



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICA  
TESIS  
EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
LAS HOJAS DE Theobroma cacao L “CACAO”  
SOBRE ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA (ECEH) – 2021**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

**Bach. Montenegro Maldonado, María Oferlinda**

**Bach. Segura Cotrina, Yolanda**

**ASESOR:**

**Mg. Rocío Jerónima López Calderón**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

**Farmacología, farmacoterapia y farmacia clínica.**

**HUANCAYO – PERÚ**

**MARZO, 2021**

## Dedicatoria

*Dedico en primer lugar a Dios, padres e hijo, por guiarme en este largo camino de estudiante, por su amor, valores, consejos y principios sobre todo la fuerza para continuar en esta etapa de obtener uno de mis más anhelados sueños.*

*María Ofelinda Montenegro Maldonado*

*Dedico este trabajo con gran amor a toda mi familia por el apoyo incondicional que siempre impulsándome hacer mejor y lograr con éxito mi carrera.*

*Yolanda Segura Cotrina*

## Agradecimiento

*Agradezco a Dios, a mis padres, esposo y mis hijos quienes, con su amor, paciencia y dedicación me han permitido cumplir con este sueño.*

*Yolanda Segura Cotrina*

*Dedico de manera especial a mis padres, hermanos y docentes ya que fueron los principales en la construcción de mi vida profesional, sentando me las bases de responsabilidad y deseos de superación, por sus ánimos y apoyo para no decaer cuando todo parecía difícil e imposible.*

*María Ofelinda Montenegro Maldonado.*

**Página del Jurado**

**PRESIDENTE:**

Dra. Rojas Rosales, Sonia Haydee

**MIEMBRO SECRETARIA:**

Mg. Lavado Morales, Ivar Jines

**MIEMBRO VOCAL:**

Mg. López Calderón, Roció Jerónima

**MIEMBRO SUPLENTE:**

Mg. Yunchaya Yllescas, Vilma Amparo

## Declaratoria de autenticidad

### DECLARACIÓN JURADA

Yolanda Segura Cotrina identificada con DNI N.º 16727307 y María Ofelinda Montenegro Maldonado identificada con DNI N.º 43380332, Tesista de la Universidad Privada de Huancayo “Franklin Roosevelt”, Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, autoras de la tesis **“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Theobroma cacao* L “CACAO” SOBRE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA (ECEH) – 2021”**.

**DECLARAMOS BAJO JURAMENTO: QUE, EL CONTENIDO DE ESTA TESIS ES ORIGINAL, AUTÉNTICA Y VERAZ**, siendo resultado del trabajo diario no imitado en el cual se usa ideas, imágenes, etc. Se empleó contenido importante el cual ha sido extraído de libros y otras investigaciones, los que fueron citados según el autor. Nos afirmamos y ratificamos en lo expresado en señal de lo cual firmamos el presente documento a los 02 días del mes de junio del 2021.

.....  
**Yolanda Segura Catrina**

**DNI N.º :16727307**



.....  
**María Ofelinda Montenegro Maldonado**

**DNI N.º :43380332**



# Índice

Dedicatoria .....	2
Agradecimiento .....	3
Página del Jurado.....	4
Declaratoria de autenticidad.....	5
RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	11
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. MÉTODO.....	21
2.1. Tipo y diseño de investigación .....	21
2.2. Operacionalización de Variables.....	22
2.3. Población, muestra y muestro de la Investigación .....	23
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	24
2.5. Procedimiento .....	24
2.6. Método de Análisis de Datos.....	26
2.7. Aspectos éticos.....	26
III. RESULTADOS.....	27
IV. DISCUSIÓN .....	40
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. RECOMENDACIONES .....	44
REFERENCIAS .....	45

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) .....	27
<b>Tabla 2.</b> Estadística descriptiva obtenida del tamaño de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre la cepa de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) .....	28
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza con los halos de inhibición de los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre la cepa 1 de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH).....	29
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “CACAO” sobre la cepa 1 de .....	30
<b>Tabla 5.</b> Subconjuntos de tratamientos experimentales del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre la cepa 1 de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) con valores estadísticamente iguales, obtenidos .....	31
<b>Tabla 6.</b> Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) cepa 2 .....	33
<b>Tabla 7.</b> Estadística descriptiva obtenida del tamaño de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) cepa 2 .....	34
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza con los halos de inhibición de los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH).....	35
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) .....	36
<b>Tabla 10.</b> Subconjuntos de tratamientos experimentales del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) cepa 2, con valores estadísticamente iguales, obtenidos por .....	37

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre sobre la cepa 1 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH) .....	27
<b>Figura 2.</b> Comparación de Medias para la cepa 1 .....	28
<b>Figura 3.</b> Promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre la cepa 1 de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECE) .....	32
<b>Figura 4.</b> Gráfica lineal de los promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre la cepa 1 de <i>Escherichia coli</i> .....	32
<b>Figura 5.</b> Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre sobre la cepa 2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH).....	34
<b>Figura 6.</b> Comparación de Medias para la cepa 2 .....	35
<b>Figura 7.</b> Promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre la cepa 2 de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH).....	38
<b>Figura 8.</b> Gráfica lineal de los promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao” sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica .....	39



## Índice de Anexos

Anexo A. Validación del instrumento de investigación por juicio de expertos....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Anexo B. Matriz de consistencia .....	56
Anexo C. Operacionalización de variables.....	58
Anexo D. Instrumento de recolección de datos.....	59
Anexo E. Certificado de análisis microbiológico .....	60
Anexo F. Constancia de cepa microbiológica.....	61
Anexo G. Identificación Botánica de la planta .....	62
Anexo H. Evidencias fotográficas del trabajo de campo .....	62
Anexo I. Recolección de datos de la medición de halos de inhibición .....	67

## RESUMEN

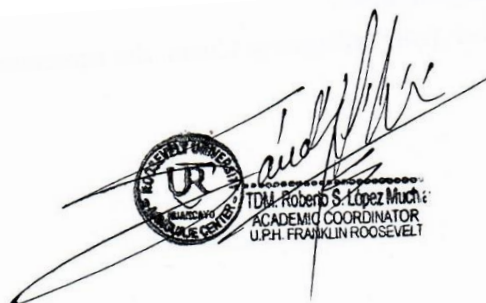
El objetivo del estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos etanolicos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). El método utilizado fue el método científico, el diseño experimental, observacional y correlacional, la población empleada fue cepas de ECEH y hojas de *Theobroma cacao* L “cacao”, la muestra estuvo conformada por dos cepas bacterianas de la especie de ECEH y el extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” (25%, 50%, 75% y 100%). Para probar el efecto inhibitorio se empleó el método de difusión en pozo, se usó como control negativo 25µl alcohol al 96%. **RESULTADOS:** Se obtuvo halos de inhibición para la cepa 1 ECEH de 24.25mm, 26.75mm, 32.5mm y 37mm para las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente; la cepa 2 de ECEH obtuvo halos de inhibición de 23.75mm, 23.25mm, 25.5mm y 25.5mm para las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. La prueba de Tukey para la cepa 1 ECEH demostró diferencia significativa entre el control negativo y los extractos etanolicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 75% y 100%, sin embargo, los extractos etanolicos de 25% y 50% no mostraron diferencia significativa. La prueba de Tukey para la cepa 2 de ECEH demostró diferencia significativa entre el control negativo y los extractos etanolicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 75% y 100%, sin embargo, los extractos etanolicos de 50% no mostraron diferencia significativa. Con el presente estudio se concluye que los extractos etanólicos trabajados tuvieron efecto inhibitorio sobre las cepas de ECEH.

**Palabras claves:** *Theobroma cacao*, *Escherichia coli enterohemorrhagica*, Extracto etanólico.

## ABSTRACT

The present work was carried out in order to determine the antibacterial effect in vitro of the ethanolic extracts of the leaves of *Theobroma cacao* L "cacao" about enterohemorrhagic *Escherichia coli* (ECEH). The method used was the scientific method, the experimental, observational and correlational design, the population that was used was *Escherichia coli* enterohemorrhagic strains (ECEH) as well as leaves of *Theobroma cacao* L "cacao" and we worked with a sample formed by two bacterial strains species of *Escherichia coli* enterohemorrhagic (ECEH) faced with five concentrations to ethanolic extract of *Theobroma cacao* L "cacao" (25%, 50%, 75% and 100%) with four repetitions per strain totaling 48 experimental units. the inhibitory effect test, the plate diffusion method or Kirby-Bauer was used, using a punch a well was made in the plates with a diameter of 6 mm where 25 µl of ethanolic extract with concentrations about 25, 50, 75 and 100% were inoculated in each of the wells, 25 µl alcohol at 96% was used as a negative control. **RESULTS:** The ethanolic extract of *Theobroma cacao* L "cacao" obtained inhibition halos for strain 1 of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (ECEH) of 24.25 mm, 26.75 mm, 32.5 mm and 37 mm for concentrations about 25%, 50%, 75% and 100% respectively; on the other hand, for strain 2 of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (ECEH) obtained inhibition halos of 23.75 mm, 23.25 mm, 25.5 mm and 25.5 mm for concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. Tukey's test for enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 1 (ECEH) showed significant difference between negative control and ethanolic extracts of *Theobroma cacao* L "cacao" at 75% and 100%, however, ethanolic extracts of 25% and 50% showed no significant difference. Tukey's test for enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 2 (EHCE) showed significant difference between negative control and ethanolic extracts of *Theobroma cacao* L "cacao" at 25%, 75% and 100%, however, Ethanolic extracts of 50% showed no significant difference. The present study concluded that ethanolic extracts worked had an inhibitory effect on enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains (ECEH).

**Keywords:** *Theobroma cacao*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Ethanolic extract, Cacao.



TDM Roberto S. López Mucha  
ACADEMIC COORDINATOR  
U.P.H. FRANKLIN ROOSEVELT

## I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud a nivel mundial, la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos generó un aumento la morbilidad y mortalidad de las personas, llegando a cifras de 700 000 muertes anual y se estima que para el 2050 serán aproximadamente de 10 millones. Este problema genera un impacto importante en la economía de los países debido al aumento en el costo del tratamiento, ampliación del tiempo de hospitalización, consumo de material hospitalario e incremento del riesgo en las intervenciones quirúrgicas.

La resistencia antimicrobiana es causada por el exceso de prescripción de antibióticos, la falta de cumplimiento del tratamiento por el paciente, el incumplimiento de las medidas de control de las infecciones intrahospitalarias, falta de higiene, saneamiento deficiente y el uso excesivo de antibióticos en animales productores de alimentos, que contribuyen a la transmisión cruzada de especies bacterianas resistentes, de animales a humanos originando una gran demanda de vigilancia, medidas de prevención y el desarrollo de nuevos antimicrobianos y tratamientos alternativos.<sup>1</sup>

Según el INS (Instituto nacional de salud) en el 2012 las bacterias aisladas de infecciones intrahospitalarias que presentan un alto porcentaje de resistencia a los betalactámicos se mencionan a la *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* y *Staphylococcus aureus*. En Lambayeque existen reportes de investigaciones que demuestran el potencial de riesgo de infecciones intrahospitalarias por cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a los antimicrobianos, donde se puede notar que existe un 34% de incidencia de *Escherichia coli* en portadores nasofaríngeo de resistencia en áreas críticas del Hospital Regional de Lambayeque.<sup>2</sup>

El estudio científico de las plantas medicinales es la base para el descubrimiento de nuevos fármacos y permite también un conocimiento más profundo de los vegetales que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan a los fármacos sintéticos. Actualmente existen plantas medicinales que tienen una actividad antimicrobiana conocida por la población, sin embargo, no han sido analizadas a fondo, para determinar cuáles son sus beneficios, pasando muchas veces desapercibidas.

Para ello, se realizó una recopilación de investigaciones en el ámbito nacional como, Poma (2018) en su investigación titulado “Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a distintas concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva. Tacna 2018”, cuyo propósito fue determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes. Los resultados mostraron halos de inhibición en las siguientes concentraciones: 5mg/ml = 9,4mm; 10mg/ml = 11,4mm; 15mg/ml = 16,6mm; 20mg/ml = 19,6mm; 25mg/ml = 20,2mm; 30mg/ml = 22,7mm. Se concluye que el extracto etanólico de cáscara de cacao a diferentes concentraciones presenta efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las bacterias presentes en la caries dental.<sup>3</sup>

Según Orihuela J. (2016) en su investigación titulado “Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario”, cuyo objetivo es determinar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L, sobre el crecimiento y adherencia in vitro del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario. Los resultados mostraron un mayor halo y menos conteo de UFC/ml con el uso del extracto de cáscara, seguido por el extracto de semilla, con respecto al grupo control. Se concluye que el extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento y adherencia in vitro del *Streptococcus mutans* al esmalte dentario, siendo mayor el efecto del extracto de cáscara de cacao.<sup>4</sup>

Por otro lado, Ruiz D. (2019) en su trabajo de investigación titulado “Comparación del efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo – 2018”, cuyo propósito fue comparar la diferencia del efecto antibacteriano entre los extractos hidroetanólicos y el colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados mostraron que el colutorio de 12.5% más efectivo que los extractos hidroetanólicos de 12.5%, 25%, 50%. El autor concluye que el colutorio de 12.5% a base de semillas de *Theobroma cacao* presenta mayor efectividad antibacteriana que los extractos hidroetanólicos a base de semillas de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.<sup>5</sup>

Por otro lado, se ha realizado la recopilación de investigaciones a nivel internacional como el que refiere Carrera P. (2018) en su trabajo sobre el “Efecto Inhibitorio de la Pulpa que Recubre las Semillas del Cacao (*Theobroma cacao*) a Diferentes Concentraciones sobre la Cepa de *Streptococcus mutans*: Estudio in vitro”, que se realizó con el propósito determinar si la pulpa no procesada que recubre las semillas del cacao crudo, tiene un efecto inhibitorio sobre este microorganismo. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de la pulpa que recubre las semillas de cacao con las concentraciones de 10%, 20%, 30%, 40% de extracto acuoso de la pulpa que recubre las semillas mostraron un efecto inhibitorio leve sobre *Streptococcus mutans*. La investigación concluye que los extractos acuosos de la pulpa que recubre las semillas del cacao no presentan efecto inhibitorio sobre la cepa de *Streptococcus mutans*.<sup>6</sup>

Aguirre B. (2019) en su trabajo de investigación titulado “Efectividad del cacao sobre el desarrollo del Biofilm en estudiantes de Odontología Veracruz, generación 2018”, tuvo como propósito determinar el efecto del aceite de cacao sobre el desarrollo del Biofilm en estudiantes de Odontología Veracruz, generación 2018. Se utilizó aceite de *Theobroma cacao* L. (PRONAU) en tres concentraciones: aceite puro, dilución 1:2 y dilución 1:4. Los resultados mostraron que 13 diferentes microorganismos presentes en el biofilm como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp. *Enterobacter* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, presentaron sensibilidad al aceite de *Theobroma cacao* L mientras que los microorganismos grampositivos presentaron mayor resistencia al aceite de *Theobroma cacao*. Los investigadores concluyeron que el aceite de *Theobroma cacao* L tiene efecto inhibitorio, sobre el desarrollo del biofilm.<sup>7</sup>

Carrillo J y Pilligua D. (2019) en su trabajo de investigación titulado “Evaluación del Efecto Inhibitorio de Fracciones de Compuestos Fenólicos de la Cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad ccn51, en *Salmonella* y *Escherichia coli*”, cuyo propósito fue separar los compuestos fenólicos de la cáscara del *Theobroma cacao* de la variedad CCN51 que facilite el control de microorganismos patógenos presente en los alimentos, mediante la inhibición de su crecimiento. Los resultados mostraron que no se observó diferencia en el poder inhibitorio de las fracciones obtenidas contra *Salmonella* ni *Escherichia coli*; así como se determinó que el efecto de inhibición analizado por el método de difusión reveló que este fue mayor en *E. coli*, en comparación con *Salmonella*, así como el análisis de sembrado en

profundidad no se observó presencia de Salmonella mientras que si hubo presencia de *E. coli*, luego de 24 horas. Los autores concluyeron que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre Salmonella fue más duradero que sobre *E. coli*.<sup>8</sup>

**Sotelo L y Alivis A (2018)** en su trabajo de investigación titulado “Extracción de Compuestos con Actividad Antimicrobiana a partir de Subproductos del Cacao” cuya finalidad fue establecer un método de extracción de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de subproductos del cacao. Se utilizaron concentraciones del extracto (200,000, 100,000, 50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125, 1,562.5, 781.25, 390.62 ppm y el tipo de microorganismo (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213). Los resultados de la investigación arrojaron que el extracto de la cáscara de la mazorca del cacao, tiene un efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, lo cual se evidenció por la ausencia de crecimiento de estos microorganismos, a partir de la concentración de 6,250 ppm para el caso del *Staphylococcus aureus* y 50,000 ppm para *Escherichia coli*.<sup>9</sup>

Considerándose al *Theobroma cacao* L, como una planta que pertenece a la familia Sterculiaceae que crece en zonas geográficas tropicales a partir de una franja geográfica, entre latitud de 20° para ambos hemisferios. Se divide en dos categorías: Criollo y Forastero, y según Organización Internacional del Cacao (ICCO), esta última tiene una amplia variedad debido a su crecimiento ya que es más fácil de cultivar y manipular<sup>10</sup>. El cacao es uno de los principales productos agrícolas porque ayuda a un desarrollo sostenible de la economía rural. El procesamiento del grano de cacao ocupa uno de los principales sectores de la economía, y su chocolate proviene de los productos de cacao más consumidos en el país (0,9 kg por persona por año) El cacao es utilizado principalmente para producir chocolate, es el más grande productor está en el continente africano liderados por Costa de Marfil que representan el 59% de la oferta mundial.<sup>11</sup>

En los últimos años, diversos autores han afirmado que el cacao y sus productos son alimentos ricos en catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides, como proantocianidinas, antocianinas, flavonoides y flavonoles Glucósidos. La concentración de polifenoles en granos de cacao seco y desgrasado, está entre el 15-20% (p/p), 37% de catequinas y 4% antocianidinas y 58% de

proantocianidinas.<sup>12</sup>

Los polifenoles son estructuras químicas que poseen anillos bencénicos con algunos hidrógenos sustituidos por grupos hidroxilo (OH), los polifenoles contribuyen a combatir la proliferación de microorganismos que pueden colonizar la planta de cacao. La presencia de polifenoles en el cacao se encuentra en alto porcentaje; dentro de este grupo de compuestos los de tipo flavonoide que son los más relevantes y de mayor concentración, entre ellos tenemos fundamentalmente las procianidinas, catequinas y epicatequinas; en menor proporción existen otros polifenoles: quercetina, isoquercitrina, hiperosida, naringenina, luteolina y apigenina.<sup>13</sup> Los flavonoides tienen una estructura policíclica de 3 anillos, de los cuales dos anillos derivan del benceno y el otro es un heterociclo oxigenado, de los flavonoides del cacao la epicatequina se presenta en mayor proporción en un 92% y se adjudica la acción “anti-glucosiltransferasa”. Por efecto de elevadas temperaturas los granos de cacao, los flavonoides pueden tener un proceso de epimerización, en el cual se transforman las epicatequinas en catequinas. Las catequinas se caracterizan por presentar un elevado peso molecular, a temperatura ambiente su estado físico es sólido con puntos de fusión altos, su naturaleza covalente no polar le permite ser fácilmente soluble en solventes polares; son las responsables de dar el color morado a las semillas del cacao.<sup>14</sup>

El efecto antibacteriano *in vitro* se refiere al desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para enfermedades que afectan la salud, los extractos de plantas o bien sus compuestos puros ofrecen una alternativa potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos antimicrobianos que puedan ser utilizadas para el control de microorganismos patógenos, debido a la presencia de metabolitos o compuestos que inhiben el crecimiento o provocan la muerte de estos. Tradicionalmente, los extractos de plantas se han utilizado en la medicina herbal y complementaria para el tratamiento de diversas enfermedades. Se han identificado una gran cantidad de compuestos vegetales con un amplio espectro de actividad contra patógenos bacterianos y se han caracterizado varios componentes activos.<sup>15</sup>

Los ensayos *in vitro* hasta el momento han sido ensayos de mucha ayuda en investigaciones a nivel mundial, siendo este un medio de ensayo realizado fuera del organismo normalmente en tejidos órganos o células aisladas, el método debe proporcionar información fiable comparable a los ensayos estándar, en caso nuestro se ha realizado un ensayo de células



vegetales como el cacao, extraídos por el método de extracción con disolventes.<sup>16</sup>

El ciprofloxacino pertenece al grupo de las quinolonas son agentes eficaces contra bacterias gramnegativas, muy útiles para el tratamiento antimicrobiano. Estas pueden clasificarse en generaciones al igual que otros grupos: las de primera generación, como el ácido nalidíxico, actualmente son poco usadas, tienen actividad frente a enterobacterias y gramnegativos y son prácticamente inactivas frente a grampositivos, patógenos atípicos y anaerobios, además de que alcanzan concentraciones bajas en el suero, por lo que su distribución sistémica es baja y solo se emplean para tratamiento de algunas infecciones urinarias; las de segunda generación (norfloxacino y el ciprofloxacino) presentan una mayor actividad ante gérmenes gramnegativos (incluida la *Pseudomonas aeruginosa*), también son activas ante algunos patógenos atípicos, poseen actividad moderada frente a grampositivos y prácticamente nula frente a anaerobios. No se usan en infecciones sistémicas, pues las concentraciones que se logran en suero y muchos tejidos son bajas.<sup>17</sup>

La *Escherichia coli* fue identificada por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich, denominándola bacteria coli común para indicar su presencia en el intestino de personas sanas, es un bacilo Gram negativo, móvil, facultativo, no esporulado y desde el punto de vista bioquímico se caracteriza por la capacidad de sus miembros para reducir los nitratos a nitritos y para fermentar ácido y gas a partir de la glucosa, arabinosa y otros azúcares; no requiere aumento de la cantidad de cloruro de sodio para crecer, y es negativo a la oxidasa; forma colonias circulares, convexas y lisas con bordes definidos, produce de manera típica, pruebas positivas a indol, rojo de metilo, descarboxilasa de la lisina y fermentación del manitol, se le clasifica en más de 170 serogrupos O (según las características antigénicas de la pared celular) y en serotipos por la combinación de antígenos O somático, H flagelar y K de superficie; puede ser causa de enfermedad, pero las infecciones entéricas no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas.<sup>18</sup>

De las *E. coli* asociadas con gastroenteritis es, por su frecuencia, la segunda que causa esta enfermedad, se expresa en dos formas clínicas, la primera de ellas se caracteriza por un episodio de diarrea acuosa, más que sanguinolenta, y la segunda semeja un episodio de cólera. En los países en vías de desarrollo, como el nuestro, es común que los niños tengan

dos o tres episodios de diarrea por esta bacteria al año, en los dos primeros años de vida; lo que representa cerca de la cuarta parte de las enfermedades diarreicas; también está implicado en los eventos de la llamada «diarrea del viajero», que generalmente ocurre por la ingesta de agua y alimentos contaminados.<sup>19</sup>

Los factores de virulencia implicados en la patogenicidad de la *Escherichia coli* permiten que esta bacteria se adhiera al intestino delgado proximal y resista la eliminación por la peristalsis (como mecanismo de defensa) y la producción de una o dos toxinas secretogénicas conocidas como enterotoxinas LT y ST; ambas inducen una secreción de fluidos hacia el intestino. Hay una variante de toxina ST, que es denominada STh, la que también favorece la secreción de líquidos al lumen. Los principales receptores de esta toxina se encuentran en las células epiteliales del intestino delgado y del colon; por lo que al unirse con el enterocito y de activar al guanilato ciclasa, aumenta la concentración intracelular de guanosin monofosfato cíclico, lo que favorece el incremento en la secreción de cloro o la inhibición de la absorción de NaCl.<sup>20</sup>

La acción patógena en la *E. coli* presenta pilis tipo 1 o MS (manosa-sensible) y antígenos superficiales somáticos y capsulares que como se sabe actúan por su capacidad de adherencia ya que presenta adhesinas, dentro de las células del epitelio del tracto urinario. En las células de la mucosa intestinal los que se fijan son los pili MR (son los manosa-resistente), que son llamados los factores de colonización (CFAI YII) quienes facilitan la fijación en las células de la mucosa intestinal, debido a sustancias inhibitoras que presentan los antígenos somáticos y capsulares, estos son capaces y responsables de las cepas invasivas y de su creciente virulencia, impidiendo sustancias bactericidas del suero, esta síntesis está codificada por plásmidos de elevado peso molecular (140 Mdals).<sup>21</sup>

La toxicidad del *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) como se sabe causa Colitis Hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) que producen las verotoxinas VT1 y VT2 que son controladas por fagos. El proceso de incubación que es de 3 a 4 días, genera diarrea con dolor abdominal con un tiempo corto de fiebre, a los dos días puede que esto se agrave presentando fuertes síntomas de dolor abdominal y la diarrea comienza a ser sanguinolenta durando entre 4 a 10 días. En la mayoría de personas con síntomas causados por *E. coli*, resultan sin secuelas, pero en niños menores de 10 años estas shiga toxinas pueden llevar a que padezcan de SUH. Las EHEC del serotipo O157:H7 llevan un plásmido de 60MDa, este

va a codificar un nuevo antígeno fímbrico de colonización *Shigella dysenteriae* tipo 1.26 comparando la ECEH con ECEP, se evidencia que ambas incrementan los niveles de calcio intracelular, pero la ECEH no induce la fosforilación de las proteínas de las células epiteliales. La habilidad para producir el esfacelamiento de las células por ECEH es probablemente suficiente para causar la diarrea no sanguinolenta, pero Stx es esencial para el desarrollo de diarrea sanguinolenta y CH. La Toxina Stx pasa del intestino al torrente sanguíneo, es ahí cuando sigue su recorrido hacia el riñón, dañando los glomérulos y alterando la filtración de las células del riñón, causando una falla aguda renal, que es típica en el síndrome urémico hemolítico, que desencadena en casos de muerte.<sup>22</sup>

*Escherichia coli* O157:H7 presenta mecanismo de resistencia antibiótica contra tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, trimetropim-sulfametoxazol, ampicilina y ácido nalidíxico estos son incesantemente descritos, dichos mecanismos de resistencia se dan ya que este serotipo O157:H7 adquiere a través de mutaciones en el cromosoma o de transferencia horizontal de material genético con otras especies relacionados o diferentes pero que guardan alguna relación como por ejemplo integrones.<sup>23</sup>

*Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), descrita por primera vez a principios de 1970, como una cepa invasora que causaba una diarrea disenteriforme; se encuentra de manera endémica en muchos de los países en desarrollo, con cierta similitud epidemiológica a la observada en la Shigelosis; es frecuente la transmisión de persona a persona, pero los animales, especialmente los bovinos, son considerados el reservorio más importante y el origen de los brotes que anualmente ocurren en el mundo. Los productos de origen animal se han asociado con la transmisión de esta bacteria, por la ingesta de alimentos contaminado como carne mal cocida o manipulada sin cuidado alguno; también el agua o la leche suelen vehículo en la transmisión de esta bacteria en los seres humanos, los brotes y casos esporádicos de infección por EIEC muestran que el amplio espectro de manifestaciones clínicas incluye desde la infección asintomática, la diarrea líquida, la diarrea con sangre y casos con complicaciones graves: con colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombótica trombocitopénica.<sup>23</sup>

Escasas investigaciones han estudiado el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos de *Theobroma cacao* L “cacao”; y aún menos, se han realizado estudios de efecto inhibitorio

sobre cepas bacterianas aisladas de muestras clínicas con algún patrón de resistencia a antimicrobianos. Por ello se formuló el problema general ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro el extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)? así como también se formula los problemas específicos como son ¿Qué concentración del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Theobroma cacao* L tendrá mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* enterohemorrágico (ECEH)?, ¿Cuál será la concentración mínima de inhibición (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)?, ¿Existirá alguna diferencia significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” frente al Ciprofloxacino sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)? Siendo la hipótesis donde se evidencia que los extractos etanólicos de las hojas de *Theobroma cacao* L. “cacao” presentan efecto inhibitorio in vitro sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Debido a la problemática presentada y al efecto benéfico de plantas presentamos un estudio que nos permitirá evaluar el efecto antibacteriano a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” frente *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) para generar nuevos conocimientos, siendo considerado como tratamiento alternativo de bajo costo, para combatir las infecciones gastrointestinales producidas por este tipo de bacterias y evitar que incrementen la resistencia, esto repercutirá en un mejor tratamiento y eficacia farmacológica, la cual disminuirá el costo en los hospitales, por tal motivo se justifica nuestro trabajo de investigación.

Planteándonos como objetivo general de la investigación evaluar el efecto antibacteriano in vitro de los extractos etanólicos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Junto con este, se plantearon objetivos específicos como: Identificar cuál de las cuatro concentraciones (25%, 50%, 75 % y 100%) del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” es más efectiva contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), determinar la Concentración Mínima de Inhibición (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” frente a los cultivos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) y comparar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” frente a la acción de la forma comercial de un bactericida como la Ciprofloxacina de 5 mcg.

## II. MÉTODO

### 2.1. Tipo y diseño de investigación

La presente investigación aplico el método científico para comprobar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).<sup>24</sup>

#### 2.1.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación es aplicada, porque, el propósito de exponer nuevos conocimientos científicos es la aplicación con en el sector salud para mejorar las condiciones de vida de los pacientes.<sup>25</sup>

#### 2.1.2. Diseño de Investigación

El diseño es experimental ya que existió modificación a lo largo del desarrollo de la investigación las condiciones del objeto de estudio observando a través de la medición de los halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). La variable principal fue actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao”.<sup>25</sup>

## 2.2. Operacionalización de Variables.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Extracto etanolico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao”	Metabolitos secundarios de <i>Theobroma cacao</i> contenidos en un volumen de etanol	Concentración	Porcentaje	25%
				50%
				75%
				100%
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	Capacidad de inhibir o destruir el crecimiento bacteriano	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE)	Sensible	> 21mm
			Intermedio	18-20 mm
		Resistente	< 17 mm	
		Diámetro de halo de inhibición		mm
		Microscopía	Forma bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano	Si / No
		Macroscopía	Colonias rosas (lactosa positiva) opacas, circulares, de 2 a 4 mm de diámetro, convexas, de bordes enteros y suaves	Si / No

## **2.3. Población, muestra y muestro de la Investigación**

### **2.3.1. Población**

La población estuvo constituida por dos cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) provenientes del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Por parte del material botánico estuvo constituida por cuatro kilos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao”, identificadas a través de sus claves taxonómicas en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

### **2.3.2. Muestra**

La muestra en estudio estuvo conformada por una especie bacteriana, dos cepas *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), utilizando además cuatro concentraciones: 25%, 50%, 75% y 100% de los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* “cacao” incluido control con Ciprofloxacino de 5 mcg y cuatro repeticiones para cada experiencia; dando una muestra total de 48 unidades experimentales.

### **2.3.3. Muestreo**

El tipo de muestreo fue por conveniencia, técnica de muestreo no probabilístico donde los sujetos son seleccionados dada la conveniente accesibilidad y proximidad de los sujetos para el investigador.

#### **Criterios de selección:**

##### Criterios de Inclusión

Los criterios de inclusión para la experiencia se consideraron cepas reactivadas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), cepas identificadas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), crecimiento uniforme de las cepas.

Los criterios de inclusión para hoja *Theobroma cacao* L. en unas buenas condiciones y en condiciones adecuadas para su uso en el trabajo de investigación

##### Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión se consideraron, cepas no reactivadas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), cepas no identificadas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), muestras que no hayan desarrollado completamente o presenten contaminación y muestras en mal estado o en descomposición.

Los criterios de exclusión para las hojas de *Theobroma cacao* L fueron eliminadas hojas marchitadas, y hojas en un mal estado

#### **2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad**

Se utilizó la técnica denominada, experimentación y observación a través de la percepción directa de los hechos, por lo que se realizará las mediciones de los halos de inhibición que ejercen las diferentes concentraciones del extracto etanólico sobre la cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), comparándolo con la forma comercial del bactericida Ciprofloxacino de 5mcg al cual llamaremos “tratamiento”. Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Los instrumentos que se utilizaron en el presente trabajo de investigación se consideraran la hoja de registro (Guía de observación) donde se registrará todas las observaciones encontradas en los experimentos, así como la base de datos donde se ingresará de manera ordenada todos los datos cuantitativos.

La recopilación de datos sobre las mediciones de los halos de inhibición que ejercieron las diferentes concentraciones del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *Theobroma cacao* L sobre las dos cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) fueron validados a criterio de expertos, Biólogos, Botánicos y Microbiólogos de la Universidad.

#### **2.5. Procedimiento**

La muestra de hojas de cacao utilizada para la investigación fue recolectada en Batán Grande, de la provincia de Chiclayo, Departamento de Lambayeque. Se realizó una selección y separación solo de las hojas de la planta, luego se limpiaron (con abundante agua, hipoclorito y agua destilada) para el secado. Las hojas limpias se secaron mediante una deshidratación natural a temperatura ambiente por 7 días, luego se realizó el trozado de las hojas secas de forma mecánica obteniendo 500 gramos de hojas secas, se envasó en frasco de vidrio de color ámbar de capacidad de 1 litro, posteriormente se agregó alcohol etílico de 96° al frasco hasta cubrir las hojas trozadas, dejando macerar por 7 días y con una agitación de 3 veces al día, el material macerado fue filtrado primero a



través de gasa estéril y luego a través de papel filtro con un embudo y en un matraz Erlenmeyer, finalmente se procedió a la concentración y el secado con la evaporación del solvente y concentración del extracto a sequedad en un equipo Soxhlet a 50°C por 6 horas hasta obtener un extracto con una textura viscosa, se procedió a pesar el extracto etanólico final obtenido, se colocó en un envase protegido de la luz y del calor, para su posterior utilización.

Para realizar las concentraciones del extracto se consideraron dos gramos de extracto puro en dos mililitros de agua destilada estéril que constituyo la solución madre a partir del cual se obtuvieron las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% (p/v) del extracto.

Los cultivos de *Escherichia coli* enterohemorrágica previamente identificados y certificados procedentes del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz fueron conservados en refrigeración para su posterior utilización en el trabajo experimental.

Para la reactivación de cultivos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) se tomó una azada del cultivo conservado, y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo, se llevará a incubar a 37°C por 24 horas. Luego la suspensión bacteriana se sembró en Agar MacConkey y llevada a incubación a 37°C por 24 horas. Se seleccionarán colonias que presentaran características culturales propias con la coloración Gram y se observó a 100x. En lo que corresponde a la Preparación del inóculo se realizó a partir del cultivo puro de cada bacteria sembrado en Agar nutritivo con 18 horas de incubación. Se hizo una suspensión en 5 ml de agua destilada estéril, a una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 del nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml).

La Preparación de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” en primer lugar se preparará la solución madre pesando 2g del extracto etanólico puro obtenido y se aforo en 2ml de agua destilada, a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% utilizando como solvente etanol absoluto (control).

Las Pruebas de Inhibición del Crecimiento se sirvieron 25 ml de Agar Mac-Conkey en placas Petri, para luego llevarse a secar en la estufa por 10 minutos para eliminar exceso de humedad, se agregó 0,1 ml de suspensión bacteriana y con ayuda de un isopo de

algodón se sembrara uniformemente, dejando reposar por 20 minutos, en condiciones de esterilidad se hizo un pozo con un sacabocado con un diámetro de 6 mm en cada placa, se inocularon 25 µl de muestra a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% de extracto etanólico en cada uno de los pozos de las placas, en otra placa se colocó 25 µl de etanol absoluto como control; y como control positivo un disco de Ciprofloxacina (5µg/disco) para *E. coli* enterohemorrágica (ECEH).

## **2.6. Método de Análisis de Datos**

El análisis estadístico de los datos, obtenidos en la experimentación correspondiente, se realizara por medio de Análisis de Varianza (ANOVA), con cuatro números de concentraciones del extracto etanolico de *Theobroma cacao* L “cacao” (25%, 50%, 75% y 100%) más un control positivo con Ciprofloxacino (5 mcg) y un control negativo a base de alcohol al 96°, dos número de cepas de cultivo puro de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) y cuatro número de repeticiones; donde se observó el grado de susceptibilidad de *Escherichia coli* enterohemorrágica, este análisis se complementó con la Prueba discriminatoria de Tukey a 0,05 nivel de significación que determino las diferencias entre cada uno de los factores. El procesamiento estadístico se realizó con ayuda del software estadístico: SPSS Statistics 25 y hojas de cálculo Excel.

## **2.7. Aspectos éticos**

El presente trabajo de investigación cumplió con las normas y estándares internacionales y nacionales para la investigación. Los datos generados en el laboratorio fueron conservados de forma reservada, asimismo el contenido del presente proyecto se basa en investigaciones relacionadas con el Efecto Antibacteriano in vitro del Extracto Etanolico de las Hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), por la cual se citó a los autores en cuanto fue pertinente.

### III. RESULTADOS

#### CEPA 1: *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

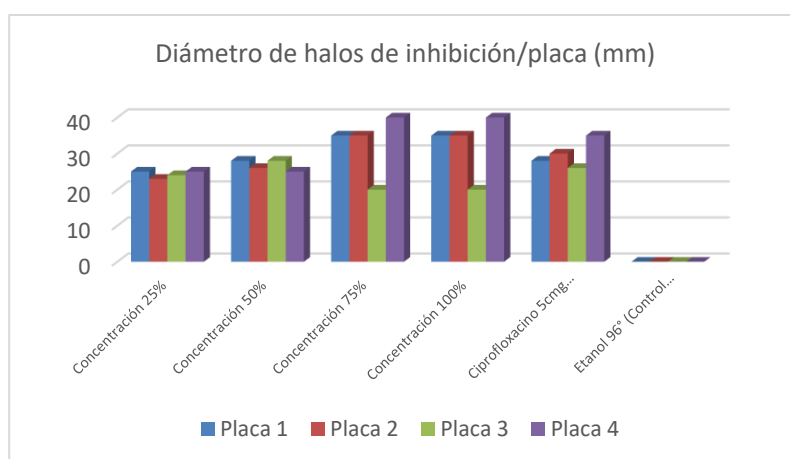
**Tabla 1.** Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L. “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

Placa	Porcentaje				Control Positivo Ciprofloxacino 5cmg	Control Negativo (Etanol 96°)
	25%	50%	75%	100%		
1	25mm	28mm	35mm	35mm	28mm	0
2	23mm	26mm	35mm	35mm	30mm	0
3	24mm	28mm	20mm	20mm	26mm	0
4	25mm	25mm	40mm	40mm	35mm	0

Fuente: Datos recolectados por el investigador 2021.

La tabla 2 muestra las mediciones de los halos producidos por los discos con los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, cuatro repeticiones para cada concentración, además de las medidas de los controles positivos y negativos en igual número de repeticiones sobre la cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

**Figura 1.** Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre sobre la cepa 1 *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)



El presente gráfico nos muestra las mediciones de los halos producidos por los discos con los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, cuatro repeticiones para cada concentración, además de las medidas de los controles positivos y negativos en igual número de repeticiones sobre la cepa 1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).

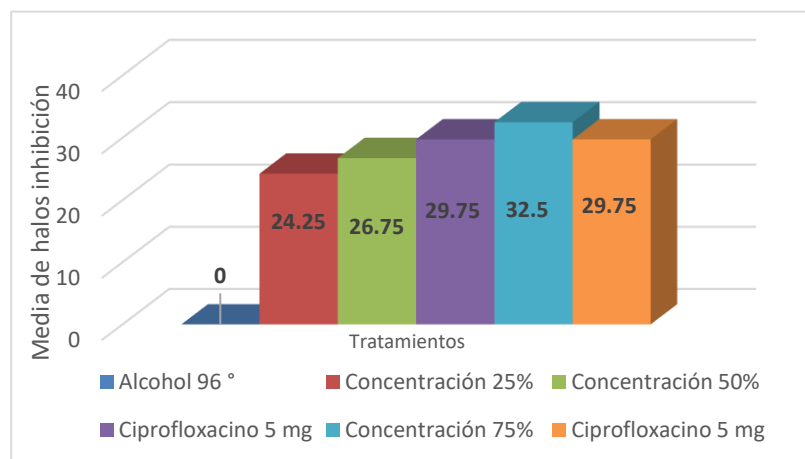
**Tabla 2.** Estadística descriptiva obtenida del tamaño de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre la cepa de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

Tratamientos	Media	N	Desviación	Error estándar de la media	Varianza
Concentración 25%	24.2500	4	0.95743	0.47871	0.917
Concentración 50%	26.7500	4	1.50000	0.75000	2.250
Concentración 75%	32.5000	4	8.66025	4.33013	75.000
Concentración 100%	37.0000	4	4.00000	2.00000	16.000
Alcohol 96°	0.0000	4	0.00000	0.00000	0.000
Ciprofloxacino 5 mg	29.7500	4	3.86221	1.93111	14.917
Total	25.0417	24	12.73980	2.60050	162.303

Fuente: Elaboración propia

Se observa los valores de la media, (suma de cada halo inhibido por tratamiento entre la repetición para cada tratamiento o grupo) desviación estándar, error estándar, y la varianza obtenidos de los datos recolectados para los halos de inhibición producidos por efecto de los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, control positivo y negativo.

**Figura 2.** Comparación de Medias para la cepa 1



Fuente: Elaboración propia

La figura 2, muestra los valores de la media, desviación estándar, error estándar, y la varianza obtenidos de los datos recolectados para los halos de inhibición producidos por efecto de los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, control positivo y negativo.

**Tabla 3.** Análisis de varianza con los halos de inhibición de los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre la cepa 1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

### Análisis de varianza (ANOVA)

ANOVA					
	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Entre grupos</b>	3405.708	5	681.142	37.465	0.000
<b>Dentro de grupos</b>	327.250	18	18.181		
<b>Total</b>	3732.958	23			

Fuente: Elaboración propia

El valor de significancia obtenido ( $p=0.00 < 0.05$ ) al realizar el análisis de varianza nos indica que existe diferencias significativas entre los diferentes tratamientos experimentales, existiendo al menos un tratamiento que mostró resultados diferentes a los obtenidos en los demás grupos experimentales.

**Tabla 4.** Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “CACAO” sobre la cepa 1 de

COMPARACIONES MÚLTIPLES – PRUEBA DE TUKEY				
(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
Concentración 25%	Concentración 50%	-2.50000	3.01501	0.958
	Concentración 75%	-8.25000	3.01501	0.116
	Concentración 100%	-12.75000	3.01501	0.006
	Alcohol	24.25000	3.01501	0.000
	Ciprofloxacino	-5.50000	3.01501	0.476
Concentración 50%	Concentración 25%	2.50000	3.01501	0.958
	Concentración 75%	-5.75000	3.01501	0.429
	Concentración 100%	-10.25000	3.01501	0.032
	Alcohol	26.75000	3.01501	0.000
	Ciprofloxacino	-3.00000	3.01501	0.914
Concentración 75%	Concentración 25%	8.25000	3.01501	0.116
	Concentración 50%	5.75000	3.01501	0.429
	Concentración 100%	-4.50000	3.01501	0.673
	Alcohol	32.50000	3.01501	0.000
	Ciprofloxacino	2.75000	3.01501	0.938
Concentración 100%	Concentración 25%	12.75000	3.01501	0.006
	Concentración 50%	10.25000	3.01501	0.032
	Concentración 75%	4.50000	3.01501	0.673
	Alcohol	37.00000	3.01501	0.000
	Ciprofloxacino	7.25000	3.01501	0.206
Alcohol 96°	Concentración 25%	-24.25000	3.01501	0.000
	Concentración 50%	-26.75000	3.01501	0.000
	Concentración 75%	-32.50000	3.01501	0.000
	Concentración 100%	-37.00000	3.01501	0.000
	Ciprofloxacino	-29.75000	3.01501	0.000
Ciprofloxacino 5 mg	Concentración 25%	5.50000	3.01501	0.476
	Concentración 50%	3.00000	3.01501	0.914
	Concentración 75%	-2.75000	3.01501	0.938
	Concentración 100%	-7.25000	3.01501	0.206
	Alcohol	29.75000	3.01501	0.000

Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostraron que los tratamientos con ciprofloxacino, 75 y 100% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.*, cuyos halos de inhibición fueron de 29.75mm, 32.5mm y 37mm respectivamente, fueron los que demostraron mayor eficacia, resultando ser estos estadísticamente iguales. Al utilizarse concentraciones de 25 y 50% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.*, se obtuvieron halos de inhibición de 24.25mm y 26.75mm respectivamente, siendo estos estadísticamente iguales a los resultados obtenidos al utilizar ciprofloxacino y 75% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.* El control negativo, en el que se hizo uso de alcohol, no mostró halo de inhibición, siendo nula su eficacia.

**Tabla 5.** Subconjuntos de tratamientos experimentales del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L* “cacao” sobre la cepa 1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) con valores estadísticamente iguales, obtenidos

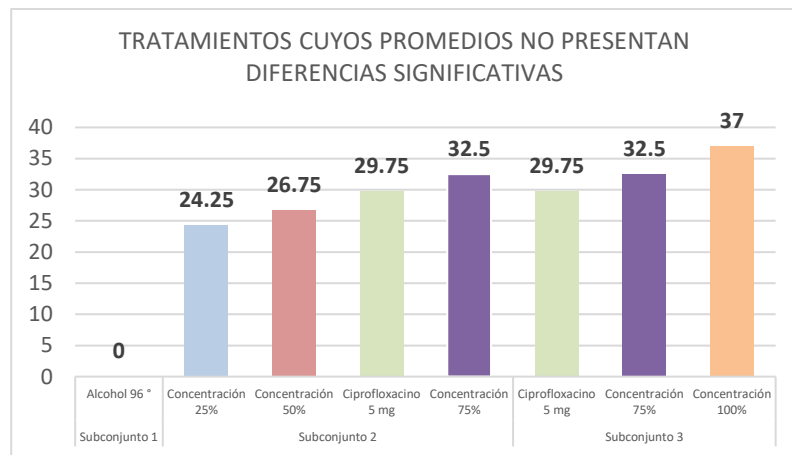
Tratamientos	N	Subconjuntos		
		1	2	3
Alcohol 96 °	4	0.0000		
Concentración 25%	4		24.2500	
Concentración 50%	4		26.7500	
Ciprofloxacino 5 mg	4		29.7500	29.7500
Concentración 75%	4		32.5000	32.5000
Concentración 100%	4			37.0000

Fuente: Elaboración propia

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey nos muestra aquellos grupos experimentales cuyos valores de halo de inhibición obtenidos resultaron ser estadísticamente iguales, así como aquellos grupos con los que hubo diferencias significativas. Los grupos experimentales que forman cada subconjunto son iguales entre sí estadísticamente, mientras que cada subconjunto es diferente entre sí. Estadísticamente, los valores obtenidos en los grupos tratados con ciprofloxacino y con 75% y 100% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L* resultaron ser iguales, demostrando de esta forma que el extracto etanólico en concentraciones de 75 y 100% presentan la misma eficacia antibacteriana que el ciprofloxacino, y cuyos resultados fueron numéricamente superiores a este. Los valores obtenidos de los grupos tratados con 25 y 50% de extracto etanólico no mostraron diferencias significativas con los grupos

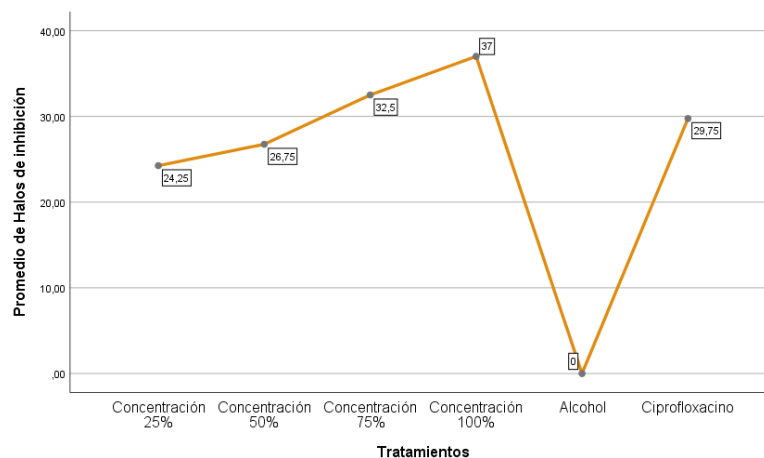
tratados con ciprofloxacino y 75% del mismo extracto. El grupo control negativo, tratado con alcohol, mostró nula eficacia.

**Figura 3.** Promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre la cepa 1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECE)



Este grafico nos muestra un resumen por subconjuntos de la prueba de Tukey donde se puede visualizar la comparación de los grupos de trabajos y su relación entre ellos, se observa una estrecha relación entre los grupos del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” al 75% y 100% y el control positivo.

**Figura 4.** Gráfica lineal de los promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre la cepa 1 de *Escherichia coli*



La grafica nos muestra los promedios de halo de inhibición obtenidos para cada grupo experimental. Se puede observar que al aumentar la concentración del extracto etanólico de las



hojas de *Theobroma cacao* L “CACAO” en los tratamientos, aumenta su efecto antibacteriano, logrando resultados estadísticamente iguales al grupo tratado con ciprofloxacino. Todas las concentraciones usadas en este estudio experimental obtuvieron valores de halo de inhibición estadísticamente iguales a los valores obtenidos al usar ciprofloxacino, sin embargo, los que mostraron mayor eficacia fueron los tratamientos de 75 y 100% de concentración de extracto etanólico, aunque mostraron ser iguales estadísticamente al ciprofloxacino, obtuvieron halos de inhibición ligeramente superiores a los obtenidos con este.

Se demostró entonces que el extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” mostraron una eficacia igual a la del ciprofloxacino, pudiendo ser reemplazado su uso por un tratamiento con 25% de extracto etanólico.

Se recomienda realizar el estudio del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “CACAO” a concentraciones menores, ya que ha demostrado una gran eficacia como antibacteriano.

#### **CEPA 2: *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**

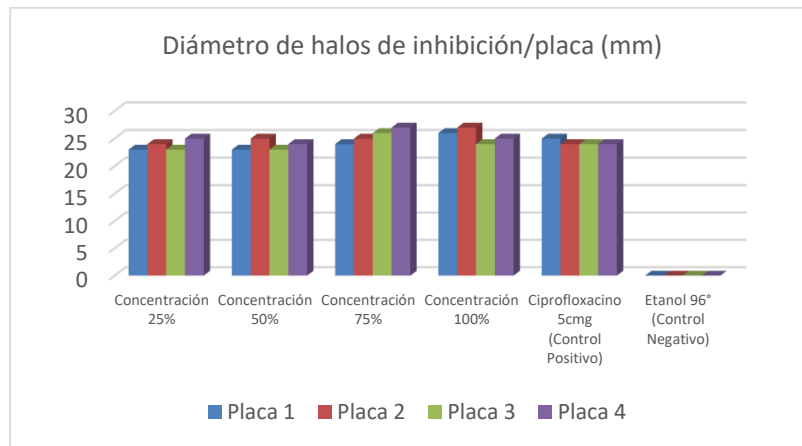
**Tabla 6.** Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) cepa 2

Placa	Porcentaje				Control Positivo Ciprofloxacino 5cmg	Control Negativo (Etanol 96°)
	25%	50%	75%	100%		
1	23mm	23mm	24mm	26mm	25mm	
2	24mm	23mm	25mm	27mm	24mm	
3	23mm	23mm	26mm	24mm	24mm	
4	25mm	24mm	27mm	25mm	24mm	

Fuente: Datos recolectados por el investigador 2021.

La **tabla 6** se observa mediciones de los halos producidos por los discos con los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, cuatro repeticiones para cada concentración, además de las medidas de los controles positivos y negativos en igual número de repeticiones sobre la cepa 2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).

**Figura 5.** Diámetros en milímetros obtenidos de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre sobre la cepa 2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)



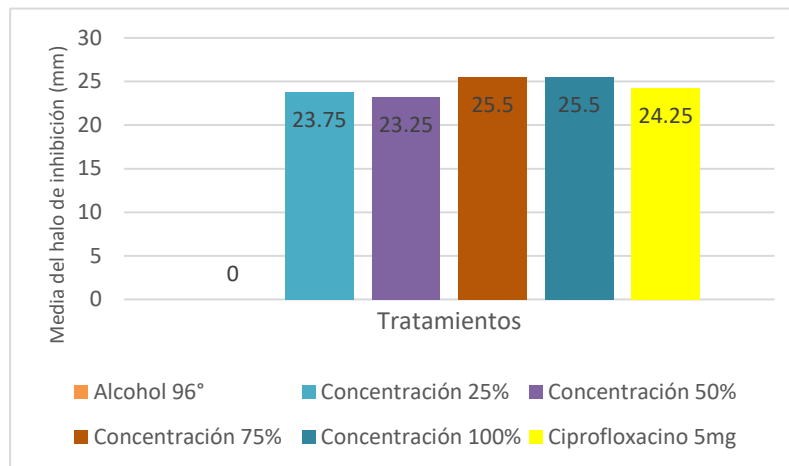
Observamos las mediciones de los halos producidos por los discos con los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, cuatro repeticiones para cada concentración, además de las medidas de los controles positivos y negativos en igual número de repeticiones sobre la cepa 2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).

**Tabla 7.** Estadística descriptiva obtenida del tamaño de los halos de inhibición producidos por los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) cepa 2

Tratamientos	Media	N	Desviación	Error estándar de la media	Varianza
Concentración 25%	23.7500	4	0.95743	0.47871	0.917
Concentración 50%	23.2500	4	0.50000	0.25000	0.250
Concentración 75%	25.5000	4	1.29099	0.64550	1.667
Concentración 100%	25.5000	4	1.29099	0.64550	1.667
Alcohol 96°	0.0000	4	0.00000	0.00000	0.000
Ciprofloxacino 5mg	24.2500	4	0.50000	0.25000	0.250
Total	20.3750	24	9.37996	1.91468	87.984

Fuente: Elaboración propia

**Figura 6.** Comparación de Medias para la cepa 2



La tabla N°7 y figura N°6 encontramos los valores de la media (suma de cada halo inhibido por tratamiento entre la repetición para cada tratamiento o grupo), desviación estándar, error estándar, y la varianza obtenidos de los datos recolectados para los halos de inhibición producidos por efecto de los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100%, control positivo y negativo.

**Tabla 8.** Análisis de varianza con los halos de inhibición de los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

**Análisis de varianza (ANOVA)**

ANOVA					
	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Entre grupos</b>	2009.375	5	401.875	507.632	0.000
<b>Dentro de grupos</b>	14.250	18	0.792		
<b>Total</b>	2023.625	23			

Fuente: Elaboración propia.

El valor de significancia obtenido ( $p=0.00 < 0.05$ ) al realizar el análisis de varianza nos indica que existe diferencias significativas entre los diferentes tratamientos experimentales, existiendo al menos un tratamiento que mostró resultados diferentes a los obtenidos en los demás grupos experimentales.

**Tabla 9.** Resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre los diferentes tratamientos experimentales de la investigación sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)

**Prueba de comparaciones múltiples**

COMPARACIONES MÚLTIPLES – PRUEBA DE TUKEY				
(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
Concentración 25%	Concentración 50%	0.50000	0.62915	0.965
	Concentración 75%	-1.75000	0.62915	0.107
	Concentración 100%	-1.75000	0.62915	0.107
	Alcohol	23.75000	0.62915	0.000
	Ciprofloxacino	-0.50000	0.62915	0.965
Concentración 50%	Concentración 25%	-0.50000	0.62915	0.965
	Concentración 75%	-2.25000	0.62915	0.022
	Concentración 100%	-2.25000	0.62915	0.022
	Alcohol	23.25000	0.62915	0.000
	Ciprofloxacino	-1.00000	0.62915	0.615
Concentración 75%	Concentración 25%	1.75000	0.62915	0.107
	Concentración 50%	2.25000	0.62915	0.022
	Concentración 100%	0.00000	0.62915	1.000
	Alcohol	25.50000	0.62915	0.000
	Ciprofloxacino	1.25000	0.62915	0.387
Concentración 100%	Concentración 25%	1.75000	0.62915	0.107
	Concentración 50%	2.25000	0.62915	0.022
	Concentración 75%	0.00000	0.62915	1.000
	Alcohol	25.50000	0.62915	0.000
	Ciprofloxacino	1.25000	0.62915	0.387
Alcohol 96°	Concentración 25%	-23.75000	0.62915	0.000
	Concentración 50%	-23.25000	0.62915	0.000
	Concentración 75%	-25.50000	0.62915	0.000
	Concentración 100%	-25.50000	0.62915	0.000
	Ciprofloxacino	-24.25000	0.62915	0.000

<b>Ciprofloxacino 5mg</b>	<b>Concentración 25%</b>	0.50000	0.62915	0.965
	<b>Concentración 50%</b>	1.00000	0.62915	0.615
	<b>Concentración 75%</b>	-1.25000	0.62915	0.387
	<b>Concentración 100%</b>	-1.25000	0.62915	0.387
	<b>Alcohol</b>	24.25000	0.62915	0.000

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostraron que los tratamientos con ciprofloxacino, 25, 75 y 100% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.*, cuyos halos de inhibición fueron de 24.25mm, 23.75mm, 25.5mm y 25.5mm respectivamente, fueron los que demostraron mayor eficacia, resultando ser estos estadísticamente iguales. Al utilizarse una concentración de 50% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.*, se obtuvo un halo de inhibición de 23.25mm, siendo estadísticamente igual a los resultados obtenidos al utilizar ciprofloxacino y 25% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L.* El control negativo, en el que se hizo uso de alcohol, no mostró halo de inhibición, siendo nula su eficacia.

**Tabla 10.** Subconjuntos de tratamientos experimentales del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L* “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) cepa 2, con valores estadísticamente iguales, obtenidos por

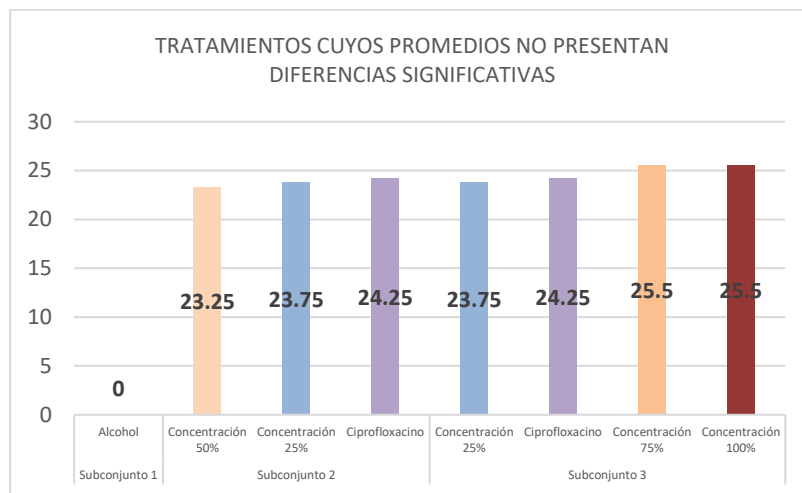
Tratamientos	N	Subconjuntos		
		1	2	3
<b>Alcohol</b>	4	0.0000		
<b>Concentración 50%</b>	4		23.2500	
<b>Concentración 25%</b>	4		23.7500	23.7500
<b>Ciprofloxacino</b>	4		24.2500	24.2500
<b>Concentración 75%</b>	4			25.5000
<b>Concentración 100%</b>	4			25.5000

Fuente: Elaboración propia

Los grupos experimentales que forman cada subconjunto son iguales entre sí estadísticamente, mientras que cada subconjunto es diferente entre sí. Estadísticamente, los valores obtenidos en los grupos tratados con ciprofloxacino y con 25%, 75% y 100% de extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao L* resultaron ser iguales, demostrando de esta forma que el extracto etanólico presentan la misma eficacia antibacteriana que el ciprofloxacino, y cuyos resultados

fueron numéricamente superiores a este al usarse concentraciones de 75% y 100%. Los valores obtenidos del grupo tratado con 50% de extracto etanólico no mostraron diferencias significativas con los grupos tratados con ciprofloxacino y 50% del mismo extracto. El grupo control negativo, tratado con alcohol, mostró nula eficacia.

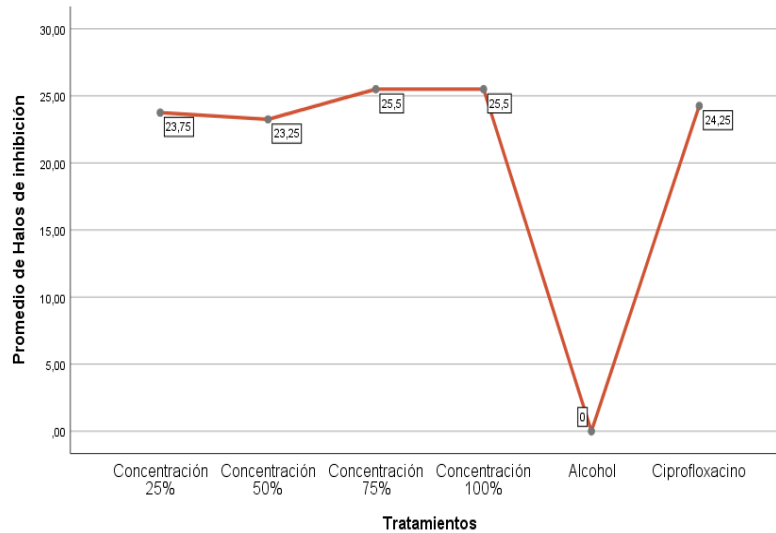
**Figura 7.** Promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre la cepa 2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)



El gráfico de barras nos muestra un resumen por subconjuntos de la prueba de Tukey donde se puede visualizar la comparación de los grupos de trabajos y su relación entre ellos, se observa una estrecha relación entre los grupos del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” al 25%, 50%, 75% y 100% y el control positivo.

**Figura 8.** Gráfica lineal de los promedios de los valores obtenidos en los distintos grupos experimentales de la investigación del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica

**Grafica N°8:**



La grafica nos muestra los promedios de halo de inhibición obtenidos para cada grupo experimental. Se puede observar que al aumentar la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” en los tratamientos, aumenta su efecto antibacteriano, llegando a su punto máximo al utilizar un 75% del extracto y logrando resultados estadísticamente iguales al grupo tratado con ciprofloxacino. Todas las concentraciones usadas en este estudio experimental obtuvieron valores de halo de inhibición estadísticamente iguales a los valores obtenidos al usar ciprofloxacino, sin embargo, los que mostraron mayor eficacia fueron los tratamientos de 75 y 100% de concentración de extracto etanólico, que, aunque mostraron ser iguales estadísticamente al ciprofloxacino, obtuvieron halos de inhibición ligeramente superiores a los obtenidos con este.

Se demostró entonces que el extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” mostraron una eficacia igual a la del ciprofloxacino, pudiendo ser reemplazado su uso por un tratamiento con 25% de extracto etanólico.

Se recomienda realizar el estudio del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” a concentraciones menores, ya que ha demostrado una gran eficacia como antibacteriano.

#### IV. DISCUSIÓN

*Theobroma cacao* L “cacao” es una planta comercializada generalmente para el consumo humano, pero es poco aprovechado el conocimiento sobre sus propiedades medicinales, esta planta contiene principios activos ricos en compuestos fenólicos que le confieren diversas propiedades entre ellas propiedades antibacterianas que pueden utilizarse en diversas patologías, por tal motivo, nuestra investigación tuvo como objetivo general, evaluar el efecto antibacteriano in vitro de los extractos etanolicos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), con respecto a este objetivo se halló que los extractos etanolicos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” presentaron efecto antibacteriano a las concentraciones de 25%, 50%, 75 % y 100% frente a dos cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH).

Con respecto al primer objetivo, identificar cuál de las cuatro concentraciones (25%, 50%, 75 % y 100%) del extracto etanolic de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” es más efectiva contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) se obtuvo que el extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” expuesto a dos cepas de la bacteria en estudio, para la primera cepa 1 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) obtuvo halos de inhibición de 24.25mm para el 25%, de 26.75mm para el 50%, de 32.50mm para el 75% y de 37.00mm para el 100%, los grupos control positivo (ciprofloxacino) y negativo (alcohol 96°) presentaron halos de inhibición de 29.75mm y 0.00 mm respectivamente. De la misma manera se trabajó con la cepa 2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), el extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” obtuvo halos de inhibición de 23.75mm para el 25%, de 23.25mm para el 50%, de 25.50mm para el 75% y de 25.50mm para el 100%, los grupos control positivo (ciprofloxacino) y negativo (alcohol 96°) presentaron halos de inhibición de 24.25mm y 0.00mm respectivamente.

De los resultados se deduce que concentración al 100% de *Theobroma cacao* “cacao” es más efectiva contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Además de la prueba de análisis de la varianza (Tabla 4) se demostró diferencias significativas en el análisis de los grupos de estudio, en ese sentido, se complementó el análisis mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 5 y 6) donde se observa que todos los grupos de experimentales a base del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L “cacao” presentaron efecto antibacteriano al compararse con el control negativo, existiendo efecto similar entre las concentraciones del 25%,



50%, 75% y control positivo (ciprofloxacino), la concentración al 100% presento efecto antibacteriano similar solo con la concentración al 75% y control positivo, de la misma forma para la cepa 2, se realizaron las respectivas pruebas obteniendo similares resultados, lo que se observan en la tabla 8-10. Lo que se corrobora con los estudios de Poma (2018) determinaron también el efecto del antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivos de bacterias extraídas de piezas dentales con caries de pacientes, los resultados mostraron halos de inhibición para las concentraciones detalladas: 5mg/ml = 9,4mm; 10mg/ml = 11,4mm; 15mg/ml = 16,6mm; 20mg/ml = 19,6mm; 25mg/ml = 20,2mm; 30mg/ml = 22,7mm. De manera similar se demuestra el poder antibacteriano del extracto de la planta *Theobroma cacao* L sobre estas bacterias. De manera similar, Orihuela J. (2016) determinó la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario, los resultados del estudio mostraron aumento del halo de inhibición con respecto a la concentración del extracto y disminución en el conteo de unidades formadoras de colonias para esta bacteria, de manera similar se demostró el efecto antibacteriano de esta planta contra

Con respecto al segundo objetivo cual fue determinar la Concentración Mínima de Inhibición (CMI) del extracto etanolico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” frente a los cultivos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) se obtuvo que el CMI a la concentración del 25%, lo que se corrobora con la investigación de Ruiz D. (2019) ya que en ambas se encontró que a menor concentración hay menor medición de halos de inhibición. Ruiz D. (2019) comparó el efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 observando que el colutorio al 12.5% resultó ser más efectivo contra *Streptococcus mutans* que los extractos hidroetanólicos al 12.5%, 25% y 50%, estos resultados difieren de los encontrados en relación a la CMI en el estudio de *Theobroma cacao* “cacao” pero los componentes presente en el colutorio pueden influir en su efecto antibacteriano y disminuir el CMI del *Theobroma cacao*. Así mismo con la investigación de Carrera P. (2018), estudio también el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la pulpa que recubre las semillas del cacao (*Theobroma cacao*) a diferentes concentraciones sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, los resultados obtenidos a las concentraciones del 10%, 20%, 30% y 40%, mostraron efecto inhibitorio leve incluso a la concentración del 10% la que se considera su CMI, resultados que difieren aparentemente con los encontrados en el estudio, pero existe una diferencia en el solvente utilizado para la extracción de los principios activos

de la planta además de las concentraciones empleadas en el estudio son diferentes a las nuestras, lo que también sugiere que el extracto acuoso no extrae adecuadamente los principios contenidos en la planta.

Con respecto al tercer objetivo, comparar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” frente a la acción de la forma comercial de un bactericida como Ciprofloxacino de 5 mcg al comparar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” se encontró que las concentraciones al 75% y 100% presentan igual o mayor capacidad antibacteriana que este medicamento. Lo se asemeja con el estudio realizado con Carrillo J y Pilligua D. (2019) sobre el efecto Inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad ccn51 en *Salmonella* y *Escherichia coli* demostrando un mayor efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* en comparación con *Salmonella* empleando el método de difusión, estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos en el estudio con la misma bacteria (*Escherichia coli*), esto hace notar que los compuestos fenólicos presentes en *Theobroma cacao* son los compuestos bioactivos que le confieren a esta planta su capacidad antibacteriana.

De los estudios revisados los resultados obtenidos en estos demuestran el efecto antibacteriano de *Theobroma cacao* L. sobre diferentes bacterias, aunque existen pocos estudios de la acción de esta planta sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) los estudios respaldan nuestros resultados al mostrar de la misma forma efecto antibacteriano de esta planta.

## V. CONCLUSIONES

1. Se evaluó el efecto antibacteriano in vitro de los extractos etanolicos de las hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” a las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) empleando el método de difusión en pozo donde se demostró que todas las concentraciones estudiadas presentan efecto antibacteriano sobre esta bacteria.
2. La concentración del 100% del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” demostró ser más efectiva contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) al obtener mayor tamaño del halo de inhibición sobre las cepas estudiadas.
3. La Concentración Mínima de Inhibición (CMI) del extracto etanolic de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” observada frente a los cultivos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) fue del 25%.
4. El extracto etanolic de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” a la concentración del 25% y 50% demostró tener similar efecto antibacteriano que el ciprofloxacino (5 mcg), pero las concentraciones del 75% y 100% presentaron mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) que el ciprofloxacino.

## VI. RECOMENDACIONES

- 1 El enorme potencial que demuestra *Theobroma cacao* “cacao” en el tratamiento de infecciones bacterianas debe ser estudiado de manera más amplia por lo que se recomienda profundizar estudios sobre los principios activos que contiene esta planta.
- 2 La baja Concentración Mínima de Inhibición (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” puede ayudar a formular preparados farmacéuticos con poder antibacteriano, lo que se recomienda elaborar estudios al respecto.
- 3 El efecto comparado del extracto etanólico de las hojas de *Theobroma cacao* “cacao” con ciprofloxacino demuestra la eficacia del extracto lo que puede ayudar en los tratamientos de enfermedades, por lo que se recomienda el uso complementario de esta planta o evaluar su efecto sinérgico con otros fármacos.
5. Se recomienda a la población el consumo y uso de las plantas medicinales sobre esto la estudiada como tratamiento preventivo o profiláctico para curar infecciones de leves y evitar de esta manera el uso indiscriminado de medicamentos.

## REFERENCIAS

1. González J, Maguiña C, González FM. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Med Perú*. [Internet]; 2019; [Revisado el 09 de febrero del 2021]; 36(2):145-51. Disponible en la URL: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v36n2/a11v36n2.pdf>
2. Aguilar F, Aguilar S, Cubas D, Coaguila L, Fernández D, Moreno M, Campos R, Guevara G. y Díaz R. (2016). Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI-UCIN) de un Hospital al Norte del Perú. *Horizonte Médico*, 16(3), 50–57. Recuperado en: [http://usmp.edu.pe/medicina/medicina/horizonte/2016\\_3/Art7\\_Vol16\\_N3.pdf](http://usmp.edu.pe/medicina/medicina/horizonte/2016_3/Art7_Vol16_N3.pdf)
3. Poma E. Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al Centro de Salud Ciudad Nueva. [Internet] 2018. Tesis de Pregrado Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. [Citado el 30 de enero]. Disponible en la URL: <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3306>
4. Orihuela J. Actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Theobroma cacao* L. sobre el crecimiento y adherencia in vitro de *Streptococcus mutans* a esmalte dentario. [Internet]. Tesis de Pregrado Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2016. [Citado el 09 de febrero]. Disponible en la URL: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/5485?show=full>
5. Ruiz D. Comparación del efecto antibacteriano entre el extracto y colutorio a base de semilla de *Theobroma cacao* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo – 2018. Tesis de Pregrado Universidad Los Angeles de Chiclayo (ULADECH CATOLICA). 2019. [Internet]. 2018 [Citado el 09 de febrero]. Recuperado en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/10346>
6. Carrera P. Efecto Inhibitorio de la pulpa que recubre las semillas del Cacao (*Theobroma Cacao*) a diferentes concentraciones sobre La Cepa De *Streptococcus mutans*: estudio in Vitro. [Internet]. Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador 2018. [Citado el 10 de febrero]. Recuperado <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15186>
7. Aguirre E, Tiburcio L, Rivera A, Mantilla, Manuel, Uscanga C, Capetillo G. Efectividad del cacao sobre el desarrollo del Biofilm en estudiantes de Odontología Veracruz, generación. [Internet] 2018. [Citado el 10 de febrero 2021]. *Rev Mex Med Forense*;

- 4(suppl 1):16-18. Recuperado en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/forense/mmf-2019/mmfs191f.pdf>
8. Carrillo J. y Pilligua C. Evaluación del efecto inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de Theobroma cacao de la variedad ccn51, en salmonella y e. Coli. Tesis De Pregrado Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí, Manta, [Internet] Ecuador. [Citado el 10 de febrero 2021]; Recuperado en: <https://repositorio.ulead.edu.ec/bitstream/123456789/1948/1/ULEAM-AGROIN-0037.pdf>
  9. Sotelo L. Alivis A. 2018 Extracción con compuestos con actividad antimicrobiana a partir de subproductos del Cacao. Rev. Asociación colombiana de ciencia y tecnología de alimentos. [Internet]; 2018. [Citado el 10 de febrero 2021]; pag(3)2.E.37: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/500/391>
  10. Sánchez, E.N. 2017. Efecto de tipos de secado del cacao (Theobroma cacao L.) CCN-51 en la preservación de polifenoles totales y antocianinas. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto. [Internet]. 2017. [Citado el 10 de febrero]. Recuperado en: <http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/2460/Tesis%20Elsa%20Sanchez%20Alamo%20-%20Completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  11. López Cuadra, Y. M., Cunias Rodríguez, M. Y., Carrasco Vega, Y. L. El cacao peruano y su impacto en la economía nacional. Universidad y Sociedad, 12(3), 344-352. [Internet]. 2020. [Citado el 10 de febrero]. Disponible en la URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/rus/v12n3/2218-3620-rus-12-03-344.pdf>
  12. Ortiz S, Jimena M, Ibieta G, Alejo I, Tejeda L, Peralta C, Aliaga-Rossel E, Mollinedo P y Peñarrieta J. Determinación de teobromina, catequina, capacidad antioxidante total y contenido fenólico total en muestras representativas de cacao Amazónico Boliviano y su comparación antes y después del proceso de fermentación. [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 26 de marzo de 2021]. *Revista Boliviana de Química*, 36(1), 40-50. Recuperado en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0250-54602019000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602019000100004&lng=es&tlng=es)
  13. Murillo S, Ponce F, Huamán M. Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (Theobroma cacao L.). [Publicación en línea]. 2020. [Citado el 28 de marzo de 2021]. *Manglar*; 17(1): 67-73. Recuperado en: <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/2345>

14. Ordoñez ES, León A, Rivera H y Vargas E. Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia* [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 28 de marzo de 2021]. *Agropecuaria*, 10(2), 175-183. Recuperado en: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.02>
15. Lujano E y Manganiello L, Contenido A y Ríos Á. Identificación y cuantificación de (+) - Catequinas y Procianidinas en cacao procedente de Ocumare de la Costa, Venezuela. [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 29 de marzo de 2021]. *Revista Ingeniería Uc*, 26 (2), 192-201. [Fecha de Consulta 27 de marzo de 2021]. ISSN: 1316-6832. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70760276008>
16. Morales A, Hernández J, Valladares B, Velázquez V, Delgadillo L, Rosenfeld C, et al. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria. *Abanico vet* [revista en la Internet]. 2020 dic [citado 2021 28 de marzo]; 10: e1. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-61322020000100101&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322020000100101&lng=es)
17. ECHA - Agencia de la Unión Europea [Internet]. España 2020 [Citado el 28 de marzo 2020]. Disponible en la URL: <https://echa.europa.eu/es/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>
18. Álvarez D, Garza G, Vázquez R. Quinolonas Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. [Publicación en línea]. 2015. [Citado el 29 de marzo de 2021]. *Rev. Chilena Infectol.* 2015; 32 (5): 499-504. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v32n5/art02.pdf>.
19. Ríos D, Cerna J.F, Morán N, Meza M, Estrada T. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogenia y modelo murinos. [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 29 de marzo de 2021]. *Med Mex.*;155(4):410-416. Recuperado en: <https://ipn.elsevierpure.com/es/publications/enterotoxigenic-and-enteroaggregative-escherichia-coli-prevalence>
20. Yacarini E, Arriaga EV, Alvarado R y Fupuy JA. Genes de virulencia de *Escherichia coli* detectados en muestras diarreicas de niños de la Región Lambayeque - Perú. [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 29 de marzo de 2021]. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(1), 7-12. Recuperado de:

<https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n1.02>

21. Yacarini A, Arriaga E y Beltrán R. Detección de Patotipos de Cepas de Escherichia coli Causantes de Diarrea Infantil de Establecimientos de Salud de la Región Lambayeque-Perú. [Publicación en línea]. 2020 [Citado el 26 de marzo de 2021]. *Revista Del Cuerpo Médico Del HNAAA*, 13(3), 299 - 302. Recuperado de: <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2020.133.741>
22. Lópe ME, Aguilar A, Aguilar S, Xolalpa S. Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en México: Una revisión etnobotánica-médica. *Polibotánica*. [Internet]; 2017; [Citado el 26 de marzo del 2021]; (44): 195-216. Recuperado en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6541581>
23. Carlos M, Barrera G y Díaz J. Mecanismos de Patogenicidad de Escherichia Coli y Salmonella SSP. [Publicación en línea]. 2019. [Citado el 29 de marzo de 2021]. *Revista De Educación En Ciencias E Ingeniería*. 2019; 113: 5 -17. Recuperado de: <https://contactos.izt.uam.mx/index.php/contactos/article/view/16>
24. Véliz N, Peñaherrera M, Alcívar A, Acosta F, Ávila Y y Hernández S. Diagnóstico y tratamiento de infecciones gastrointestinales en niños. [Publicación en línea]. 2019 [Citado el 26 de marzo de 2021]. *RECIMUNDO*. 2019; 3(2): 1021-1047. Recuperado en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/489>
25. Ramírez A. Metodología de la Investigación Científica [Internet]. Colombia 2007 [Citado el 28 de octubre del 2020]. Disponible en: <http://www.postgradoune.edu.pe/pdf/documentos-academicos/ciencias-de-la-educacion/1.pdf>
26. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. [Publicación en línea] 5<sup>ta</sup> Ed. Editorial Mc Graw Hill: México; 2010. [Citado el 30 de marzo de 2021]. Recuperado en: [https://www.uv.mx/personal/cbustamante/files/2011/06/Metodologia-de-la-Investigaci%C3%83%C2%B3n\\_Samperi.pdf](https://www.uv.mx/personal/cbustamante/files/2011/06/Metodologia-de-la-Investigaci%C3%83%C2%B3n_Samperi.pdf)



## **ANEXOS**

### PROMEDIO DE VALORACIÓN

5

### OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente 2) Deficiente 3) Regular 4) Buena 5) **Muy Buena**

Nombres y Apellidos : Dra. Vilma Junchaya Yllescas  
DNI N° : Teléfono/Celular : 964959132  
Dirección domiciliaria : Av. Leandra Torres 274- San Carlos- Huancayo.  
Título Profesional : Química Farmacéutica  
Grado Académico : Magister  
Mención : Docencia e Investigación de nivel superior



---

**DNI: 21437163**

**Lugar y fecha: 24 de abril del 2021**

## PROMEDIO DE VALORACIÓN

95

## OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy Deficiente    2) Deficiente    3) Regular    4) Buena    5) Muy buena

Nombres y Apellidos        : Dra. Vilma Junchaya Yllescas

DNI N°        :        Teléfono/Celular        : 964959132

Dirección domiciliaria        : Av. Leandra Torres 274- San Carlo-Huancayo

Título Profesional    : Química Farmacéutica

Grado Académico    : Magister

Mención        : Docencia e Investigación de nivel superior



---

***DNI:21437163***

***Lugar y fecha: 24 de abril del 2021***

## PROMEDIO DE VALORACIÓN

05

## OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente      2) Deficiente      3) Regular      4) Buena      5) **Muy buena**

Nombres y Apellidos : Mg IVAR JINES LAVADO MORALES  
DNI N° : 20655225      Teléfono/Celular : 990018724  
Dirección domiciliaria : Jr. Grau N° 921 - Chupaca  
Título Profesional : Químico Farmacéutico  
Grado Académico : Magister  
Mención : Salud Pública


Mg. Ivar J. Lavado Morales  
QUÍMICO FARMACÉUTICO  
CQFP. 09988

**Firma**

**Lugar y fecha: Huancayo, 20 de Abril del 2021**

## PROMEDIO DE VALORACIÓN

96.5

## OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy Deficiente    2) Deficiente    3) Regular    4) Buena    5) **Muy buena**

Nombres y Apellidos : Mg. IVAR JINES LAVADO MORALES  
DNI N° : 20655225                      Teléfono/Celular : 990018724  
Dirección domiciliaria : Jr. Grau N° 921 – Chupaca  
  
Título Profesional : QUIMICO FARMACEUTICO  
Grado Académico : Magister  
Mención : Salud Pública

  
*Mg. Ivar J. Lavado Morales*  
QUIMICO FARMACÉUTICO  
CQFP. 09988

**Firma**

**Lugar y fecha: Huancayo, 20 de Abril del 2021**

### PROMEDIO DE VALORACIÓN

05

### OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente      2) Deficiente      3) Regular      4) Buena      5) ~~Muy Buena~~

Nombres y Apellidos : Dra. Jacqueline Jorka Peña Marín  
DNI N° : 20117267      Teléfono/Celular : 954815714  
Dirección domiciliaria : Jr. San Jorge N°343 – San Antonio – Huancayo  
Título Profesional : Químico Farmacéutico  
Grado Académico : Doctor  
Mención : Doctor en Criminalística



Jacqueline Jorka Peña Marín  
QUÍMICO FARMACÉUTICO  
C.O.F.P. 09384  
D.N.I. 20117267

**Firma**

**DNI:** 20117267

**Lugar y fecha:** 18 de abril del 2021

## PROMEDIO DE VALORACIÓN

95

## OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente      2) Deficiente      3) Regular      4) Buena      5) ~~Muy Buena~~

Nombres y Apellidos : Dra. Jacqueline Jorka Peña Marín  
DNI N° : 20117267      Teléfono/Celular : 954815714  
Dirección domiciliaria : Jr. San Jorge N°343 – San Antonio – Huancayo  
Título Profesional : Químico Farmacéutico  
Grado Académico : Doctor  
Mención : Doctor en Criminalística



Jacqueline Jorka Peña Marín  
QUÍMICO FARMACÉUTICO  
C.O.F.P. 09884  
D.N.I. 20117267

**Firma**

**DNI:** 20117267

**Lugar y fecha:** 18 de abril del 2021

**Anexo A. Matriz de consistencia**

Problema general	Objetivo general	Hipótesis general	Variables y dimensiones	Metodología
<p>¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” sobre Escherichia coli enterohemorrágica (ECHE)?</p>	<p>Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” sobre Escherichia coli enterohemorrágica (ECHE).</p>	<p>H1: El extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao “cacao”, tiene efecto antibacteriano in vitro sobre Escherichia coli enterohemorrágica (ECHE).</p> <p>H0: El extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao”, no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE).</p>	<p>Variables:</p> <p><b>Variable Independiente</b></p> <p>Extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao”</p> <p><b>Variable dependiente:</b></p> <p>Efecto antibacteriano in frente a <i>Escherichia</i> enterohemorrágica (ECHE)</p> <p>Dimensiones:</p> <p><b>Variable Independiente:</b></p> <p>Concentración Ciprofloxacina</p> <p><b>Variable Dependiente:</b></p> <p>Crecimiento de Echerichia</p>	<p><b>Método:</b> tipo y diseño</p> <p><b>Tipo de investigación:</b> Aplicativa</p> <p><b>Diseño de la investigación:</b> Experimental</p> <p><b>Según su ubicación:</b> temporal transversal</p> <p><i>coli</i></p> <p>Según La población de toma de datos: Prospectivo</p> <p><b>Población:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cepas de Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH)</li> <li>- Hojas de Theobroma cacao L “cacao”</li> </ul> <p><b>Muestra:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dos cepas Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH)</li> <li>- 4 concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% de extractos etanólicos de Theobroma cacao “cacao”.</li> </ul>



Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas		Técnicas de recopilación de información:
<p>Qué concentración del extracto etanólico obtenido de las hojas de Theobroma cacao L tendrá mayor efecto antibacteriano sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (ECEH)?</p> <p>¿Cuál será la concentración mínima de inhibición (CMI) del extracto etanólico de hojas de Theobroma cacao L “cacao” sobre la <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)?</p> <p>¿Existirá alguna diferencia significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” frente al Ciprofloxacino sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)?</p>	<p>Identificar cuál de las cuatro concentraciones (25%, 50%, 75 % y 100%) del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” es más efectiva contra <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE).</p> <p>Determinar la Concentración mínima de inhibición (CMI) del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” frente a los cultivos de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE).</p> <p>Comparar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao” frente a la acción antibacteriana de la forma comercial del Ciprofloxacina de 5 mcg.</p>	<p><b>H1:</b> El extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao L “cacao”, tiene efecto antibacteriano in vitro en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% frente <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE).</p> <p><b>H 0:</b> El extracto etanólico de las hojas de Theobroma cacao “cacao” no tiene efecto antibacteriano in vitro en las concentraciones de 25%,50%, 75%, 100% frente <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE)</p>		<p>Observación</p> <p>Análisis documental</p> <p>Técnicas de procesamiento de información:</p> <p>Guía de observación</p> <p>Guía de análisis documental HOJA DE REGISTRO</p>

**Anexo B. Operacionalización de variables**

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Extracto etanolico de las hojas de <i>Theobroma cacao</i> L “cacao”	Metabolitos secundarios de <i>Theobroma cacao</i> contenidos en un volumen de etanol	Concentración	Porcentaje	25%
				50%
				75%
				100%
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	Capacidad de inhibir o destruir el crecimiento bacteriano	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECHE)	Sensible	> 21mm
			Intermedio	18-20 mm
		Resistente	< 17 mm	
			Diámetro de halo de inhibición	mm
	Microscop	Forma bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano	Si / No	
	Macroscopía	Colonias rosas (lactosa positiva) opacas, circulares, de 2 a 4 mm de diámetro, convexas, de bordes enteros y suaves	Si / No	



*Anexo D. Certificado de análisis microbiológico*



## **ANALISIS MICROBIOLOGICO DE *Escherichia coli***

### **Certificado de análisis: especificación del microorganismo**

#### **Especificaciones:**

Nombre Microorganismo: *Escherichia coli*

Fecha de Expiración: 09/03/2022

Pureza: Puro

Fecha de análisis: 10/04/2021

#### **Detalles del Análisis:**

#### **Medio SBAP**

**Características Macroscópicas:** colonias grandes a medianas, borde entero y convexo de color blanco o blanco pálido, lisas, opacas y  $\beta$  hemolíticas.

**Características Microscópicas:** Cocos gram positivos, individuales o agrupados en pares o en racimos irregulares.

**Tinción: Gram**

#### **Otras características:**

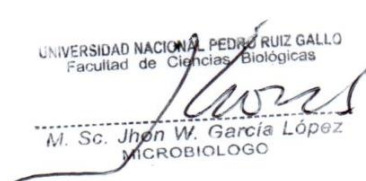
Catalasa (peróxido hidrogeno 3%): positivo

Coagulasa: positivo

Beta lactamasa: negativo

Chiclayo, 2 de abril del 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
Facultad de Ciencias Biológicas

  
M. Sc. Jhon W. García López  
MICROBIOLOGO

*Anexo E. Constancia de cepa microbiológica*



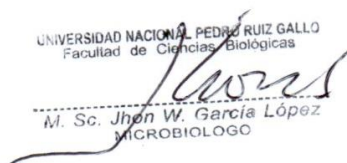
## CONSTANCIA

El que suscribe el Mtblgo MSc Jhon García Lopez Jefe del Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo suscribe los siguiente:

Que a solicitud de los interesados **Montenegro Maldonado María Oferlinda** y **Segura Cotrina Yolanda**, el área de Microbiología y Parasitología ha procedido a donar dos cepas bacterianas de *Escherichia coli* enterohemorrágica para la realización del proyecto de Investigación – Tesis: “**Efecto Antibacteriano in vitro del Extracto Etanólico de las Hojas de *Theobroma cacao* L “cacao” sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**” la misma que se viene ejecutando en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo - Laboratorio de Microbiología y Parasitología.

Dejo constancia de la presente a solicitud de los interesados

Chiclayo, 2 de abril del 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
Facultad de Ciencias Biológicas  
  
M. Sc. Jhon W. García López  
MICROBIOLOGO

## **Anexo F. Identificación Botánica de la planta**

**"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"**

### **CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA**

El que suscribe: Dr. CESAR ESTELA CAMPOS, profesor principal de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo –Lambayeque, Facultad de Ciencias Biológicas, Adscrito al Departamento Académico de Botánica, deja constancia:

Que, la determinación del nombre científico de la muestra botánica alcanzada por las Bachilleres: Yolanda Segura Cotrina y María Orferlinda Montenegro Maldonado , para su Tesis titulada: "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Theobroma cacao* L. "CACAO" SOBRE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA (ECEH)-2021 ", de la Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la UNIVERSIDAD PRIVADA DE HUANCAYO "FRANKLIN ROOSEVELT", para su identificación taxonómica y descripción morfológica corresponde a la especie:

*Theobroma cacao* L. subsp. *Sphaerocarpum* (A. Chev.) Cuat.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida C.Agardh

Subclase: Magnoliidae Novak ex Takht.

Orden: Malvales Juss.

Familia: Malvaceae Juss.

Género: *Theobroma* L.

Se expide la presente constancia para los fines académicos que la parte interesada considere pertinente.

Chiclayo, 28 de Mayo del 2021.

  
Dr. CESAR ESTELA CAMPOS

Profesor Principal, Depto Académico de Botánica-FCB  
Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo-Lambayeque  
correo: cesar@unprrg.edu.pe  
Tel: 05738625

*Anexo G. Evidencias fotográficas del trabajo de campo*

*Figura 1: : Hojas de Theobroma cacao L "cacao" recolectado en Batan*



*Fuente: elaboración propia*

*Figura 2: : lavado y secado de la muestra vegeta*



*Fuente: elaboración propia*

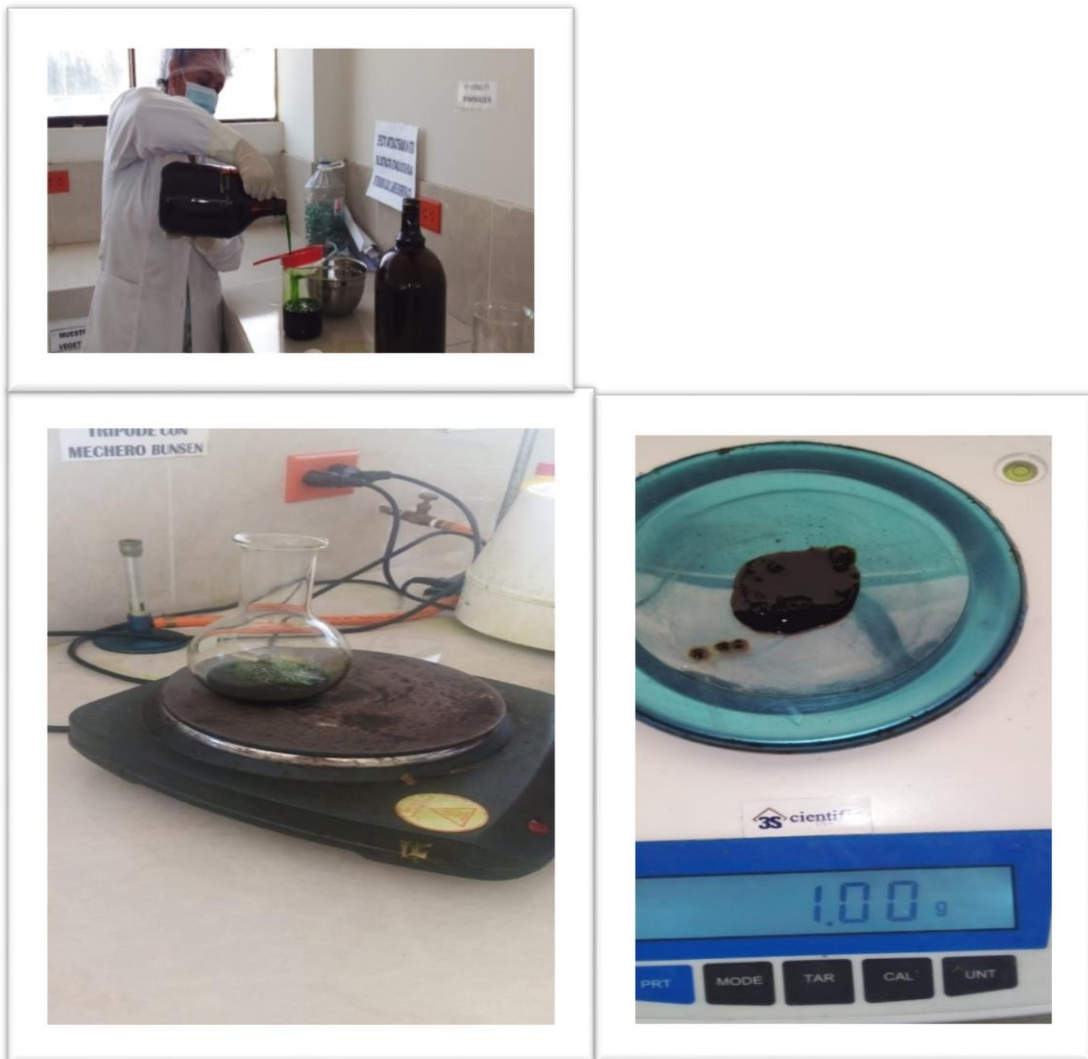
Figura3: *preparación del macerado*



*Fuente: elaboración propia*



figura 6: proceso del filtrado



*Figura 7: sembrado en placas*



*Figura 8: medición de halos de inhibición*



*Fuente: elaboración propia*

Anexo H. Recolección de datos de la medición de halos de inhibición

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Theobroma cacao* L “CACAO”  
SOBRE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA (ECEH) – 2021**

Ficha de recolección de datos

ESPECIES	CEPAS	Concentración de extracto etanolico de hojas de <i>Theobroma cacao</i> “cacao”																							
		25%				50%				75%				100%				Ciprofloxacino 5cmg				Alcohol 96°			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	EC1	25 mm	23 mm	24 mm	25 mm	28 mm	26 mm	28 mm	25 mm	35 mm	35 mm	20 mm	40 mm	35 mm	35 mm	20 mm	40 mm	28 mm	30 mm	26 mm	35 mm	0	0	0	0
	EC2	23 mm	2 mm	23 mm	25 mm	23 mm	25 mm	23 mm	24 mm	24 mm	25 mm	2 mm	27 mm	26 mm	27 mm	24 mm	25 mm	25 mm	24 mm	24 mm	24 mm	0	0	0	0

