihelmínticas, antidiarreicas y la capa de la semilla es utilizada para quemaduras y cicatrizante, además de estas propiedades comparte con las raíces la propiedad antihemorrágica (Komutarin et al., 2004)

En la cubierta de la semilla y fruto se encuentra la mayor proporción de compuestos polifenoles y flavonoides (taninos, polifenoles, antocianidina) (Komutarin et al., 2004). Además, está constituido por dos grupos de compuestos orgánicos: no volátiles como ácidos carboxílicos y azúcares, y volátiles como terpenoides, ésteres y aldehídos (González-Palomares, 2009).

En las industrias alimenticias son considerados como subproductos de tamarindo a la fibra y la cáscara representando el 22.4% del peso de la fruta (Hernández-Estrada & González-Palomares, 2010). La pulpa de tamarindo se comercializa como ingrediente principal para la preparación de dulces, mermeladas, licores y extractos; para preparar refrescos por su buena aceptación de su sabor “agridulce” (González-Palomares, 2009; Hernández-Estrada & González-Palomares, 2010). Se lo utiliza para elaborar condimentos de salsas para carnes o pescados (Olivares & Santos, 2015). A nivel industrial la cáscara y el bagazo del tamarindo representan el 50% de desecho alimentario, luego del proceso de elaboración de jugos (Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo, & Pérez-Alvarez, 2007; Paute, 2016).

En varios estudios de subproductos de tamarindo se han encontrado en su extracción compuestos con propiedades antioxidantes para una utilización como aditivos en el control de procesos oxidativos en empresas de alimentos o ingredientes funcionales (Garrido, Monagas, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2007; Paute, 2016).

1.3. Extracción de compuestos (sólido-líquido)

En este tipo de extracción, los sólidos contenidos en una matriz se transportan al disolvente (Paute, 2016; Soto, 2015); se utiliza el agua y disolventes orgánicos para la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos como compuestos fenólicos: polifenoles, antocianinas, taninos, saponinos, terpenoides y alcaloides (Azmir et al., 2013; Dorta, 2014; González & González, 2010).

Para la extracción de los compuestos bioactivos se toman diversos factores como la polaridad del disolvente, la naturaleza del compuesto a extraerse con el disolvente, la temperatura, tiempo de contacto y la relación peso/volumen como también seleccionar la técnica y tiempo de extracción (Azmir et al., 2013; Dorta, 2014; González & González, 2010).

1.4. Conservantes alimentarios sintéticos

Los conservantes tienen varias acciones sobre los microorganismos: en la inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular, deterioro a la integridad de las membranas e interferencia en los procesos metabólicos esenciales, enzimas metabólicas y en la síntesis de proteína o génico (Rodríguez, 2011).

En la actualidad los conservantes antimicrobianos sintéticos más utilizados dentro de las industrias alimenticias han sido los benzoatos, anhídridos sulfurosos, nitratos y nitritos, entre otros (**Tabla 1**) (López-Malo, 2000; Rodríguez, 2011), según la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América), se los utiliza en un porcentaje permitido para consumo humano y animal (López-Malo, 2000). La principal función de un conservante en el alimento es atacar a las células microbianas dependiendo de la concentración utilizada para que pueda inhibir el crecimiento de bacterias y hongos actuando como bacteriostáticos, fungistáticos y fungicidas (López-Malo, 2000; Rodríguez, 2011).

Tabla 1. Principales agentes antimicrobianos sintetizados químicamente.

Agente	Máximo permitido	Microorganismos Afectados	Alimentos
Parabenos	0,10%	Mohos y Levaduras	Productos horneados, bebidas gaseosas, encurtidos, aderezos
SO ₂ y sulfitos	200 – 300 ppm	Mohos, Levaduras y Bacterias	Melaza, frutas secas, vino, jugo de limón
Nitrito de sodio	120 ppm	Clostridia	Carnes curadas
Nisina	1%	Bacterias ácido lácticas, Clostridia	Quesos pasteurizados
Acido benzoico y benzoatos	0,10%	Mohos y Levaduras	Margarina, aderezo de encurtidos, cidra de manzana, bebidas gaseosas, aderezos, salsa de tomate
Ácido sórbico y	0,20%	Mohos	Quesos duros, higos,

sorbatos			jarabes, aderezos, jaleas, pasteles
Ácido propiónico y propionatos	0,32%	Mohos	Pan, pasteles, quesos

Fuente: López-Malo, (2000)

Elaboración: La autora

En la búsqueda de alternativas que permitan suprimir el uso de conservantes artificiales, los extractos naturales de plantas, especies, frutas y hierbas han resultado adecuados gracias a la capacidad de sus compuestos metabólicos como inhibidores antimicrobianos; entre ellos están los ácidos orgánicos, alcaloides, glucósidos cianogenéticos, glucosinolatos, fitoalexinas, compuestos fenólicos y terpenos (Rodríguez, 2011).

1.5. Metabolitos secundarios

Las plantas tienen variedades de moléculas orgánicas que aportan beneficios a ellas como los metabolitos secundarios o principios activos. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el funcionamiento de la célula y no participan en transformaciones bioquímicas comunes, pero son productos aislados de fuentes naturales vivas como plantas, bacterias, hongos y animales (Dueñas, 2009; Marco & Mann, 2006). Su presencia puede ser limitada por lo que pueden ser producidos por especies de una familia, lo cual ayuda a evaluar y caracterizar sus quimiotaxonomías; así también ir relacionándolas a las especies por su taxonomía o género con similitudes entre sus metabolitos secundarios y sus diferentes proporciones en la propia planta, por lo que pueden existir mayores concentraciones de metabolitos en sus diferentes partes de la planta (hojas, flores, raíz, frutos, tallos), son apreciados por las numerosas utilidades y propiedades biológicas, como también diferentes usos y aplicaciones como en medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes y con actividades antimicrobianas (Dueñas, 2009; González, 2013; Gyawali & Ibrahim, 2014).

Existen factores que pueden afectar a la planta para la cantidad de metabolitos secundarios como los intrínsecos: genéticos (mutaciones), interacciones con enzimas para sufrir transformaciones, variaciones diurnas, ontogénicas o estacionales; asimismo extrínsecos como el clima y la temperatura, humedad o condiciones del suelo (Braca, 2008; Dueñas, 2009).

En las rutas biosintéticas del ácido shikímico y el ácido mevalónico, se sintetizan y se transforman los metabolitos secundarios como ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas y lignanos (Braca, 2008; Dueñas, 2009; González, 2013). Los flavonoides se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico (González, 2013).

Los flavonoides, taninos, resinas, esteroides, aceites esenciales, alcaloides, glicósidos son algunos ejemplos de metabolitos secundarios, estos pueden pasar por transformaciones como degradación, reducción, oxidación, acilación, alquilación y aunque no son metabolitos esenciales, tienen interacciones con enzimas propias de la planta, y pasan por diferentes rutas metabólicas, por lo que una sustancia no siempre se sintetiza de la misma forma (Dueñas, 2009).

1.6. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen el grupo más importante de compuestos bioactivos pues se encuentran en gran cantidad en los biorresiduos. Este tipo de compuestos presentes en las plantas se encuentran muy relacionados con la calidad sensorial y bioactiva de las frutas y hortalizas (Veberic et al., 2005). Los compuestos fenólicos tienen elevadas cantidades de fenoles simples, polifenoles, flavonoides, taninos, entre otros (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Dorta, 2014; Dueñas, 2009; Gyawali & Ibrahim, 2014; Olivera, 2012; Rodríguez, 2011).

En los residuos vegetales se han encontrado que son fuentes de compuestos bioactivos como: fenólicos, carotenoides, fitoesteroles, tocoferoles y ácido ascórbico (Ayala-Zavala et al., 2011; Dorta, 2014; González & González, 2010). Estos tienen actividad biológica como antibacteriana, antiinflamatoria, antiviral, antitumoral y antioxidante, siendo los flavonoides con mayor actividad (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011; Balasundram et al., 2006; Braca, 2008; Dorta, 2014; Dueñas, 2009) como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Actividad biológica de algunos compuestos fenólicos.

Compuestos Fenólicos	Actividad biológica
Fenoles simples	Antioxidante, antitumoral, antiviral, antibacteriana
Lignanós	Antitumoral, antiviral
Quinonas	Antitumoral, antiviral
Xantonas	Antitumoral, antiviral, citotóxica, mutagénica, antibacteriana, antiinflamatoria
Flavonoides	Antiinflamatoria, antibacteriana, antialérgica, diurética, antiviral, antiproliferativa, captador de radicales libres, antihipertensivo

CumarinasAnticoagulante, antitumoral, fotosensibilizante, antiviral

Fuente: Dueñas, (2009); Braca, (2008)**Elaboración:** La autora

Según Vega-Vega, Silva-Espinoza, Cruz-Valenzuela, Bernal-Mercado, González-Aguilar, Ruíz-Cruz, Moctezuma, Siddiqui, & Ayala-Zavala (2013) los compuestos fenólicos tienen actividad antimicrobiana e interactúan con los grupos carboxilo de los aminoácidos hidrófilos de la proteína de la membrana celular, causando una alteración en el pH y potencial eléctrico; esto provoca una coagulación del citoplasma de la bacteria, seguida de una muerte celular.

Halliwell y Gutteridge (1995) define a un antioxidante desde la perspectiva biológica como “cualquier sustancia que, en concentraciones bajas en relación con el sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del sustrato”, de esta manera reduciendo la oxidación *in-vitro* de lipoproteínas de baja densidad y/o atrapan los radicales libres responsables de la oxidación lipídica y del daño celular (Dorta, 2014; Moure et al., 2001).

1.6.1. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales, tienen gran utilidad para el desarrollo y optimización en el funcionamiento de las plantas ayudando a su protección contra agentes externos como los rayos UV, señaladores químicos, o guiando a los insectos hacia la planta para su alimentación y polinización (Olivera, 2012). Su importancia radica en la capacidad de unirse a complejos de proteínas extracelulares con alta solubilidad y a la pared celular microbiana buscando su modificación en la membrana de la misma en respuesta hacia infecciones microbianas (Cowan, 1999). Existen dos agrupaciones las antocianinas son moléculas de pigmentos rojos, azules y púrpuras; como también, las antoxantinas que son moléculas incoloras o color desde el blanco al amarillo como los flavonoles, flavonas, e isoflavonas (Dueñas, 2009).

Los flavonoides son utilizados como complementos alimenticios, formando parte de los ingredientes de bebidas refrescantes (edulcorantes), con efectos antiinflamatorios o antialérgicos (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008). Principalmente los flavonoides tienen efectos antioxidantes presentando una propiedad que es el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tal como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450; como también fungicida y bactericida (Dueñas, 2009; López-Malo, 2000; Rodríguez, 2011; Unnisa, Tabassum, Ali, & Ponia, 2012).

Algunos ejemplos de flavonoides más representativos son: flavonas, y flavonoles son compuestos sólidos que tienen pigmentos desde el amarillo al rojo; las agliconas son

cristalinos, y las antocianidinas principalmente de colores violeta, azul, morado y rojo intenso (Dueñas, 2009).

1.7. Actividad antimicrobiana

1.7.1. Generalidades

La actividad antimicrobiana natural se deriva de fuente animal, microbiana o vegetal la que es potencialmente utilizada en los alimentos como frutas y vegetales frescos, estos poseen la capacidad de inactivar a los microorganismos patógenos en el ámbito alimentario y una disminución en la resistencia a antibióticos (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

La actividad antimicrobiana de diversos extractos de frutas se ha probado contra diferentes bacterias y hongos. Las bacterias Gram negativas son más resistentes que las bacterias Gram positivas (Unnisa et al., 2012).

Los antibióticos naturales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microbios o de eliminarlos, además tienen la capacidad de evitar o prevenir enfermedades. Algunos beneficios de un antibiótico natural comparado con el sintético es que no son sintetizados en el laboratorio, no tienen efectos secundarios, no tienen peligros de acumulación en el organismo, son baratos y tienen tolerancia hacia las bacterias (flora intestinal) que son beneficiosas para el individuo (Estrada, 2010).

La evaluación de la actividad bactericida de los extractos naturales se basa en la aplicación de métodos que comprueben su eficacia “*in vitro*” en medios microbiológicos que proporcionan información acerca de la efectividad de un compuesto y evaluar las variables que afectan a la actividad frente a bacterias de interés (Castaño et al., 2010).

1.7.2. Métodos de evaluación antimicrobiana

1.7.2.1. Método de difusión en agar

La prueba de disco-difusión o de Kirby-Bauer y colaboradores es un método que es utilizado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI), se lo utiliza para determinar la susceptibilidad de un agente microbiano frente a un antimicrobiano o quimioterápico, en este método, el antibacteriano o fármaco se difunde en la superficie del medio de cultivo en agar alrededor del disco o pocillo que contiene el antibacteriano. La difusión se hace de forma radial, siendo más intensa en contorno del disco o pocillo y disminuyendo hacia la periferia del medio. La interpretación de los halos de inhibición se cataloga como: sensible, intermedio y resistente; el tamaño de halo de inhibición del resultado puede influir como: la concentración o difusión del extracto en estudio, tiempo, sensibilidad bacteriana y temperatura de incubación (Abad, 2009; Ágreda, 2011).

El medio de cultivo nutritivo no selectivo agar Mueller Hinton es recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para la realización del antibiograma, por su buena reproducibilidad de lote a lote en las pruebas de sensibilidad, por su contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetropim y tetraciclina es bajo, además los microorganismos crecen cómodamente (Martínez, 2017).

Este método evalúa la variedad de antimicrobianos, dependiendo de su halo de inhibición, el efecto inhibitorio del compuesto a ensayar dependerá de la destreza para la difusión en el medio, el crecimiento y la reproducción acelerada del microorganismo (López-Malo, 2000).

1.7.2.2. Método de microdilución en caldo

Es una técnica de dilución en caldo, en el cual se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano; la concentración mínima inhibitoria (CMI), es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. La concentración del antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como CMI (Abad, 2009; Ágreda, 2011).

Para la realización de pruebas antimicrobianas en microplaca de 96 pocillos, se utilizan diferentes concentraciones de extracto a ensayar, se mezclan con el medio de cultivo, el cual se inocula el microorganismo a prueba, se deja incubar y se determina por turbidez o por cambio de color con la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) el crecimiento o no de los microorganismos, el pocillo que contenga la menor concentración es el agente que inhibe por completo el crecimiento definiendo la CMI (Ramírez, & Castaño, 2009).

1.8. Microorganismos de interés en los alimentos

La aparición de alteraciones en los alimentos se da por la presencia de microorganismos, los cuales se proliferan y provocan un desequilibrio en la conservación del alimento y el rechazo por parte del consumidor (Muthuswamy, Rupasinghe, & Stratton, 2007).

Las causas más comunes de alteración de los productos alimentarios son de naturaleza biológica y entre estas, sin duda alguna las más importantes por los daños económicos producidos son los microorganismos y las enzimas naturales de los alimentos. Los microorganismos transmiten a los alimentos a través del medio ambiente que los rodea, pero para su desarrollo necesitan un sustrato a partir del cual puedan crecer en número y resultar invasivos.

Según la Organización Mundial de la Salud (2017), "Los alimentos insalubres que contienen

bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer”.

Así mismo la OMS, estima que cada año enferman en el mundo 600 millones de personas (casi 1 por cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados y que 420.000 mueren por esta misma causa. Mientras que los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125.000 defunciones en este grupo de edad (OMS, 2017).

Los agentes que son causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos más conocidos son:

1.8.1. *Escherichia coli*

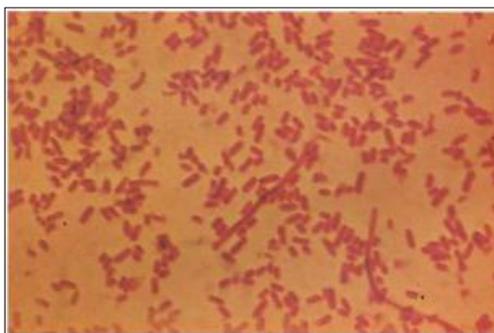


Figura 3. *Escherichia coli*

Fuente: Alvarez, Boquet, & Fez, (1996)

Elaboración: Alvarez, Boquet, & Fez, (1996)

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo gramnegativo corto ($0.5 \times 3 \mu\text{m}$), por lo general es móvil, no esporulado, son anaerobios facultativos, sus colonias son circulares, convexas y lisas con bordes distintivos (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2014). En cultivos selectivos diferenciales como el Mac Conkey, durante 24 horas a 37°C , luego de este tiempo se observan colonias lisas, circulares convexas, con bordes bien diferenciados no viscosas, aplanadas y de color rosa intenso debido a la fermentación de lactosa, glucosa y produciendo ácido y gas (Ágreda, 2011; Galán, 2009)

Se las puede encontrar en el intestino humano, animales de sangre caliente y pájaros, además son utilizadas como indicador de higiene en grupos coliformes y coliformes fecales (Ray & Bhunia, 2010).

Se pueden distinguir tres tipos de antígenos: Ag O o antígeno somático constituido por el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, H o antígeno flagelar y K o antígeno capsular (Ágreda, 2011).

Esta bacteria se la asocia a enfermedades como septicemia, meningitis neonatal, infecciones de aparato urinario y gastroenteritis; además de provocar gastroenteritis

Escherichia coli enterotoxigenica (STEC), O157:H7 de toxina Shiga, es la más conocida, siendo la causante de colitis hemorrágica esta enfermedad que se puede evitar por una buena cocción en carnes (Brooks et al., 2014). *Escherichia coli*, tiene niveles altos de resistencia antibiótica hacia ampicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico. (Mosquito, Ruiz, Bauer, & Ochoa, 2011). La bacteria *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 se la asocia por el consumo de productos lácteos no pasteurizados y carne molida como también otras formas de contagio: es de contacto de persona a persona, consumo de vegetales, agua no tratada, sidra de manzana y son sensibles a tetraciclina, amoxicilina, trimetropim-sulfametoazol, ciprofloxacina, nitrofurantoina, amikacina, sulfamidas, gentamicina, cefalosporinas y penicilinas (Restoy, Ruiz, & Arechavaleta, 2006; Santana, 2010; Srinivasan, Nguyen, Headrick, Murinda, & Oliver, 2007).

1.8.2. *Micrococcus luteus*



Figura 4. *Micrococcus luteus*

Fuente: Alvarez et al., (1996)

Elaboración: Alvarez et al., (1996)

Esta bacteria pertenece a la familia de las Micrococcaceae, son células esféricas 0,2 a 2 μm , se muestran en pares, tétradas o agrupaciones, son aerobios, son inmóviles, ciertas especies producen colonias amarillas, son mesófilos con resistencia al calor bajo. Se encuentran en la piel de mamíferos y pueden producir descomposición en alimentos. Se encuentran en la piel de seres humanos, suelo, agua y plantas principalmente, sin embargo, se encuentran en alimentos, como carnes rojas y aves (Ray & Bhunia, 2010).

Tiene resistencia a lisostafina y a furazolidona, y tiene sensibilidad a bacitracina, en endocarditis (Usó, Gil, Gomila, & Tirado, 2003).

1.8.3. *Staphylococcus aureus*

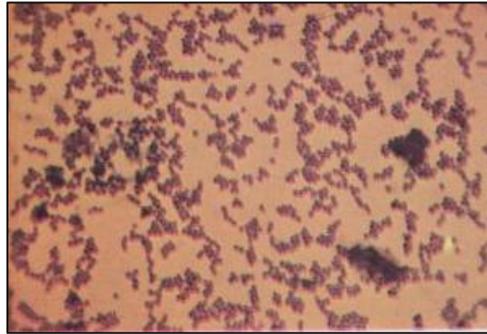


Figura 5. *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Alvarez et al., (1996).

Elaboración: Alvarez et al., (1996).

Proviene de la familia Staphylococcaceae, son cocos grampositivos inmóvil de 0,8 a 1 μm , se presentan solos o en racimos, inmóviles, no forman esporas, cuando están bajo la influencia de medicamentos sufren lisis celular, son aerobios y anaerobios facultativos; en su pared celular contiene polisacáridos y proteínas antigénicas (Ágreda, 2011; Ray & Bhunia, 2010; Romero, 2007).

Los cultivos empleados para su crecimiento son agar *Staphylococcus* 110, agar nutritivo, caldo con infusión cerebro y corazón, agar manitol sal, caldo nutritivo y agar sangre (Brooks et al., 2014; Romero, 2007). Pueden producir intoxicaciones alimentarias debido a la producción de exotoxinas durante su desarrollo en alimentos contaminados (Rondón, 2013).

Son causantes de infecciones en el ser humano, desarrollan resistencia a antimicrobianos, por lo que es muy perjudicial para la vida produciendo enfermedades en el aparato digestivo como peritonitis, intoxicaciones, enterocolitis y el aparato respiratorio otitis, faringitis, neumonitis y enterotoxina estafilocócica la cual se caracteriza por periodo de incubación (8 horas), náusea y vómito sin fiebre (Brooks et al., 2014; Romero, 2007).

En la actualidad, aproximadamente el 90% de los aislamientos clínicos de *S. aureus*, es resistente a la penicilina o meticilina (Rincón et al., 2014). Algunos antibióticos muestran mayor sensibilidad para combatirlo son los aminoglicosidos, cefalosporinas, oxacilina o nafcilina, y muestran más efectividad rifampicina y vancomicina (Rincón et al., 2014; Tapia, 2012).

1.8.4. *Enterococcus faecalis*

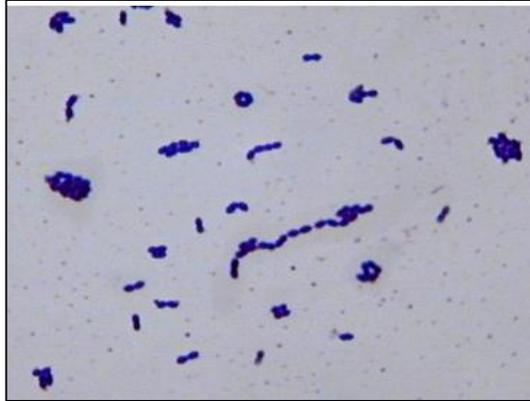


Figura 6. *Enterococcus faecalis*.

Fuente: Sabalette, (2010)

Elaboración: Sabalette, (2010)

Proviene de la familia Enterococcaceae, y son bacterias esféricas grampositivas y forman pares o cadenas durante su reproducción. Se clasifica por su sustancia específica D, y con hemólisis α , tiene una lisis incompleta de eritrocitos con reducción de hemoglobina y la formación de pigmento verde, su hábitat es el colon y puede ocasionar endocarditis, absceso abdominal e infección de vías urinarias y son resistentes a antibióticos (Brooks et al., 2014).

Son usados como indicadores de higiene y tienen un aporte significativo en la descomposición de alimentos, su hábitat normal es en los contenidos intestinales de seres humanos, animales y pájaros (Ray & Bhunia, 2010).

Enterococcus faecalis, presenta resistencia antimicrobiana a cefalosporinas, aztreonam, trimetoprim-sulfametoxazol (Fernández Fernández et al., 2004).

1.8.5. *Candida albicans*

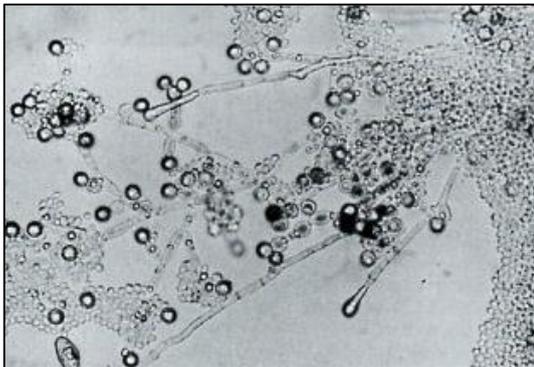


Figura 7. *Candida albicans*.

Fuente: Allen et al., (2008).

Elaboración: Allen et al., (2008).

Es un hongo diploide asexual (forma de levadura) saprofito de la familia Saccharomycetaceae (Estrada, 2010), un 85% son perjudiciales para el ser humano, en cultivos se proliferan mediante levaduras ovoides gemantes (3 a 6 μm), forman pseudohifas cuando su crecimiento no se detiene (Brooks et al., 2014). En el cultivo Sabouraud tienen un buen crecimiento y producen colonias que son de color blanco, blandas con olor a levadura y tornarse cremas o bronce al envejecer (Tapia, 2012).

Es el causante de descomposición de alimentos con alto contenido de ácido, sal y azúcar, forman películas en la superficie de los líquidos. Algunas vuelven rancia a la mantequilla y los productos lácteos (Ray & Bhunia, 2010).

Según Gutiérrez-Martínez et al., (2012) en concentraciones altas de miconazol son sensibles las cepas de *C. glabrata* y resistentes *C. parapsilosis* y *C. krusei*; utilizando el antibiótico ketoconazol tienen sensibilidad *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y resistentes *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*; utilizando Itraconazol se evidenció sensibilidad *C. krusei* y *C. parapsilosis* y resistencia hacia *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*; y para el antibiótico fluconazol las cepas *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* fueron sensibles y resistentes *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*.

**CAPÍTULO 2:
MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1. Materia prima y su procedencia

Para el presente trabajo se utilizó la mezcla de pulpa agotada y piel de mango (*Mangífera indica L.*) variedad Tommy Atkins, proveniente de la provincia de Guayas. También se trabajó con vena agotada de tamarindo (*Tamarindus indica L.*), procedente de la provincia de Sullana, departamento de Piura, del Perú.

2.1.1. Obtención de subproducto de mango

Para la obtención del subproducto se desinfectaron los mangos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante cinco minutos y se sometieron a escaldado con agua a 80°C por 5 minutos. Se realizó la separación de la cáscara y pulpa manualmente, la pulpa agotada se obtuvo por medio de filtración.

El subproducto, se sometió a un proceso de deshidratación en una estufa de convección forzada a 60°C (marca COLE PARNER, MODELO 5200 – 70) durante 48 horas. La muestra seca se trituró primeramente en un molino mecánico manual para reducir su tamaño y luego en un molino ultracentrífugo de discos (marca Retsch ZM 200) hasta tener un tamaño de partícula final $\leq 350 \mu\text{m}$ (**Figura 8**). La muestra se almacenó en bolsas de aluminio con sello hermético para evitar su rehidratación y contaminación.



Figura 8. Obtención del subproducto de mango (1) Mango; (2) Cáscara y pulpa fresca; (3) Cáscara y pulpa en polvo.

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

2.1.2. Obtención de subproducto de tamarindo

El subproducto de tamarindo se obtuvo por separación de las distintas partes del fruto (**Figura 9**): cáscara, pulpa, semilla y vena, siendo la vena la materia prima para este trabajo. Se redujo el tamaño de la vena mediante corte hasta aproximadamente 2 cm y se almacenó en bolsas plásticas con sello hermético a temperatura de -20°C hasta su posterior análisis.

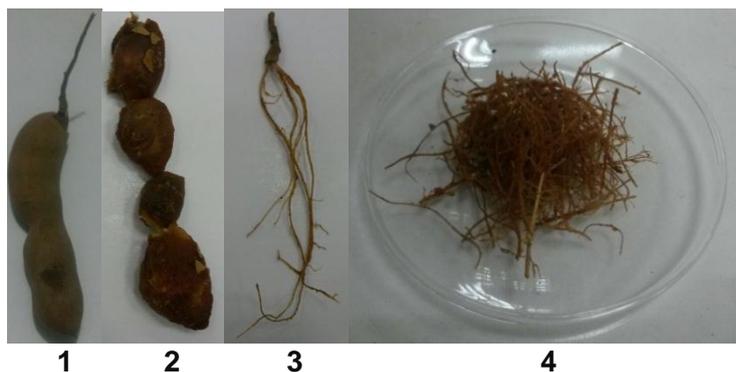


Figura 9. Obtención del subproducto de tamarindo
 (1) Fruto del Tamarindo; (2) Pulpa del tamarindo; (3) Vena;
 (4) Venas cortadas
Fuente: La autora
Elaboración: La autora

2.2. Obtención de extractos

Los solventes utilizados para la extracción fueron etanol grado absoluto (ACS Basic absoluto, Scharlau 99,5 %), agua destilada y la mezcla de ambos en proporción 1:1 utilizando tres temperaturas como se observa en la **Tabla 3**. Los extractos se elaboraron de acuerdo al diseño experimental estadístico factorial, utilizando el programa STATGRAPHICS CENTURION XVI.

Tabla 3. Condiciones de extracción: Solvente y Temperatura

Solvente de extracción	Temperatura (°C)
Etanol	20
Agua	20
Etanol-agua (50:50 v/v)	60
Etanol	40
Agua	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	40
Etanol	60
Etanol-agua (50:50 v/v)	20
Agua	40

Fuente: La autora
Elaboración: La autora

Los extractos se elaboraron en una relación 1:20 (1g de muestra + 20 mL de solvente) usando maceración dinámica a 2.500 rpm durante 1 hora y 30 minutos en diferentes temperaturas 20°C, 40°C y 60°C. Para obtener el sobrenadante, se centrifugó a 2800 rpm por 30 minutos en el equipo CLAY ADAMS® Brand DYNAC® Becton Dickinson and Company, MD, USA.

El sobrenadante de cada extracto se rotaevaporó a 37°C a vacío hasta la eliminación del etanol en el equipo HEIDOLPH, posteriormente se deshidrataron mediante liofilización a -50°C y 15 Pa en el equipo LABCONCO FreeZone 12. Los extractos secos se almacenaron en viales ámbar en congelación.

El rendimiento de cada extracto se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \left(\frac{b}{a}\right) \times 100$$

Dónde:

%= porcentaje de rendimiento.

a= peso inicial del subproducto (g).

b= peso del extracto liofilizado (g).

2.3. Pruebas antimicrobianas

2.3.1. Microorganismos de prueba

Se utilizaron cinco cepas certificadas una Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC® 43888™ y las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 19433™, *Micrococcus luteus* ATCC® 10240™; además, el hongo levaduriforme *Candida albicans* ATCC® 10231™ las cuales fueron mantenidas en reserva criogénica a -80°C.

Se preparó el cultivo overnight, transfiriendo 300 µL a un frasco con 7 mL del caldo definido para cada bacteria y condiciones de incubación como se observa en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de incubación.

Microorganismos	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
Bacterias		
Gram Negativa		
<i>E. coli</i>	Caldo Tryptisoya	35 °C por 14-16 h
Gram Positivas		
<i>M. luteus</i>	Caldo Nutritivo	
<i>E. faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	35 °C por 14-16 h
<i>S. aureus</i>	Caldo Tryptisoya	
Hongo levaduriforme		
<i>C. albicans</i>	Caldo Sabouraud	35 °C por 14-16 h

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

2.3.2. Preparación del extracto

A partir del extracto seco liofilizado, cada extracto se preparó en una disolución de 80 mg/mL utilizando agua destilada como diluyente.

2.3.3. Método de difusión en agar

2.3.3.1. Preparación e inoculación de cultivo overnight

Se utilizó el procedimiento que se encuentra en los manuales del Instituto para estándares del laboratorio clínico (2006) los ensayos se realizaron con los respectivos controles y por triplicado.

Desde el cultivo overnight se tomó una alícuota del microorganismo a ensayar y se colocó en frascos con 5 mL de solución salina al 0,9%, se homogenizó hasta alcanzar una concentración equivalente al 0,5 en la Escala McFarland, correspondiente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

2.3.3.2. Siembra de placas

Para la siembra se prepararon placas con 25 mL de medio gelificado de agar Mueller Hinton para bacterias y Sabouraud para hongos, en las cuales con hisopo estéril los microorganismos se inocularon mediante estriado por agotamiento continuo y uniforme. A continuación, con un tubo Durham se realizaron de 4 a 5 pocillos de 5 mm de diámetro y el excedente se retiró con microespatula estéril, en cada uno se colocó 25 μ L del extracto a probar, esto se realizó por triplicado. Cada caja fue sellada con parafilm y se incubaron invertidas a 35°C por un periodo de 24 horas como se muestra en la **Figura 10**. Después del tiempo de incubación, se procedió a medir los halos de inhibición de los extractos.

Como control positivo del método, se utilizaron sensidiscos Beckton Dickinson Diagnostics (BD) BBL™ Sensi-Disc™ para evaluar la sensibilidad y resistencia se establecieron como controles los discos de: gentamicina 10 μ g, ampicilina 10 μ g y amikacina 30 μ g; además, como antimicóticos los discos de sensibilidad Oxoid Ltd., Basingtoke, Hampshire, England. UK de: nistatina 100 U y voriconazol 1 μ g, colocados en la placa respectiva. Se empleó una caja de control por microorganismo.

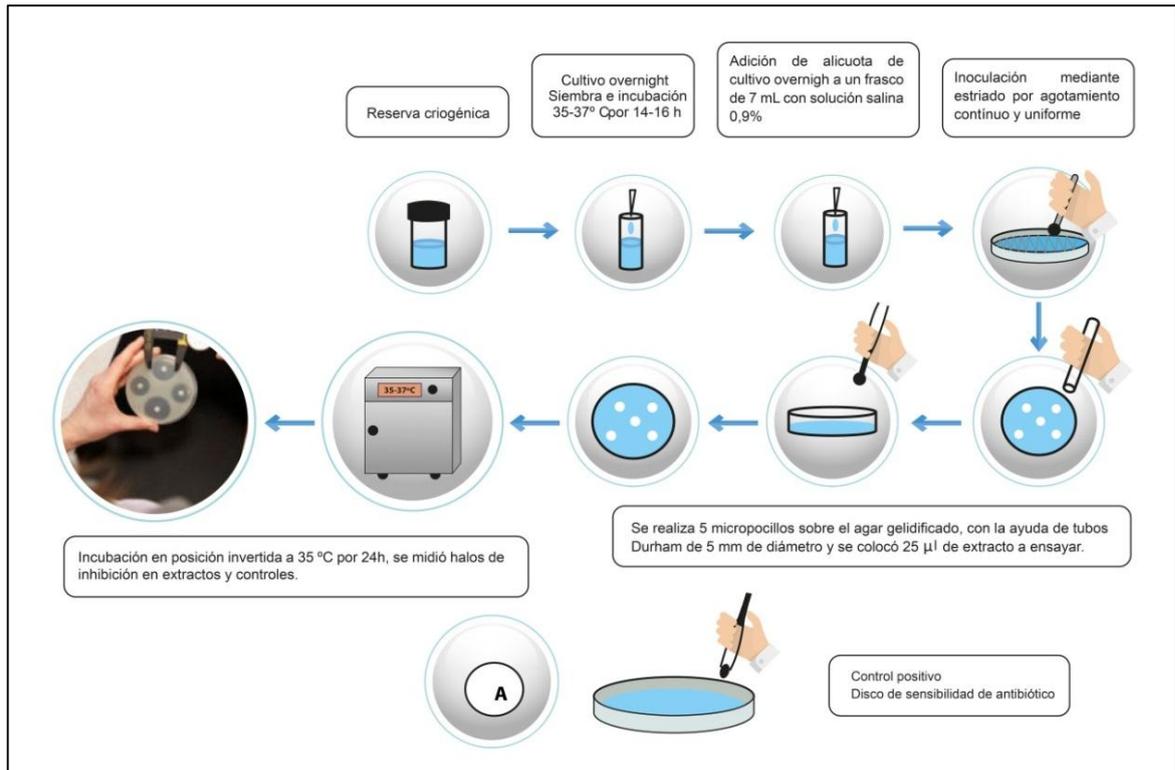


Figura 10. Esquema del método de difusión en agar.

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

2.3.3.3. Interpretación de resultados

La sensibilidad de las cepas microbianas frente a los extractos evaluados se realizó la lectura empleando un calibrador para medir los halos de inhibición en milímetros (mm). La actividad se demuestra con la existencia de una zona clara de inhibición alrededor del depósito del pocillo (extracto) y discos de sensibilidad. Los resultados obtenidos con los discos de antibióticos se los clasificó como resistente, intermedio y sensible (**Anexo C**), dependiendo de los *Estándares de desempeño para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos*, suplemento M100 de CLSI (2017) para bacterias y para *Candida albicans* según Maroszyńska, Kunicka-Styczyńska, Rajkowska, & Maroszyńska, (2013); Pfaller et al., (2005).

El valor final de la zona de inhibición, representa el promedio de las mediciones efectuadas por triplicado para cada microorganismo de prueba frente a cada extracto ensayado.

2.3.4. Método de microdilución en caldo

2.3.4.1. Preparación e inoculación de cultivo overnight

Se preparó el cultivo overnight, transfiriendo 300 µL a un frasco con 7 mL del caldo definido para cada bacteria y condiciones de incubación como se observa en la **Tabla 4**.

2.3.4.2. Preparación de la microplaca

Se siguió los lineamientos descritos en el documento M7-A7 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (CLSI, 2006) para bacterias y el documento M27-A2 (Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts) del Instituto para estándares del laboratorio clínico (NCCLS, 2002) para hongos levaduriformes, con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente modo: se colocó 180 μL de caldo Mueller Hinton o Sabouraud a la primera fila de pocillos (A) y 100 μL a las demás filas restantes de pocillos (B-H), luego se adicionó 20 μL del extracto a probar en la primera fila de pocillos (A) y se mezcló.

Se prosiguió tomando 100 μL del primer pocillo y colocando en el pocillo siguiente, hasta lograr 8 diluciones consecutivas, hasta llegar a la fila H, alcanzando diferentes concentraciones desde 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 11**). En este paso se obtiene un volumen final de 100 μL que equivale a Caldo Mueller Hinton o Sabouraud + 20 μL del extracto.

En la **Figura 11** se muestra el esquema de la microplaca usada. Las columnas 10–12 se usaron para los diferentes controles realizados para el control de esterilidad del medio se colocó 200 μL de caldo Mueller Hinton o Sabouraud; para el control negativo se colocó 180 μL de caldo Mueller Hinton o Sabouraud y se adicionó 20 μL agua destilada estéril y el control positivo se adicionó 20 μL de los antibióticos: gentamicina (1 mg/ mL) y tetraciclina (5 mg/mL) para bacterias para establecer su sensibilidad o resistencia en comparación con el documento M100 de CLSI (2017) y el antimicótico: itraconazol (1 mg/ mL) como antimicótico que se comparó el resultado con Arikan (2007).

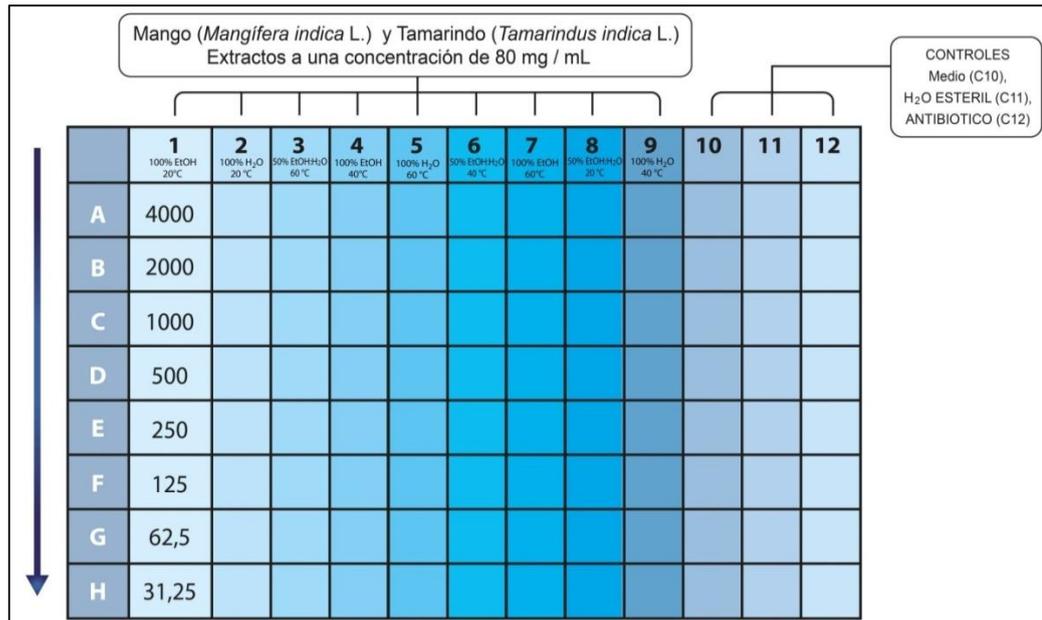


Figura 11. Microplaca de 96 pocillos con 12 columnas y 8 filas (A-H).

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

2.3.4.3. *Siembra de la microplaca*

Una vez preparada la microplaca, se procedió a la inoculación de 100 µL de la suspensión del inoculo en las columnas desde 1 a la 9 completando con ello un volumen final de 200 µL en la microplaca ajustando la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL y la fúngica a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Se selló y se incubó a 35°C por un periodo de 18-24 horas.

2.3.4.4. *Interpretación de resultados*

La lectura de resultados se hizo de manera visual y se indicó los valores de concentración mínima inhibitoria en la que el extracto inhibió el desarrollo bacteriano o fúngico. Se reportó como activo si el pocillo con el extracto a ensayar se observó transparente (ausencia de crecimiento); no activos cuando se visualizó turbidez o forma de botón al fondo del pocillo, igualmente con los controles (esterilidad y negativo). Los valores de CMI se los reportó en µg/mL y la dosis del extracto se categorizó desde 4000 a 31,25 µg/mL.

Para descartar el crecimiento bacteriano o fúngico presuntivo por visibilidad de turbidez o dificultad de interpretación, se utilizó el reactivo bromuro de tiazolil blue tetrazolium (MTT), adicionando 20 µL de la solución de 25 mg/mL en los pocillos presuntivos, y se incubó la microplaca a 35 °C durante 30 min, y la presencia de crecimiento microbiano se detecta por la reducción del MTT, el cual toma una coloración violeta en el caldo, y si no hay cambio de color existe como una ausencia de crecimiento microbiano (Pierre et al., 2014).

**CAPÍTULO 3:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1. Rendimiento de los extractos

En la **Tabla 5**, se resaltan los porcentajes con mayor rendimiento alcanzados de los extractos liofilizados de la cáscara y pulpa agotada de mango y de la vena de tamarindo, los cálculos para la obtención de cada extracto se indican en el **Anexo A**.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos de los subproductos de mango y tamarindo.

Solvente de extracción	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	
		Mango	Tamarindo
Etanol	20	23,31	16,21
	40	22,89	22,94
	60	23,33	28,15
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	19,32	33,42
	40	31,49	26,73
	60	51,36	28,35
Agua	20	12,86	19,03
	40	23,53	16,21
	60	53,66	36,51

Fuente: La autora.

Elaboración: La autora.

El extracto acuoso a 60°C tuvo un mayor rendimiento en los dos subproductos. El rendimiento del extracto de mango (etanol-agua/60°C) fue de 51,36%, siendo superiores que los reportados por (Dorta, 2014; Ling et al., 2009) utilizando una mezcla (etanol-agua) obtuvieron un rendimiento del 20% y con el solvente etanol un rendimiento de 14% en cáscara de mango, resultados que son cercanos a los del presente estudio (23,33%). Valores menores fueron encontrados en un estudio previo en extracto etanólico de mango a una maceración de 10 días a 25°C, en la variedad Tommy Atkins con rendimiento de 11,67% en cáscara y 17% en pulpa (Vega-Vega et al., 2013), nuestros resultados son mayores por la utilización de cáscara y pulpa agotada con un rendimiento de 23,31% y de 23,33% a una maceración (90 min) a 20°C y 60°C.

En el estudio de Bbosa, Kyegombe, Ogwal-Okeng, Bukenya-Ziraba, Odyek, & Waako (2007) un rendimiento en extracto acuoso del 2,25% y un 3,88% en extracto etanólico obtenidos a 20°C con una maceración de 72 horas en hojas secas de mango; y finalmente Ling, Yap, Radhakrishnan, Subramaniam, Cheng, & Palanisamy, (2009), reportó un rendimiento de 9,1% y 7,1% de extracto etanólico y acuoso obtenidos a 40°C y utilizando una maceración durante 24 horas en hojas secas de mango. Varios estudios en la fruta del mango mencionan que el disolvente, la polaridad del disolvente y su temperatura de extracción influyen significativamente

puesto que utilizando piel y semilla del mango están presentes compuestos fenólicos los cuales tienen actividad antimicrobiana o antioxidante; además que a temperaturas altas de extracción se favorece la eficiencia de extracción, en el cual aumenta la difusión y solubilidad de los compuestos en el disolvente (Dorta, 2014; Ling et al., 2009).

El mejor rendimiento en vena de tamarindo fue de 36,51% (agua/60°C) valores mayores a los nuestros fueron reportados Doughari (2006) utilizando diferentes solventes y diferentes partes de la planta obtuvieron rendimientos con etanol 17% y agua 51% de polvo de corteza de tallo, así mismo, en polvo de hojas de tamarindo 19% en extracto etanólico y 49% en extracto acuoso a 35°C mantenido con una maceración de 24 horas. También se reportaron diferentes rendimientos en el estudio de Nwodo, Obiiyeke, Chigor & Okoh (2011) que utilizaron diferentes partes (hojas, corteza de tallo y pulpa) de la planta de tamarindo en extractos acuosos (40°C) con un rendimiento en pulpa (13,1%) nuestros resultados mostraron valores mayores de 16,21% en rendimiento utilizando la vena del tamarindo.

Estudios previos en la planta del tamarindo sugiere que la parte más desarrollada y madura del tamarindo es la corteza por lo cual pueden existir más compuestos fenólicos o pigmentos, como también que depende de la capacidad de extracción de compuestos fitoconstituyentes ya que depende de la solubilidad y polaridad del solvente (Doughari, 2006). También en trabajos citados sugieren que depende de la parte que se utiliza de la planta existiendo una desigualdad homogénea de los componentes bioactivos en las diferentes partes de la planta (Nwodo et al., 2011).

3.2. Actividad antimicrobiana

3.2.1. Método de difusión de agar

En la **Tabla 6** se resaltan los extractos de mango etanólicos y etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C, 40°C y 60°C, como también el acuoso a 60°C que mostraron una actividad inhibitoria frente a *Micrococcus luteus* con halos de $5,66 \pm 5,77$ a 8 ± 0 mm, según Almedia, Fonseca, Brandão, Mesquita, Smânia, Smânia Júnior, & Zani (2000) y Pastrana-Puche, Durango-Villadiego, & Acebedo-Correa (2017) catalogan resistentes a todos los resultados expuestos en la **Tabla 6**, además en extractos naturales de plantas se considera resistentes (<8mm), sensibles (9 a 14 mm), muy sensibles (14 a 19 mm) y extremadamente sensibles (>20 mm); los resultados expuestos son el promedio del triplicado de los halos de inhibición. Se observa que la cepa de *M. luteus*, es la que presenta actividad, aunque en los demás extractos de mango no hubo inhibición ante alguna cepa como se expone en el **Anexo B**.

Tabla 6. Halo de inhibición (mm) en los extractos obtenidos a diferentes temperaturas del subproducto de mango frente a cada cepa ensayada por el método de difusión en agar.

Microorganismo: <i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™		
Solvente de extracción	Temperatura (°C)	Promedio ± desviación estándar de los halos de inhibición (mm)
Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)		
Etanol	20	6,66 ± 5,77
	40	7,33 ± 5,77
	60	8 ± 0
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	7,66 ± 5,77
	40	7,66 ± 5,77
	60	8 ± 0
Agua	20	5 ± 0 (NI)
	40	5 ± 0 (NI)
	60	5,66 ± 5,77

El diámetro de la zona de inhibición está expresado en mm y del pocillo 5 mm.

NI: no produjo inhibición

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

Los extractos de tamarindo no presentaron actividad inhibitoria frente a las cinco cepas ensayadas, a diferencia del estudio de Doughari (2006) que utilizaron una concentración de 1000 mg/mL en extractos etanólicos de hojas de tallo, estos resultados están de acuerdo con Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) que catalogan los halos de inhibición de 6 mm como resistentes y en corteza de tallo como sensible a 23 mm frente a *E. coli*; también se utilizó hojas y corteza de tallo frente a *S. aureus* con 23 mm identificando como sensible, debido a que poseen componentes fitoquímicos como taninos, saponinas, sesquiterpenos y alcaloides (Doughari, 2006).

Según el estudio de Gupta, Prakash, & Gupta, (2014) realizaron extractos de pulpa de tamarindo con diferentes disolventes como: etanol, agua y etanol-agua este último considerado el mejor disolvente para extracción de constituyentes fitoquímicos. De acuerdo a Almedia et al. (2000), Gupta, Prakash, & Gupta, (2014) y Pastrana-Puche et al. (2017) denotan como muy sensibles (18 mm) frente a *Staphylococcus aureus*, sensibles (13 mm) frente *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, como también 12 mm frente a *Micrococcus luteus*. Estos resultados pueden deberse a componentes fitoquímicos presentes en la pulpa de tamarindo como taninos, terpenoides y ácido cítrico que en nuestro estudio pueden estar en bajas concentraciones ya que utilizamos la vena (Gupta et al., 2014).

En un estudio realizado por Bbosa et al. (2007) en hojas secas de mango utilizando una concentración de 100 mg/mL en extracto etanólico Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) catalogan muy sensibles (15 mm) frente *E. coli* y extremadamente sensibles (22 mm) frente a *S. aureus* y en extracto acuoso con 7mm reportado como resistencia frente *E. coli* y *S. aureus*. En nuestros estudios los resultados no se obtuvieron inhibiciones frente a *E. coli* y *S. aureus* utilizando una concentración de 80 mg/mL. Estudios realizados por Doughari & Manzana (2008) también utilizaron extractos de hojas secas con etanol-agua frente a *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. typhi*, *E. coli*, *S. flexneri*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *B. cereus*; reportando una menor actividad utilizando una concentración mayor de 250 mg/mL, debido a diversos grados de solubilidad de los fitoconstituyentes y la actividad del disolvente puede estar asociado con la presencia de aceites, cera, resinas, ácidos grasos o pigmentos que son capaces de bloquear los ingredientes activos del extracto la planta impidiendo que acceda a la pared celular.

Mientras que en un estudio previo de El-Gied et al. (2012) en extractos etanólicos de semillas de mango utilizando una concentración de 5 mg/mL, Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) catalogan en sensibles de 11 y 10 mm frente *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*, y como resistente frente *Bacillus cereus*; en nuestros resultados también obtuvimos resistencia en todos los extractos, debido a que las semillas de mango pueden estar en altas concentraciones de fitoconstituyentes como taninos, alcaloides, flavonoides, antraquinona, glucósidos y saponinas (El-Gied et al., 2012).

En estudios de Gupta, Garg, & Gupta (2010) utilizando agua como solvente, realizó extractos de pulpa inmadura de mango, Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) catalogan halos de inhibición como sensibles de 13 mm frente a *S. aureus*, 12 mm frente a *Bacillus mycoides* y *Staphylococcus epidermidis*, 11 mm frente a *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, 10 mm frente a *M. luteus* y *Bacillus subtilis*, 9 mm frente *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* y resistente de 8 mm frente a *Pseudomonas aeruginosa*. En nuestros estudios el extracto acuoso de mango a 60°C obtuvo un promedio de halos de inhibición de $5,66 \pm 5,77$ mm considerado como resistente, puede deberse a una mayor presencia de taninos y terpenos en pulpa inmadura de mango que en comparación a nuestro estudio se utilizó pulpa madura (Gupta, 2010).

También Gupta et al, (2010) realizó extractos de etanol al 50% de pulpa inmadura de mango, Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) reportan halos de inhibición como extremadamente sensibles de 26 mm frente a *S. aureus*, muy

sensibles de 14, 15, 17 y 19 mm frente a *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente; y sensible de 13 mm frente a *Micrococcus luteus*. Según Gupta et al., (2010) el disolvente etanol-agua es más adecuado para extracciones máximas de metabolitos, originando inhibición por el solvente, por lo que las bacteria gram positivas son más susceptibles en comparación con las gram negativas. En nuestro estudio se utilizó el mismo disolvente a las tres temperaturas, donde se obtuvo un promedio de $7,6 \pm 8$ mm alcanzando inhibición frente *M. luteus*, Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) catalogan como resistentes.

Gupta, Garg, & Gupta (2010) realizaron extractos de pulpa fresca de mango en etanol al 50% utilizando una concentración de 500 mg/mL, Almedia et al. (2000) y Pastrana-Puche et al. (2017) reportan halos de inhibición sensibles (13, 12 y 10 mm) frente a *Bacillus mycoides*, *S. aureus* y *M. luteus* y resistencia (8 mm) frente a *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* Gupta, Garg, & Gupta (2010) menciona que no encontró efectividad del extracto acuoso contra todas las bacterias alimenticias seleccionadas que causan la descomposición, con lo que concuerda con nuestros resultados en el extracto acuoso a 60°C con halo de inhibición de $5,66 \pm 5,77$ mm no hay significativo resultado Gupta, Garg, & Gupta (2010) menciona que el disolvente 50% de etanol es más adecuado para una extracción de metabolitos activos, como también que las bacterias gram positivas son más susceptibles que las cepas gram negativas. En nuestros resultados existe una actividad en la bacteria gram positiva *M. luteus* y utilizando el disolvente etanol-agua (50:50 v/v), ya que la utilización de disolventes orgánicos en la extracción de compuestos antimicrobiano depende de la polaridad y como por ejemplo el etanol no afecta de forma negativa su bioactividad contra especies bacterianas o fúngicas.

En la **Figura 12**, se muestra los halos de inhibición obtenidos de los extractos de mango a diferentes temperaturas los cuales estuvieron a una concentración de 80 mg/mL en agua destilada estéril probadas frente a *M. luteus*.

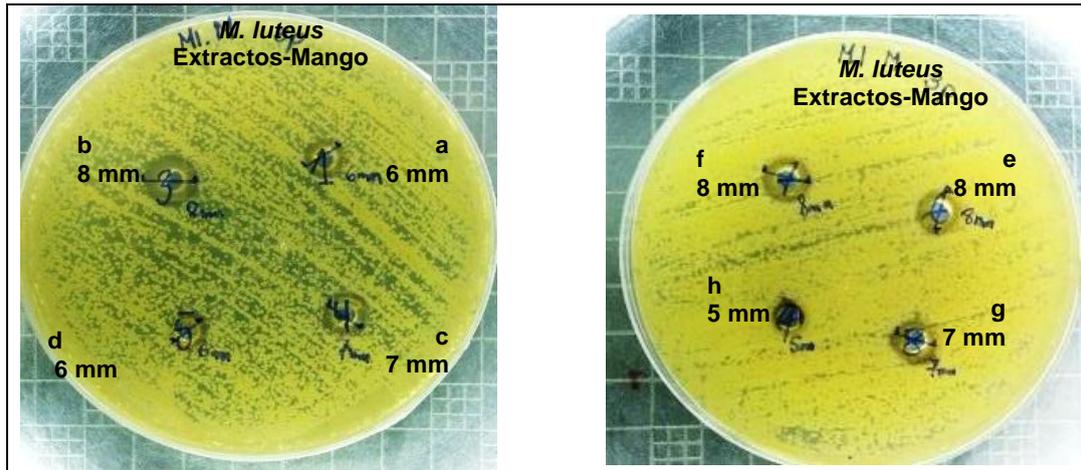


Figura 12. Halos de inhibición de extractos de mango: etanol a 40°C (c) y 60°C (f); agua a 20°C (a), a 40°C (h) y 60°C (d); etanol:agua (50:50 v/v) a 20°C (g), 40°C (e) y 60°C (b) frente a *M. luteus*.

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En el **Anexo C**, se muestran los resultados de los controles positivos empleados para difusión en agar para cada cepas, se los clasificó en sensible, intermedios y resistentes de acuerdo al halo de inhibición contra el microorganismo probado como: *S. aureus* se comprobó una sensibilidad para los tres antibióticos utilizados en el trabajo; *E. coli* presenta sensibilidad para Ampicilina y Amikacina, en Gentamicina una resistencia; *E. faecalis* se reporta una sensibilidad a Ampicilina, por otro lado Gentamicina y Amikacina no reporta M100 (CLSI, 2017); *M. luteus* no se encontró datos en el documento M100 (CLSI, 2017), sobre halos de inhibición referenciales para los antibióticos, no obstante en el trabajo de Vaghasiya, Patel, & Chanda (2011), la cepa *Micrococcus flavus* presenta sensibilidad con halo de inhibición de 20 mm frente a Amikacina (10 µg), 37 mm frente a Imipenem (10 µg), 26 mm frente a Tetraciclina (10 µg) y 21 mm frente a Ciprofloxacino (10 µg);. Además, para el hongo levaduriforme *C. albicans* Maroszyńska, Kunicka-Styczyńska, Rajkowska, & Maroszyńska (2013) reportan una sensibilidad para Nistatina 100U comparado con Nistatina 50 µg, El-Gied et al., (2012) catalogan extremadamente sensible (24 a 30 mm) contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* y resistencia para Voriconazol (1 µg), corroborado por Pfaller et al., (2005), que obtuvo resistencia para las cepas *C. rugosa*, *C. lipolytica* y *C. zeylanoides*.

3.1.1. Microdilución en caldo

En el **Anexo D**, se manifiestan los resultados de los extractos de mango y tamarindo frente a *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *C. albicans* de los cuales, no se evidenció actividad inhibitoria.

Los extractos de mango frente a *M. luteus* presentaron una actividad antimicrobiana,

Holetz, Pessini, Sanches, Cortez, Nakamura, & Dias Filho (2002) reportan que para extractos de plantas en los cuales toma los valores de CMI para evaluar la actividad antimicrobiana si es inferior a 100 µg/ml es buena; de 100 a 500 µg/ml es moderada; de 500 a 1000 µg/ml es débil; más de 1000 µg/ml el extracto es considerado inactivo. En los extractos etanólicos a 20°C, 40°C, etanol-agua (50:50 v/v) a 60°C y agua a 40°C y 60°C exhibieron una CMI de 4000 a 2000 µg/mL, los cuales son considerados inactivos; por otro lado, los extractos etanólicos a 60°C y etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C y 40°C presentaron una CMI de 1000 µg/mL, catalogada como débil. Los extractos de tamarindo etanólicos a 20°C, 40°C y 60°C y etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C y 60°C mostraron una CMI de 4000 µg/mL, considerados como inactivos (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de mango y tamarindo frente a cada microorganismo ensayado mediante el método de microdilución en caldo.

Microorganismo: <i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™			
Solvente de extracción	Temperatura (°C)	Concentración mínima inhibitoria-CMI (µg/mL)	
		Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)
Etanol	20	2000	4000
	40	4000	4000
	60	1000	4000
Etanol-agua (50:50 v/v)	20	1000	NI
	40	1000	4000
	60	2000	4000
Agua	20	NI	NI
	40	4000	NI
	60	2000	NI

NI: No produjo Inhibición

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

En estudios de Bbosa et al., (2007) evaluó los extractos etanólicos y acuosos de hojas secas de mango frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* logrando valores de CMI de 5481,30 a 43750.00 µg/mL y 18750.00 a 87500.00 µg/mL utilizando una concentración de 100 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, en el estudio de Doughari & Manzara (2008) evaluó extractos metanólicos de las hojas secas de mango que obtuvo una CMI de 125000 µg/mL frente a *Shigella flexneri* y 175000 µg/mL frente a *Salmonella typhi*. De acuerdo a Holetz et al., (2002), catalogan la actividad antimicrobiana de los estudios citados en inactiva, debido a la similitud de sus valores altos de CMI pues de acuerdo al estudio de Doughari & Manzara (2008) estos valores indican la falta de

eficacia de los extractos de las plantas frente a las bacterias utilizadas y/o en la posibilidad que las bacterias tengan la capacidad de desarrollar resistencia contra los extractos de plantas. Los estudios citados concuerdan con nuestros resultados se obtuvieron en extractos etanólicos a 20°C, 40°C, etanol-agua (50:50 v/v) a 60°C y agua a 40°C y 60°C exhibieron una CMI de 4000 a 2000 µg/mL. Estos resultados puede deberse a que la actividad antibacteriana de los extracto de etanol posean compuestos como alcaloides, antracenosidos, cumarinas, flavononas, azúcares, taninos, esteroides y saponinas (Bbosa et al., 2007).

En los estudios de Gupta, Garg, & Gupta (2010), evaluó los extractos etanólicos (50%) de la pulpa inmadura de mango (amchur), frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus* obteniendo valores de CMI de 250000 µg/mL, 125000 µg/mL y 500000 µg/mL, respectivamente. De acuerdo a Holetz et al., (2002), los resultados del estudio se encuentran con valores elevados de CMI, clasificándolos en un rango inactivo que concuerdan con nuestros resultados de los extractos etanólicos a 20°C y 40°C que mostraron una CMI de 2000 y 4000 µg/mL, respectivamente. Estos resultados puede deberse a que las bacterias gram positivas son más susceptibles en comparación que las gram negativas, debido a la composición química y la estructura de la pared celular de ambos tipos de microorganismos (Gupta, Garg, & Gupta, 2010).

En un estudio previo Kabuki Nakajima, Arai, Ueda, Kuwabara, & Dosako (2000), reportó que el extracto etanólico de semillas de mango, Holetz et al., (2002) catalogan una actividad antimicrobiana inactiva de acuerdo a su CMI 2500 µg/mL frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, asimismo 1000 µg/mL es inactivo frente a *Staphylococcus aureus*; por otro lado 500 µg/mL es considerado moderado frente a *Bacillus cereus*, finalmente 100 µg/mL y <50 µg/mL se reportan como buenos frente a *Campylobacter jejuni* y *Clostridium botulinum*, respectivamente. En el estudio de Doughari & Manzara (2008), menciona que la actividad antimicrobiana con bajas concentraciones de CMI frente a las bacterias representan que la planta tiene el potencial de tratar con eficacia cualquier enfermedad que este asociada con los patógenos involucrados. A su vez el estudio Kabuki et al., (2000), sugiere que el extracto etanólico de semillas de mango es más eficaz para bacterias gram positivas, por el contenido de compuestos fitoquímicos generando un efecto sinérgico, por el contenido de sus compuestos fitoquímicos, los cuales tienen capacidad de penetrar a la membrana celular, interactuar con su metabolismo y su material genético.

En el estudio de Gupta, Prakash, & Gupta, (2014) evaluó el extracto acuoso (50%)

de pulpa de tamarindo utilizando una concentración de 500 mg/mL , de acuerdo a Holetz et al., (2002) catalogan una actividad antimicrobiana considerada como inactiva de acuerdo a su CMI de 500000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, como también inactivo 100000 µg/mL frente a *Micrococcus luteus*; la diferencia está en que las bacterias gram positivas tienen la presencia de un alto contenido de lípidos en las paredes celulares como por ejemplo la bacteria *S. aureus* que contiene ácido teicoico en la capa de peptidoglucano, las cuales son inhibidas por los extractos de tamarindo, por otro lado los compuestos fitoquímicos bioactivos como: terpenoides, taninos y ácido cítrico alteran la permeabilidad de la pared celular causando daño y, por lo tanto, muerte celular (Cowan, 1999; Gupta et al., 2014). Por otro lado la membrana externa de bacterias gram negativas presenta una barrera a la penetración de numerosas moléculas de antibióticos, y el espacio periplásmico contiene enzimas, que son capaces de descomponer las moléculas extrañas introducidas desde el exterior, proporcionando así una mayor resistencia a ellas (Gupta et al., 2014).

En estudios de Escalona (2011) en extractos acuosos de hojas secas de tamarindo de acuerdo a Holetz et al., (2002) reportan como inactivo una CMI de 38000 a 75000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente; debido a que posee compuestos fenólicos en las hojas como: las flavonas vitexina, isotexina, orientina y isoorientina. En este estudio se evidenció una correlación entre el crecimiento bacteriano y la concentración de compuestos empleados para obtener una inhibición bacteriana, además se evidencio una dependencia de la cantidad presente de compuestos fenólicos debido a sus mecanismos de acción en la formación de complejos solubles y extracelulares en la pared celular, así propiciando una alteración en la composición de la membranas y en el metabolismo de la célula bacteriana. En nuestros estudios los extractos etanol y etanol-agua en tamarindo a 40°C y 60°C presentaron una CMI de 4000 µg/mL, como también a la temperatura de 20°C reportándose como inactivos frente a *M. luteus*.

En el presente estudio Doughari, (2006) en extractos etanólicos de corteza de tallos de tamarindo se catalogan como inactivos obtuvo valores de CMI 10000 µg/mL frente *Shigella flexneri* y una CMI 20000 µg/mL frente a *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* son catalogados como inactivos de acuerdo a Holetz et al., (2002).

El extracto etanólico se le puede atribuir su actividad antibacteriana por sus componentes fitoquímicos tales como taninos, flavonoides y alcaloides siendo un factor importante en corteza de tallo a diferencia de hojas por poseer menos

pigmentos y otros compuestos fenólicos que interfieren en la actividad antimicrobiana de los extractos. El uso de solventes como etanol, etanol-agua y agua tienen diferentes efectos a la hora de extraer fitoconstituyentes debido a la solubilidad o polaridad del solvente (Doughari, 2006).

Dorta, González, Lobo, & Laich, (2016) menciona que utilizando los dos métodos *in vitro*, no se observa una correlación significativa entre ellas especialmente en especies de levaduras, las cuales puede ser más susceptibles o resistentes en el ensayo de difusión en agar siendo diferentes en el método de microdilución, lo cual sugiere que el nivel de sensibilidad de las especies a los extractos está condicionado a las condiciones de cultivo. Por otro lado los valores altos de CMI indican que los extractos de plantas son menos efectivos en algunas bacterias gram positivas o que el organismo tiene el potencial de desarrollar resistencia a los antibióticos, mientras que los valores bajos de CMI para otras bacterias son una indicación de la eficacia de los extractos vegetales (Doughari, 2006).

Se muestran los resultados de los controles positivos (**Tabla 8**) que se probaron frente a las cuatro bacterias y el hongo levaduriforme, para categorizar sensibilidad, intermedio y resistencia frente a los antibióticos y antifúngicos utilizados en el trabajo los cuales fueron analizados con fichas bibliográficas.

Tabla 8. Resultados de controles positivos para las diferentes cepas utilizando el método de microdilución en caldo.

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)	Clasificación	Antibiótico	Categoría Interpretativa (µg/mL)		
				Referenciales		
				S	I	R
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	0,39	NR	Gentamicina (1 mg/mL) *	SR	SR	SR
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	0,39	S	Gentamicina (1 mg/mL) *	≤ 4	8	≥ 16
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	0,39	S				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	1,95	S	Tetraciclina (5 mg/mL) *	≤ 4	8	≥ 16
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	25	R	Itraconazol (1mg/mL) **	≤0,125	NR	≥ 1

S: Sensible

R: Resistencia

I: Intermedio

NR: No Referencia

* M100, (CLSI, 2017),

** Arian, (2007).

Fuente: La autora

Elaboración: La autora

De acuerdo con los datos expuestos por el documento M100 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing) de (CLSI, 2017) se realizó la comparación con nuestros resultados *E. coli* y *S. aureus* presentaron sensibilidad frente al antibiótico Gentamicina, mientras que para *M. luteus* no se encontró datos de sensibilidad o resistencia en el documento ya mencionado frente a Gentamicina y *E. faecalis* presentó sensibilidad frente a Tetraciclina. En la levaduriforme *C. albicans* se obtuvo resistencia contra Itraconazol.

CONCLUSIONES

- ✓ Los mejores rendimientos fueron en los extractos acuosos del subproducto de mango y tamarindo a 60°C obteniendo un 53,66 g/mL y 36,51g/mL, respectivamente.
- ✓ Se determinó que los extractos del subproducto de mango presentaron una mayor actividad antimicrobiana a los de tamarindo.
- ✓ Los extractos de mango etanol-agua (50:50 v/v) presentaron un promedio de halos de inhibición de 7,66 a 8 mm, considerados como resistentes.
- ✓ Los extractos de mango etanólicos a 40°C y etanol-agua (50:50 v/v) a 20°C y 40°C presentaron una CMI de 1000 µg/mL frente a *Micrococcus luteus*, teniendo actividad antimicrobiana débil, considerándolos un aporte significativo para el desarrollo de ingredientes alimentarios.
- ✓ Los extractos de etanol, agua y etanol-agua (50:50 v/v) de subproducto de tamarindo no presentaron actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* y *C. albicans* mediante la técnica de difusión en agar.
- ✓ Los extractos de tamarindo etanólicos y etanol-agua (50:50 v/v) a 40°C y 60°C presentaron una CMI de 4000 µg/mL frente a *Micrococcus luteus*, considerado con actividad antimicrobiana inactiva, considerándolos un aporte significativo para el desarrollo de ingredientes alimentarios.

RECOMENDACIONES

- ✓ Para nuevas investigaciones se recomienda determinar los componentes fitoquímicos de los extractos de mango y tamarindo.
- ✓ se debería de aprovechar de mejor manera los extractos de mango en la industria alimentaria.
- ✓ Utilizar otros solventes con otras polaridades para asegurar un mejor rendimiento de compuestos fenólicos.
- ✓ Probar los extractos a mayor concentración y en cepas de interés alimentario.

BIBLIOGRAFIA

- Abad, A. X. (2009). Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (Matico), *Lepechinia mutica Benth* (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena-Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial. Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1862>
- Ágreda, I. S. (2011). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Iresina herbstii por el método de difusión en agar*. Universidad Nacional de Loja.
- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., & Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista BIOTecnia, Universidad de Sonora*. México. 8(2), 16–22. <http://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Ajila, C. M., Aalami, M., Leelavathi, K., & Rao, U. P. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 219–224. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.004>
- Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, W. E., Procop, G. W., Schreckenberberg, P. C., Winn, W. C., & Woods, G. L. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas color* (6ta. Edici). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Almedia, T. M. A., Fonseca, A. S., Brandão, M., Mesquita, T. S. M., Smânia, E. D. F. A., Smânia Júnior, A., & Zani, C. L. (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 95(3), 367–373.
- Alvarez, M. V., Boquet, E., & Fez, M. I. (1996). *Manual de técnicas en Microbiología Clínica*. (V. Niño, H, Ed.) (2da. Edici). Quito-Ecuador: Asociación Española de Farmaceuticos Analistas.
- ANDES, Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica. (2016). Ecuador pone en marcha un plan para potenciar producción y exportación del mango - ANDES. Retrieved July 25, 2017, from <http://www.andes.info.ec/es/noticias/ecuador-pone-marcha-plan-potenciar-produccion-exportacion-mango.html>
- Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, 45(November), 569–587. <http://doi.org/10.1080/13693780701436794>
- Ashoush, I. S., & Gadallah, M. G. E. (2011). Utilization of mango peels and seed kernels powders as sources of phytochemicals in biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 35–42.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Dominguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Wasim Siddiqui, M. D., ... Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44, 1866–1874. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ...

- Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bbosa, G. S., Kyegombe, D. B., Ogwal- Okeng, J., Bukenya- Ziraba, R., Odyek, O., & Waako, P. (2007). Antibacterial activity of *Mangifera indica* (L.). *African Journal of Ecology.Afr. J. Ecol.*, 45(Suppl.1), 13–16. Retrieved from http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46617663/Antibacterial_activity_of_Mangifera_indi20160619-12352-1jj4p2u.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1500997614&Signature=2SatW%2FSj9gqKXzQLq0sJdcfRXNM%3D&response-content-disposition=inlin
- Braca, A. (2008). Estudio Químico Biológico de Plantas Medicinales–Flora Ecuatoriana. *Curso teórico dictado en la Escuela Politécnica Del Ejército*.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*. 26.ed. (Mc Grow Hi). Mexico. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=QbPrBgAAQBAJ&pgis=1>
- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., & Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del Extracto Etanólico y del Aceite Esencial de Hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 17(2), 149–154. <http://doi.org/ISSN 0121-4004/ISSNo 2145-2660>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. *Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006*, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 W.
- CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017*, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 W.
- Corrales-Bernal, A., Maldonado, M. E., Urango, L. A., Franco, M. C., & Rojano, B. A. (2014). Mango de azúcar (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. *Revista Chilena de Nutrición*, 41(3), 312–318.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents, 12(4), 564–582.
- Dorta, E. (2014). Obtención de extractos con elevada actividad antioxidante y/o antimicrobiana a partir de piel y semilla de mango. *Universidad de La Laguna*.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., & Laich, F. (2016). Antifungal activity of mango peel and seed extracts against clinically pathogenic and food spoilage yeasts.

- Dorta, E., Lobo, M. G., & Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 71(1), 80–89. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x>
- Doughari, J. H. (2006). Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 597–603. <http://doi.org/10.4314/tjpr.v5i2.14637>
- Doughari, J. H., & Manzara, S. (2008). *In vitro* antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. *African Journal of Microbiology Research*, 2(4), 67–72.
- Dueñas, J. C. (2009). *Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas*. Escuela Superior Politécnica del Ecuador.
- El-Gied, A. A. A., Joseph, M. R., Mahmoud, I. M., Abdelkareem, A. M., Al Hakami, A. M., & Hamid, M. E. (2012). Antimicrobial activities of seed extracts of mango (*Mangifera indica* L.). *Advances in Microbiology*, 2(1), 571–576. <http://doi.org/10.4236/aim.2012.24074>
- Encalada, W. G. (2011). *Diseño de planta para la elaboración de caramelos a base de tamarindo (Tamarindus indica) con ají (capsicum Annuum) en la ciudad de Quito*. Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. UDLA. Quito. 1-198.
- Escalona, J. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de Tamarindus indica L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria*. Universidad de Oriente de Cuba. Retrieved from http://tesis.repo.sld.cu/355/1/Julio_César_Escalona.pdf
- Estrada, S. P. (2010). *Determinación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de Romero (Rosmarinus officinalis y Tomilla) y Tomillo (Thymus vulgaris)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Fernández Fernández, F. J., De la Fuente Aguado, J., Rubianes González, M., Pérez Fernández, S., Álvarez Fernández, M., Nodar Germinas, A., Sopeña Pérez-Argüelles, B., & Martínez Vázquez, C. (2004). Bacteriemia por *Enterococcus faecalis*. *Revista Clínica Española*, 204(5), 244–250. <http://doi.org/https://doi.org/10.1157/13061409>
- Galán, V. (2009). *El cultivo del mango*. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias.
- Garrido, I., Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2007). Extracción de antioxidantes a partir de subproductos del procesado de la almendra. *Rev. Grasas Y Aceites*, 58(2), 130–135.
- Gómez de Zea, R. (1994). *La comercialización de mango fresco en el mercado norteamericano*. Lima-Perú: Univerdiad del Pacifico.
- González-Palomares, S. (2009). Determinación de compuestos aromáticos en tamarindo (*Tamarindus indica* L.) mediante dos métodos de extracción. *Unacar Tecnociencia*, 3, 29–39.

- González, D. (2013). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- González, M., & González, V. (2010). Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. *Analytical Methods*, 2(12), 1842–1866. <http://doi.org/10.1039/c0ay00361a>
- Gupta, C., Garg, A. P., & Gupta, S. (2010). Antimicrobial and phytochemical studies of fresh ripe pulp and dried unripe pulp of *Mangifera indica* (AMCHUR). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5(2), 75–80.
- Gupta, C., Prakash, D., & Gupta, S. (2014). Studies on the antimicrobial activity of Tamarind (*Tamarindus indica*) and its potential as food bio-preservative. *International Food Research Journal*, 21(6), 2437–2441.
- Gutiérrez-Martínez, M. J., Araiza-Santibáñez, J., Hernández, M. A., Chávez-Mayol, J. M., Rodríguez-Piñeyro, O. M., & Bonifaz, A. (2012). Estudio *in vitro* de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital general de México OD. *Dermatología Revista Mexicana*, 56(2), 93–101.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125–126.
- Hernández-Estrada, A., & González-Palomares, S. (2010). Galletas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.). *U. Tecnociencia*, 4(1), 16–22. Retrieved from http://www.unacar.mx/contenido/tecnociencia/tecnociencia6/tema_2_galletas_tamarindo.pdf
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–1031.
- Kabuki, T., Nakajima, H., Arai, M., Ueda, S., Kuwabara, Y., & Dosako, S. I. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, 71(1), 61–66. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00126-6](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00126-6)
- Komutarin, T., Azadi, S., Butterworth, L., Keil, D., Chitsomboon, B., Suttajit, M., & Meade, B. J. (2004). Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 42(4), 649–658.
- Ling, L. T., Yap, S. A., Radhakrishnan, A. K., Subramaniam, T., Cheng, H. M., & Palanisamy, U. D. (2009). Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, 113(4), 1154–1159. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.004>
- López-Malo, A. (2000). *La preservación multiobjetivo de alimentos: Efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de Aspergillus flavus*. Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2011). Antioxidant activity, fatty acid profile and tocopherols of *Tamarindus indica* L. seeds. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31(2), 497–501.
- Marco, J. A., & Mann, J. (2006). *Química de los productos naturales. Síntesis*.
- Marín, F. R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100(2), 736–741. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>
- Maroszyńska, M., Kunicka-Styczyńska, A., Rajkowska, K., & Maroszyńska, I. (2013). Antibiotics sensitivity of *Candida* clinical and food-borne isolates. *Acta Biochim Pol*, 60, 719–724.
- Martínez, J. A. (2017). *Evaluación del efecto bactericida del extracto de romero (Rosmarinus officinalis) in vitro en cepa certificada de Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Ambato.
- Martínez Morales, E. (2016). *Calidad fenólica de los subproductos de mango*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Masibo, M., & He, Q. (2009). Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties—A Review. *Food Reviews International*, 25(4), 346–370. <http://doi.org/10.1080/87559120903153524>
- Medina, J., & De La Cruz, G. H. S. (2002). Mango post-harvest operations organization. *Instituto Tecnológico de Veracruz*.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145–171. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- Muthuswamy, S., Rupasinghe, H. P. V., & Stratton, G. W. (2007). Antimicrobial effect of cinnamon bark extract on *Escherichia coli* O157: H7, listeria innocua and fresh-cut apple slices. *Journal of Food Safety*, 28(4), 534–549.
- NCCLS. (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition*.
- Nwodo, U. U., Obiyeke, G. E., Chigor, V. N., & Okoh, A. I. (2011). Assessment of *Tamarindus indica* extracts for antibacterial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6385–6396. <http://doi.org/10.3390/ijms12106385>
- Olivares, C., & Santos, S. (2015). *Determinación de parámetros adecuados para la obtención de néctar a partir de tamarindo (Tamarindus indica L.)*. Facultad de Ingeniería Industrial. Universidad Nacional de Piura.
- Olivera, E. M. (2012). *Evaluación de subproducto obtenido en la elaboración de jugos de mango y guayaba como fuente de fibra antioxidante*. Facultad de Química.

Universidad Autónoma de Querétaro.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2017). *Inocuidad de los alimentos*. WHO. World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

Páez-Peñuñuri, M. E., Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F. J., Villegas-González, R. B., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2016). Compuestos bioactivos y propiedades saludables del Tamarindo (*Tamarindus indica* L)/ BIOACTIVE COMPOUNDS AND HEALTH PROPERTIES OF TAMARIND (*Tamarindus indica* L). *BIOtecnia*, 18(1), 10–21. <http://doi.org/10.18633/bt.v18i1.241>

Pastrana-Puche, Y. I., Durango-Villadiego, A. M., & Acebedo-Correa, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Bioteología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 15(1), 56–65.

Paute, A. B. (2016). *Optimización de la extracción de antioxidantes en subproducto de tamarindo (Tamarindus indica L.)*. Universidad Técnica Particular de Loja.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Rinaldi, M. G., Barnes, R., Hu, B., Veselov, A. V., ... Group, G. A. S. (2005). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5848–5859. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1440>

Pierre, S., Gatsing, D., Teke, G., Cheseto, X., Talom, B., Kuate, J., & Torto, B. (2014). Chemical constituent, antibacterial and antioxidant activity of crude extract and oil fraction of *L. Abyssinica*. *International Journal of Phytomedicine*, 6(2), 170–176.

PROEcuador, Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones & Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. (2012). Análisis Sectorial de frutas no tradicionales. Retrieved July 24, 2017, from http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC_AS2012_FRUTAS.pdf

Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2(42), 263–268.

Ray, B., & Bhunia, A. (2010). Fundamentos microbiológicos de los alimentos. *Editorial Mc Graw Hill, México*, 18.

Restoy, G. A., Ruiz, R. E., & Arechavaleta, J. A. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana de la *Escherichia coli* aislada en pacientes con sepsis urinaria alta. *Revista Médica Electrónica*, 28(5), 391–396. Retrieved from <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/317>

Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina [Resistance to “last resort” antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era] Sandra. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 34 Suppl 1(1), 191–208. <http://doi.org/10.1590/S0120-41572014000500022>

Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de

- frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Médica Panamericana.
- Rueda, A. (2008). Estudio de casos: cadena de valor para la agroexportación de mango (*Mangifera indica*) variedad Tommy Atkins desde Guatemala hacia Europa. *Bachelor's Thesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana 2012*.
- Sabalet, T. (2010). Enterococcus. Retrieved from <http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/enterococcus.html>
- Santana, L. J. (2010). *Perfil de resistencia bacteriana de infecciones urinarias en pacientes embarazadas atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia del Hospital Provincial General Docente Riobamba durante el periodo enero-diciembre 2008*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Soto, C. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de las espigas de la planta de chía*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Srinivasan, V., Nguyen, L. T., Headrick, S. I., Murinda, S. E., & Oliver, S. P. (2007). Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and O157: H7– from different origins. *Microbial Drug Resistance*, 13(1), 44–51. <http://doi.org/10.1089/mdr.2006.9996>
- Sumaya-Martínez, M. T., Sánchez Herrera, L. M., Torres García, G., & García Paredes, D. (2012). Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 16(30), 826–833.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tapia, J. (2012). “Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y subextractos clorofórmico y etéreo de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*.” Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.
- Unnisa, N., Tabassum, H., Ali, M. N., & Ponia, K. (2012). Evaluation of antibacterial activity of five selected fruits on bacterial wound isolates. Pomegranate (*Punica granatum* L.). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), 531–546.
- Usó, J., Gil, M., Gomila, B., & Tirado, M. (2003). Endocarditis due to *Micrococcus luteus*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 21(2), 116–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586038>
- Vaghasiya, Y., Patel, H., & Chanda, S. (2011). Antibacterial activity of *Mangifera indica* L. seeds against some human pathogenic bacterial strains. *African Journal of Biotechnology*, 10(70), 15788–15794. <http://doi.org/10.5897/AJB10.632>
- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D., & Stampar, F. (2005). Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(10), 1687–1694. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2113>
- Vega-Vega, V., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Bernal-Mercado, A. T., González-Aguilar, G. A., Ruíz-Cruz, S., ... Ayala-Zavala, J. F. (2013). Antimicrobial

and antioxidant properties of byproduct extracts of mango fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86, 205–211.
<http://doi.org/10.5073/JABFQ.2013.086.028>

Yepes, S. M., Montoya Naranjo, L. J., & Orozco Sánchez, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales–frutas–en medellín y el sur del valle del aburrá, colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(1), 4422–4431.

ANEXOS

Anexo A. Determinación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir del subproducto de mango y tamarindo

Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)					
Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Subproducto "a" (g)	Solvente (mL)	Extracto liofilizado "b" (g)	Rendimiento (%)
Etanol	20	11,5042	230	2,6818	23,31
	40	15,0073	300	3,4359	22,89
	60	12,5011	250	2,9167	23,33
Etanol-Agua (50:50 v/v)	20	5,2505	105	1,0144	19,32
	40	6,0068	120	1,8913	31,49
	60	5,2545	105	2,6989	51,36
Agua	20	7,5007	150	0,9643	12,86
	40	5,2506	105	1,2355	23,53
	60	5,0059	100	2,6863	53,66

Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)					
Solvente de extracción	Temperatura de extracción (°C)	Subproducto "a" (g)	Solvente (mL)	Extracto liofilizado "b" (g)	Rendimiento (%)
Etanol	20	20,0677	325	3,2527	16,21
	40	20,0716	325	4,6047	22,94
	60	20,0401	325	5,6417	28,15
Etanol-Agua (50:50 v/v)	20	20,1038	325	6,7187	33,42
	40	20,0463	325	5,3587	26,73
	60	20,0026	325	5,6700	28,35
Agua	20	20,0450	325	3,8154	19,03
	40	20,0683	325	3,2527	16,21
	60	20,0584	325	7,3241	36,51

La fórmula aplicada para la determinación del rendimiento es: $\% = \left(\frac{b}{a}\right) * 100$

Dónde:

%= porcentaje de rendimiento.

a= peso inicial del subproducto (g).

b= peso del extracto liofilizado (g).

Reemplazando los valores obtenidos en el primer rendimiento es:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{2,6818}{11,5042}\right) * 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 23,31$$

Anexo B. Método de Difusión en Agar: tamaño del halo de inhibición en mm de las cepas bacteriana frente a los extractos liofilizados de los subproductos de mango y tamarindo. (3 repeticiones)

B1. Halos de inhibición en solvente de extracción etanol

Microorganismo	Difusión en agar (mm)														
	Etanol														
	20 °C	Prom.	±Desv.Est.	40°C	Prom.	±Desv.Est.	60°C	Prom.	±Desv.Est.						
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)														
	7	7	6	6,66	0,57	7	8	7	7,33	0,57	8	8	8	8	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0

<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0

B2. Halos de inhibición en solvente de extracción agua

Microorganismo	Difusión en agar (mm)														
	Agua														
	20 °C	Prom.	±Desv.Est.	40°C	Prom.	±Desv.Est.	60°C	Prom.	±Desv.Est.						
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	6	6	5,66	0,57
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)														
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5

B3. Halos de inhibición en solvente de extracción etanol:agua (50:50 v/v)

Microorganismo	Difusión en agar (mm)													
	Etanol:Agua													
	20 °C	Prom.	±Desv.Est.	40°C	Prom.	±Desv.Est.	60°C	Prom.	±Desv.Est.					
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)													
	8	8	7	7,66	0,57	8	7	8	7,66	0,57	8	8	8	8
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)													
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5
<i>Staphylococcus</i>	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)													

<i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)															
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	
	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)															
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)															
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)															
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)															
	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	

Anexo C. Resultados de halos de inhibición de controles positivos contra las cepas estudiadas.

C1. Promedio \pm desviación estándar de antibióticos y antimicóticos

Microorganismo	Antibiótico en disco	Halos de inhibición (mm)		Prom.	\pm Desv. Est.	Halos de inhibición (mm) Referenciales*		
						S	I	R
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 10240™	Gentamicina (10 μ g) BBL™	25	25	25	0	NR	NR	NR
	Ampicilina (10 μ g) BBL™	42	42	42	0	NR	NR	NR
	Amikacina (30 μ g) BBL™	28	28	28	0	NR	NR	NR
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Gentamicina (10 μ g) BBL™	12	12	12	0	≥ 15	13-14	≤ 12
	Ampicilina (10 μ g) BBL™	22	22	22	0	≥ 17	14-16	≤ 13
	Amikacina (30 μ g) BBL™	20	19	19,5	0,70	≥ 17	14-16	≤ 13
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC® 25923™	Gentamicina (10 μ g)	19	19	19	0	≥ 15	13-14	≤ 12
	Ampicilina (10 μ g) BBL™	43	43	43	0	≥ 29	NR	≤ 28
	Amikacina (30 μ g) BBL™	18	18	18	0	≥ 17	14-16	≤ 13
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	Gentamicina (10 μ g) BBL™	9	9	9	0	NR	NR	NR
	Ampicilina (10 μ g) BBL™	28	28	28	0	≥ 17	NR	≤ 16
	Amikacina (30 μ g) BBL™	6	6	6	0	NR	NR	NR
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Nistatina (100 U) OXOID Ltd.	16	16	16	0	≥ 15	10-14	SH
	Voriconazol (1 μ g) OXOID Ltd.	7	7	7	0	≥ 17	14-16	≤ 13

S: sensible

R: resistente

I: Intermedio

NR: No reporta

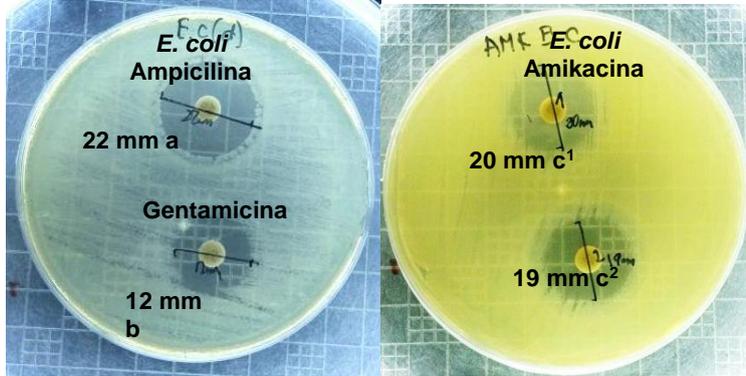
SH: Sin Halo

*M100, (CLSI, 2017) (antibiótico)

Maroszynska (2013) (antifúngico)

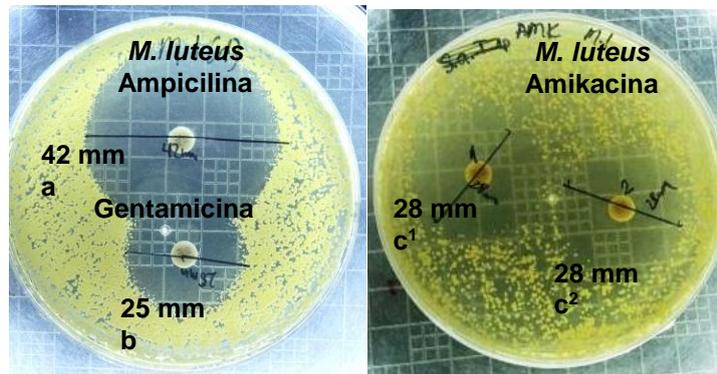
Pfaller et al., (2005) (antifúngico)

C2. Halos de inhibición en difusión en agar de antibióticos frente a *Escherichia coli* ATCC® 43888™



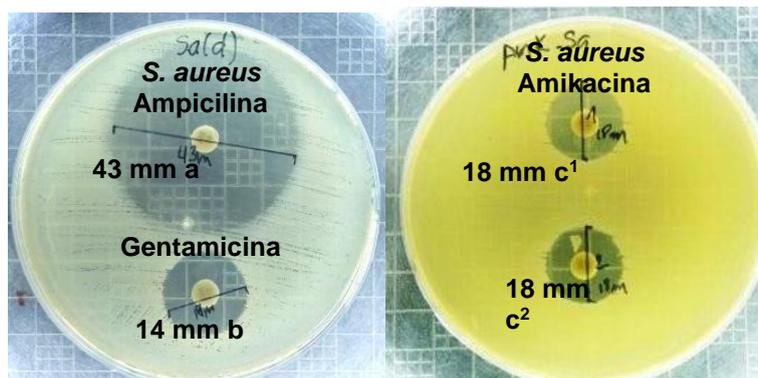
Halos de inhibición respectivos por cada disco de antibiótico empleado: de ampicilina (10 µg) (a), gentamicina (10 µg) (b) y amikacina (30 µg) (c¹, c²).

C3. Halos de inhibición en difusión en agar de antibióticos frente a *Micrococcus luteus* ATCC® 10240™



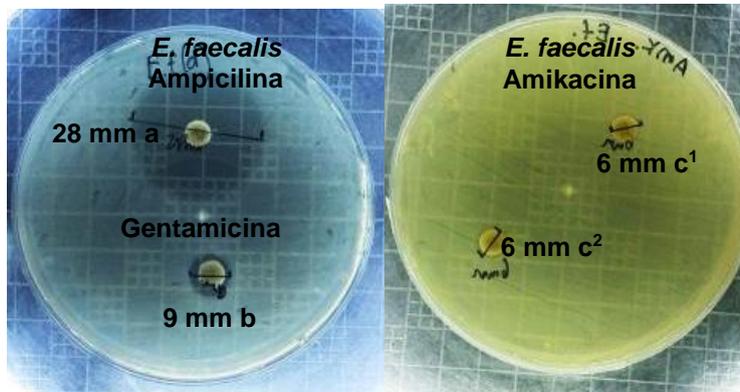
Halos de inhibición respectivos por cada disco de antibiótico empleado: ampicilina (10 µg) (a), gentamicina (10 µg) (b) y amikacina (30 µg) (c¹, c²).

C4. Halos de inhibición en difusión en agar de antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™



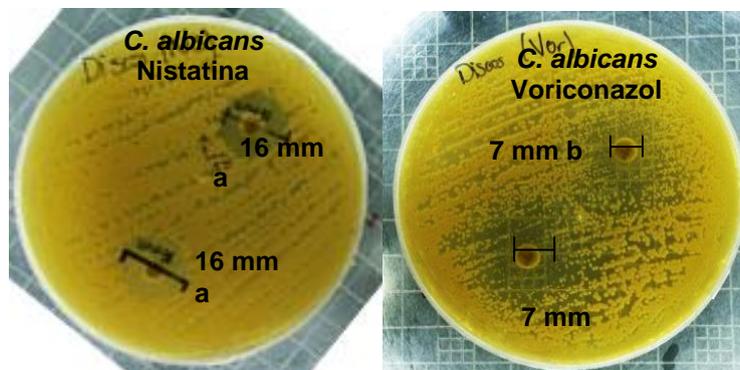
Halos de inhibición respectivos por cada disco de antibiótico empleado: ampicilina (10 µg) (a), gentamicina (10 µg) (b) y amikacina (30 µg) (c¹, c²).

C5. Halos de inhibición en difusión en agar de antibióticos frente a *Enterococcus faecalis* ATCC® 19433™



Halos de inhibición respectivos por cada disco de antibiótico empleado: ampicilina (10 µg) (a), gentamicina (10 µg) (b) y amikacina (30 µg) (c¹, c²).

C6. Halos de inhibición en difusión en agar de antibióticos frente a *Candida albicans* ATCC® 10231™



Halos de inhibición respectivos para cada disco de antimicótico que se colocaron por duplicado en cada caja de agar Sabouraud como: nistatina (100 U) (a) y voriconazol (1 µg) (b).

Anexo D. Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos de mango y tamarindo.

Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria-CMI (µg/mL)									Control Positivo
	Etanol			Agua			Etanol-agua (50:50 v/v)			
	20°C	40°C	60°C	20°C	40°C	60°C	20°C	40°C	60°C	
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 43888™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)									0,39 ^a
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)									0,39 ^a
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>Micrococcus luteus</i> , ATCC® 10240™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)									0,39 ^a
	2000	4000	1000	NA	4000	2000	1000	1000	2000	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)									0,39 ^a
	4000	4000	4000	NA	NA	NA	NA	4000	4000	
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC® 25923™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)									0,39 ^a
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)									0,39 ^a
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 19433™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)									1,95 ^b
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)									1,95 ^b
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231™	Mango (<i>Mangífera indica</i> L.)									25 ^c
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L.)									25 ^c
	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

NA: no activo a la dosis más alta ensayada (4000 µg/mL).

Control positivo: Gentamicina 1 mg/ml^a, Tetraciclina 5mg /mL^b, Itraconazol 1 mg/ mL^c.