

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE MONAGAS
ESCUELA DE ZOOTECNIA
PROGRAMA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE HOJAS DESHIDRATADAS DE
QUINCHONCHO (*Cajanus cajan*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Escherichia coli.**

TRABAJO DE GRADO

PRESENTADO POR:

**VÁSQUEZ CASTRO, RODOLFO JOSÉ
C.I: 14.424.793**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

MATURÍN, NOVIEMBRE DEL 2011


EFFECTO ANTIMICROBIANO DE HOJAS DESHIDRATADAS DE
QUINCHONCHO (*Cajanus cajan*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Escherichia coli.

TRABAJO DE GRADO

PRESENTADO POR:

VASQUEZ CASTRO, RODOLFO JOSE
C.I: 14.424.793

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dra. Belloso, Genette
Asesora



Ms.C. Cabello, María
Jurado Principal



Ms.C. Colivet, Julio
Jurado Principal

DEDICATORIA

Este trabajo principalmente está dedicado a la memoria de Román Castro Garrido (Papa lolo).

A mis padres y hermanos.

A todas aquellas personas que me han ayudado en el transcurso de mi vida para lograr todas mis metas.

Rodolfo Vásquez.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fortaleza y paciencia para alcanzar este logro.

A mis padres y hermanos por ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance.

A mis panas del alma Luis Felipe Vivenes, Antonio González y Daniel Farias gracias por su amistad, salud para todos.

A mis amigas Grecia Contreras, Marilyn Guillen y Rhina Meléndez de Guilarte por brindarme su amistad y cariño.

A mi profesora asesora Dra. Genette Belloso por los conocimientos impartidos, consejos y contribución en el desarrollo de mi trabajo de grado y mis estudios.

A los jurados de mi trabajo de grado, Msc. Julio Colivet y Msc. María Cabello, gracias por su ayuda y contribuir con mi formación académica.

Al señor Salvador Herrera, Freddy Acosta y Bladimir Pérez por su gran colaboración en la realización de la fase experimental de mi trabajo de grado.

A los “Mason”, Aníbal Vivenes y Jesús Rincones los cuales han demostrado ser excelentes personas y muy buenos amigos.

A mis grandes amigos Ernesto bastardo, Angel Farias, Alfredo Rivas (chencho), Dey Veracierta, Lerimirna Ascanio, Daniela tineo, Marlin Rondon,

Henry Indriago, María José Rodríguez, Carlos Rengel (lucho), Aurelio Añez, Aishel Ramirez y María Rengel gracias a todos por la amistad que me han brindado se les quiere.

A los siguientes profesores que contribuyeron con mi formación académica; Andrés Villafranca, Mario González, Gandi Yordi, Tamaiba Leonett, Martina milano, Mary Longart, Yrama malver, Carmen Farias, Norinda gil, Pedro Roldan, Carlos Bolivar, Nacy Villarruel, Yamal kade de Yordi, Loxner Silva, Amelia de Quiriagua, Adriangela Noriega, Luis Sergio Pereira, Miriam Luna, Augusto Zapata, Eduardo Ceconello, Luisa Gamboa y Cruz Castañeda a todos ellos muchas gracias por haber compartido sus conocimientos conmigo.

A mis amigos de Negro Primero, Leonardo Villalba, Héctor Vivenes, Nelson Tria, Hugo Villalba y Carlos Palma, por ser grandes amigos y por creer en mi y dame ánimos para lograr mis metas.

Al profesor Cecilo Malave por su amistad incondicional.

A Sohamy Cova, Omilcar Brito, María Gabriela López, Vanessa Márquez y Rosibel Bastardo.

A Marcel Quiroga, Flavio Vega y Andrei Canelón, porque han demostrado ser unos excelentes panas.

A Mabel Villafranca, Erika Aldana y Edward Campos por haber realizado un excelente trabajo en el servicio comunitario y ser muy buenos amigos.

A Crisalida y a Maigualida por ser las secretarias más cariñosas que ha tenido la escuela de Zootecnia gracias por todo las quiero.

Al personal de biblioteca, bienestar estudiantil, comedor, mantenimiento y control de estudios, gracias por haberme ayudado cuando más los necesite.

Rodolfo Vásquez



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS DE TEXTO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS DE TEXTO.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS DE APENDICE	xi
ÍNDICE DE CUADROS DE APENDICE	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPITULO I.....	17
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPITULO II.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
ANTIMICROBIANOS.....	4
CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS	4
Fenoles simples y Ácidos fenólicos.....	5
Ácidos hidroxicinámicos.....	5
Flavonoides.....	5
Alicinoides.....	6
TIPOS DE ANTIMICROBIANOS	6
Agentes antimicrobianos sintéticos.....	6
Ácidos orgánicos y ésteres.....	6
Agentes antimicrobianos naturales.....	7
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS	7
EXTRACCIÓN SÓLIDO- LÍQUIDO.....	8
MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	8
BACTERIAS EMPLEADAS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE SUSTANCIAS.....	9
Escherichia coli	9
Fisiología.....	10
El quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>).....	11
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	11
CAPITULO III.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
OBTENCIÓN DE LAS HOJAS.....	14
Selección de las hojas	14
Limpieza.....	15
Secado.....	15

Pulverización.....	15
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	15
DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
CAPITULO IV	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE METANOL Y CLOROFORMO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI	21
EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE ETANOL, HEXANO, ETER DE PETRÓLEO Y AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI.....	24
COMPARACION DE LAS TEMPERATURAS DE SECADO DE LAS HOJAS DE QUINCHONCHO	28
CAPITULO V	29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
CONCLUSIONES.....	29
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA.....	31
APENDICE	35
HOJAS METADATOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS DE TEXTO

- Figura 1. Proceso de elaboración de extractos de hojas de quinchoncho empleando Etanol, Hexano, Metanol, Éter de Petróleo, Cloroformo y Agua como solventes. 17
- Figura 2. Proceso de siembra para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos sobre el crecimiento de Escherichia coli. 19



ÍNDICE DE CUADROS DE TEXTO

Cuadro 1. Efecto antimicrobiano de los extractos de Metanol y Cloroformo de las hojas secas de quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i> a 65°C y 105°C.....	21
Cuadro 2. Efecto antimicrobiano de los extractos de etanol, hexano, éter de petróleo y agua de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i> . a 65°C y 105°C.....	24
Cuadro 3. Efecto de las temperaturas de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	28



ÍNDICE DE FIGURAS DE APENDICE

Figura 1. Planta de quinchoncho	40
Figura 2. Hojas de quinchoncho	40
Figura 3. Estufa Convencional Thomas Scientific a 65°C	41
Figura 4. Estufa Convencional Felisa Hornro a 105°C.....	41
Figura 5. Hojas deshidratadas de quinchoncho.....	42
Figura 6. Equipo de martillos Thomas Wiley modelo 4	42
Figura 7. Proceso de molienda de las hojas secas de quinchoncho.....	43
Figura 8. Muestras secas a 65°C y 105°C de hojas de quinchoncho.....	43
Figura 9. Pesada de las muestras secas de las hojas de quinchoncho.....	44
Figura 10. Balanza Denver Instrument company TR-104.....	44
Figura 11. Equipo de Goldfish.....	45
Figura 12. Extraccion de los extractos con el equipo de Goldfish.....	45
Figura 13. Extractos de metanol, cloroformo y éter de petróleo.....	46
Figura 14. Extractos de etanol y hexano.....	46
Figura 15. Materiales utilizados para determinar el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos.	47
Figura 16. Siembra de <i>E. coli</i> en placas de petri.....	47
Figura 17. Placas de Petri con discos de papel impregnados con los diferentes extractos.....	48
Figura 18. Halos de inhibicion en discos de papel impregnados con metanol.	48
Figura 19. Halos de inhibicion en discos de papel impregnados con cloroformo.....	49

ÍNDICE DE CUADROS DE APENDICE

Cuadro 1. Medias de los halos de inhibición de los extractos a 65°C y 105°C de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	36
Cuadro 2. Análisis de Varianza de los extractos de Metanol y Cloroformo para los halos obtenidos de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	36
Cuadro 3. Tabla de medias por mínimo cuadrado con intervalo del 95% para los halos obtenidos de las hojas deshidratadas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	37
Cuadro 4. Estadística descriptiva de los extractos de Metanol y Cloroformo para los halos obtenidos de las hojas deshidratadas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	37
Cuadro 5. Halos de inhibición de los extractos de Metanol de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	38
Cuadro 6. Halos de inhibición de los extractos de Cloroformo de las hojas secas de Quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>) sobre <i>Escherichia coli</i>	39

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de hojas deshidratadas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Para ello, se seleccionó 1Kg de hojas frescas para 2 diferentes temperaturas, las cuales se llevaron a secar en una estufa convencional marca Thomas Scientific, a 65°C por 72 horas y en una estufa convencional marca Felisa Horno, a 105°C por 4 horas; luego se llevó a molienda utilizando un equipo de martillos Thomas Wiley modelo 4 y una malla de 1 mm de diámetro. Los extractos de las muestras fueron obtenidos por el método de extracción de Goldfish, empleando como solventes: Etanol, Hexano, Metanol, Cloroformo, Éter de Petróleo y Agua. Para el estudio del efecto antimicrobiano se empleó el método de difusión en agar con discos de papel de filtro y se llevó a cabo una siembra masiva del microorganismo a estudiar en placas de Petri con agar nutritivo (BHI), se utilizaron discos estériles de papel de filtro de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con los extractos de etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y agua por separado, así como un disco control para cada uno, estos se colocaron sobre los medios de cultivo y se incubaron a 37 °C por 24 h, los resultados obtenidos mostraron efecto antimicrobiano solo con los extractos de metanol y cloroformo, por lo cual se midieron los halos de inhibición para estos dos extractos. Los resultados fueron interpretados mediante un paquete estadístico. Estos resultados mostraron que entre los extractos de cloroformo y metanol presentaron diferencias significativas, siendo el halo de mayor inhibición para *Escherichia coli* de 14 mm a una temperatura de secado de 65°C. Se aplicó una prueba de medias de Mínima Diferencia Significativa (MDS) de Duncan al 5%. Estadísticamente no hubo diferencia significativa para las 2 temperaturas. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal y Forrajes, Laboratorio de Microbiología de Alimento y Laboratorio de Tecnología de Alimento de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Oriente Núcleo Monagas Campus los Guaritos.

Palabras claves: Efecto antimicrobiano, extracto, quinchoncho.

SUMMARY

The objective of this investigation was to evaluate the antimicrobial effect of dried leaves of pigeon pea (*Cajanus cajan*) on the growth of *Escherichia coli*. For this, was selected 1 kg of fresh leaves to 2 different temperatures, which were carried to dry in a conventional stove mark Thomas Scientific, 65 ° C for 72 hours in a conventional stove mark Felisa Horno to 105 ° C for 4 hours, then led to crushing using a hammer team Thomas Wiley model 4 and a mesh of 1 mm in diameter. The extracts of samples were obtained by the Goldfish extraction method, employing as solvent ethanol, hexane, methanol, chloroform, petroleum ether and water. To study the antimicrobial effect was employed agar diffusion method with discs of filter paper and held a mass seeding of the microorganism to study in Petri dishes with nutrient agar (BHI), discs was utilized sterile filter paper 6 mm of diameter, which were impregnated with ethanol and hexane extracts separately, and a control disc for each one, these was placed on culture medium and incubated to 37 °C for 24 h, , giving as a result that the methanol and chloroform were they had with antimicrobial effect, by which was measured halos of inhibition for these two extracts. The results were interpreted using a statistical package. These results showed that between chloroform and methanol extracts presented significant differences with the halo of inhibition for *Escherichia coli* greater of 14 mm to 65 °C. Was applied a test average Minimum Significant Difference (MDS) of Duncan at 5%. There was no statistically significant difference for the 2 temperatures. The study was conducted in the laboratory of Animal Nutrition and Forages, Food Microbiology Laboratory and Laboratory of Food Technology, School of Zootecnia of the University of Oriente Nucleus Monagas Campus the Guaritos.

Keywords: antimicrobial effect, extract, *cajanus cajan*.

INTRODUCCIÓN

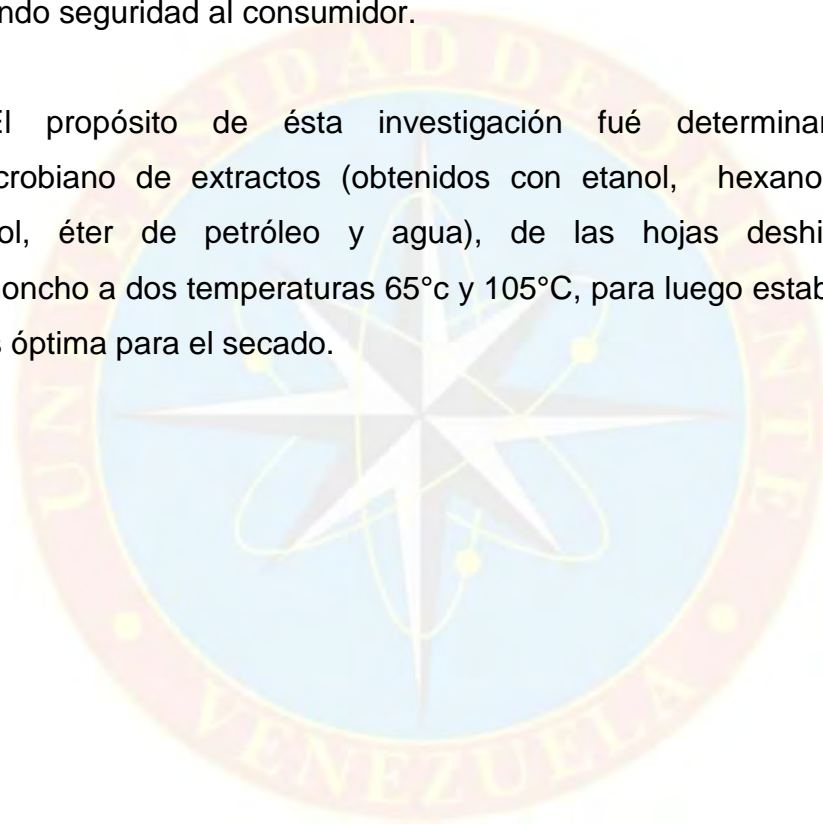
El quinchoncho (*Cajanus cajan*) es originario de África occidental o la India, pertenece a la familia Leguminosae. Esta especie fue introducida en Venezuela durante la época de la colonización española. Desde esa época ha venido desempeñando un papel muy importante en los huertos familiares del venezolano como cultivo asociado de maíz y yuca. Una vez que el quinchoncho se ha establecido, tiene un alto potencial para ser usado en agrosistemas aptos a la degradación, presentando mecanismos de adaptación a suelos ácidos al contribuir significativamente en el desarrollo sostenible de la región.

Representa una fuente de proteína vegetal (entre 20 y 30%), siendo una alternativa para contribuir a conformar una dieta balanceada para la comunidad en general, sus hojas van cayendo continuamente, contribuyendo a mejorar el contenido de materia orgánica del suelo ya que posee minerales como P, K, Ca, Na, Mg, Zn y Mn . Las semillas se aprovechan para la alimentación humana; por su alto contenido de lisina y metionina.

Tradicionalmente la presencia de microorganismos como es el *Escherichia coli*, se le ha considerado como indicador de contaminación fecal en el control de la calidad de productos alimenticios destinados al consumo humano, por tanto su ausencia es indicativa de que el producto es bacteriológicamente seguro y por esta razón se ha venido incrementando el uso de antimicrobianos tanto sintéticos como naturales para inhibir o retardar el crecimiento bacteriano.

Hoy en día los alimentos son incorporados al mercado con una variedad de químicos, que en muchas veces pueden causar efectos secundarios en las personas, y a través de un proceso de laboratorio utilizando especies vegetales de la región se le pueden extraer aceites esenciales, con los cuales se forma un extracto que se le aplica a los alimentos que actúan contra bacterias, contribuyendo así con la preservación de los mismos brindando seguridad al consumidor.

El propósito de ésta investigación fué determinar el efecto antimicrobiano de extractos (obtenidos con etanol, hexano, cloroformo, metanol, éter de petróleo y agua), de las hojas deshidratadas de quinchoncho a dos temperaturas 65°C y 105°C, para luego establecer cual es la mas óptima para el secado.



CAPITULO I

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antimicrobiano de hojas deshidratadas de quinchoncho sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto inhibitorio de los extractos de etanol, hexano, cloroformo, metanol, éter de petróleo y agua de hojas de quinchoncho deshidratadas a dos temperaturas sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.
- Comparar los extractos de hojas deshidratadas de quinchoncho sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.
- Establecer la temperatura óptima de secado de las hojas de quinchoncho causante del mayor efecto antimicrobiano.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

ANTIMICROBIANOS

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, en estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos (Doyle *et al.*, 2001).

Los antimicrobianos alimentarios son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o destruyen microorganismos, con lo que aumentan la resistencia a la alteración de su sanidad o calidad (Bernard *et al.*, 1996).

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Según Molinos (2003), los agentes antimicrobianos se pueden clasificar de diversas maneras entre la cuales se tienen:

- Fenoles simples y Ácidos fenólicos.
- Ácidos hidroxicinámicos
- Flavonoides.
- Alicinoides.

Fenoles simples y Ácidos fenólicos

Los fenoles simples son compuestos formados por un anillo aromático y un grupo alcohol sustituyendo uno de los hidrógenos de la cadena. Entre los compuestos fenólicos simples figuran los monofenoles (p-cresol), difenoles (hidroquinona) y trifenoles (ácido gálico). El ácido gálico se presenta en las plantas como ésteres de ácido quínico o taninos hidrolizables (ácido tánico) (Doyle *et al.*, 2001).

Ácidos hidroxicinámicos

Entre los ácidos hidroxicinámicos se encuentran los ácidos cafeíco, p-cumárico, ferúlico y sinápico. Frecuentemente se presentan como ésteres y más raramente como glucósidos. También se encuentran en vegetales y alimentos.

Las furocumarinas están relacionadas con los hidroxicinnamatos, estos compuestos son capaces de inhibir a muchas bacterias gram positivas, tales como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, después de la irradiación con luz UV de onda larga (365 nm), alterándose así la correcta replicación del ADN microbiano (Doyle *et al.*, 2001).

Flavonoides

Los flavonoides constan de catequinas y flavonas, flavonoles y sus glucósidos. Las protoantocianidinas o taninos condensados son polímeros de flaván-3-ol y se encuentran en las manzanas, uvas, fresas, ciruelas, sorgo y

cebada. Las bacterias del vinagre son ligeramente afectadas por taninos a concentraciones de 2,0000 µg/ mililitro de vinagre (Doyle *et al.*, 2001).

Alicinoides

Probablemente el sistema antimicrobiano mejor caracterizado en el reino vegetal se encuentra en el jugo de vapores de cebollas (*Allium cepa*) y ajos (*Allium sativum*). Los agentes volátiles tanto de la cebolla como la del ajo inhibían el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* y micobacterias en medios microbiológicos.

Los productos aparentemente responsables de la actividad antimicrobiana también son responsables del aroma de cebollas y ajos. Además de compuestos sulfurados antimicrobianos, las cebollas contienen los compuestos fenólicos: ácido protocatecuico y catecol, que pueden contribuir a las actividades antimicrobianas. Walter (1995), citado por (Doyle *et al.*, 2001).

TIPOS DE ANTIMICROBIANOS

Los antimicrobianos pueden ser divididos en dos clases, los sintéticos y los naturales.

Agentes antimicrobianos sintéticos

Ácidos orgánicos y ésteres

El modo de acción de los ácidos orgánicos en la inhibición del crecimiento microbiano parece estar relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la donación de protones y la producción de energía por

las células. Los sistemas biológicos y químicos dependen de la interacción entre los sistemas ácido-base (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

Uno de los factores que permite el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es el pH. En general las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6,5 a 7,5), pero sin embargo, son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9. Una manera efectiva de limitar el crecimiento de los microorganismos es incrementar la acidez del alimento. La capacidad de limitar el crecimiento de los microorganismos dependerá del tipo de microorganismos, especie, tipo y concentración del ácido, tiempo de exposición y la capacidad reguladora del alimento.

Agentes antimicrobianos naturales

Muchos alimentos tienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, en estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Inclusive muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos (Cowan 1999, citado por Cova y Rodríguez., 2008).

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos con fines antimicrobianos sobre los alimentos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesado o comercialización (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTIMICROBIANOS

Existen muchas técnicas de extracción de compuestos antimicrobianos pero las más utilizadas en muestras vegetales son las extracciones por presión y la extracción sólido-líquido. La extracción por presión solo es útil cuando el componente activo se encuentra presente en grandes cantidades, mientras que en el sólido-líquido es necesaria cuando existe una pequeña proporción del componente activo. (Mafart y Beliard., 1994).

Por esta razón en la presente investigación solo se definirá la extracción sólido-líquido

EXTRACCIÓN SÓLIDO- LÍQUIDO

También llamada extracción por disolvente; es una operación de transferencia de material destinada a separar los principios solubles de un sustrato sólido, mediante su difusión en un solvente y esta es utilizada cuando el componente activo existe en pequeñas cantidades. Operaciones de separación de este tipo se llevan a cabo, en una sola o en múltiples etapas o contactos (Mafart y Beliard., 1994).

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña del agente que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo control, valor que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC) (Madigan, 2000, citado por Castillo., 2008).

Existen varios métodos para determinar la actividad de un agente antimicrobiano; entre los cuales el más empleado es el método de difusión en agar; que también es conocido como el método de Kirby-Bauer. Este método

consiste en inocular uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar. Seguidamente se colocan sobre la superficie del agar solidificado, discos de papel de filtro con concentraciones conocidas de agente antimicrobiano. Durante la incubación los agentes antimicrobianos difunden por el agar a partir de los discos. Cuanto mas lejos del disco difunde mas baja es su concentración. Si el antimicrobiano es eficaz se forma un halo de inhibición que rodea al disco y puede medirse el diámetro de ese halo (Tortora, 1993).

BACTERIAS EMPLEADAS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE SUSTANCIAS

En muchos estudios para medir la actividad antimicrobiana de extractos vegetales se emplea la bacteria *Escherichia coli*, debido a que esta es de gran interés a nivel alimentario porque es un género fácil de manipular y presenta características distintas y está implicada en la mayoría de los casos de toxiinfecciones alimentarias (Bell y Kyriakides, 2000).

Escherichia coli

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos gram negativos, con frecuencias móviles, con flagelos peritricos. Fácilmente cultivables en los medios ordinarios. Aerobios y facultativamente anaerobios. Todas las especies fermentan la lactosa con formación de ácido o de gas, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

El hábitat principal de *Escherichia coli* es el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, las infecciones de *Escherichia coli* se transmiten por tres vías principales: directamente de los animales, mediante

propagación persona a persona y por medio de los alimentos contaminados (Bell y Kiriakides, 2000).

Fisiología

En cuanto a su fisiología *E. coli* es aerobio o anaerobio facultativo. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, tiene un tiempo de generación de 18-24 minutos. Puede crecer en un rango de temperatura entre 6 y 46 °C.

Crece en casi todos los alimentos, especialmente los que hayan sido contaminados con materia fecal, debido a una higienización insuficiente o a normas incorrectas de tratamiento de los alimentos o de higiene personal. (Bell y Kyriakides, 2000).

Sobrevive en un rango de pH de 4,4 a 9, a excepción de *E. coli* O157:H7 que es acidorresistente; y actividad de agua (A_w) superiores o iguales a 0,95. El cloruro de sodio a concentraciones de 2,5 % potencia su crecimiento, a concentraciones de 6,5 lo detiene, y de 8,5 % inhibe el crecimiento.

Escherichia coli es uno de los muchos grupos de bacterias que viven en los intestinos de los humanos sanos y en la mayoría de los animales de sangre caliente. Esta bacteria ayuda a mantener el equilibrio de la flora intestinal normal (flora bacteriana) contra las bacterias nocivas y sintetiza o produce algunas vitaminas. No obstante, existen muchos tipos o cepas de bacterias *E. coli*, las cuales tienen diferentes características distintivas. (Bell y Kyriakides, 2000).

El quinchoncho (*Cajanus cajan*)

El quinchoncho es originario de África occidental o la India. Es un arbusto perenne, de hasta 4 m de alto. Presenta un tallo: acostillado cuando joven, leñoso y rollizo con la edad. Presenta numerosas flores pediceladas (los pedicelos de hasta 15 mm de largo) dispuestas en inflorescencias racemosas pedunculadas (los pedúnculos de hasta 8 cm de largo). Cada flor acompañada de una bráctea pequeña (a veces tan reducida que parece una escama) de hasta 4 mm de largo, caediza.

Según (Stevens, 2001), clasifica al Quinchoncho (*Cajanus cajan*) de la manera siguiente:

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae.

Clase: Magnoliophyta.

Orden: Magnoliopsida

Familia: Leguminoceae.

Género: *Cajanus*

Especie: *Cajanus cajan*.

Hojas

En la base de las hojas sobre el tallo generalmente se presenta un par de hojillas (llamadas estípulas) angostamente triangulares, de hasta 6 mm de

largo; las hojas son alternas, compuestas de 3 hojitas (llamadas foliolos), las 2 laterales asimétricamente elípticas, de hasta 12 cm de largo y hasta 4.5 cm de ancho, la terminal elípticas, ovado-elípticas a angostamente ovadas, de hasta 13 cm de largo y hasta 5.5 cm de ancho, más o menos puntiagudas, angostadas hacia la base, con puntos glandulares sobre su superficie; en la base de cada foliolo se presenta un par de estipelas muy angostas de hasta 4 mm de largo; los pecíolos de hasta 8 cm de largo y contiene minerales como: P, K, Ca, Na, Mg, Zn y Mn (Stevens, 2001).

Variedades

Se conocen 2 variedades, var. flavus (amarillo) y var. bicolor (amarillo y rojo). Difieren entre sí por su ciclo y resistencia a plagas, enfermedades y sequía. Existen variedades precoces (ciclo de 90-150 días), variedades semitardías (150-220 días) y variedades tardías (>220 días). Las variedades de ciclo corto son altamente susceptibles a plagas (Leal, 2003).

Niveles nutricionales del quinchoncho (*Cajanus cajan*).

El quinchoncho es una fuente muy importante de fibra y de cantidades apreciables de hierro, potasio, fósforo, bajo contenido de grasas y de una cantidad importante de fibra.

El valor nutricional que se encuentra en 100g de producto comestible, es : un 77,1% de agua; 9g de proteínas; 0,70g de grasas; 11,7g de carbohidratos; 0,30g de fibra cruda; 1,20g de cenizas; 15mg de calcio; 217mg de fósforo; 1,7mg de hierro; 0,15mg de carotenos; 0,33mg de vitamina B1; 0,18mg de vitamina B2; 12mg de vitamina C (Leal, 2003).

Otros usos:**Potencial como planta forrajera**

El potencial como forraje verde es moderado. Produce hasta 3 cortes/año y persiste 3-4 años. Los cortes, igual que el pastoreo, se realizan cuando las primeras vainas comienzan a madurar. El gandul no persiste al someterlo a un pastoreo intenso. Es un excelente forraje remanente. Para asegurar la persistencia puede dejarse crecer hasta unos 125 cm de altura y cortarse hasta 60-80 cm de la superficie del suelo. En estas condiciones se pueden obtener tres cortes al año con un rendimiento promedio de 45-60 qq/mz de m.s., o sea, 235-310 qq/mz de materia verde por corte. Nunca se debe cortar a ras del suelo porque las plantas no se recuperan. Cortes a una altura menos de 0.8 m reducen la sobrevivencia de la planta. (Leal, 2003).

Es una planta medicinal con propiedades antirreumáticas, diuréticas, hemostáticas y astringentes. Las flores y brotes jóvenes se emplean para afecciones bronquiales y pulmonares. La cocción de las hojas se aplica para lavar llagas, heridas e irritaciones de la piel. Con las semillas secas se hacen cataplasmas dado su efecto desinfectante y cicatrizante. Además, se utiliza para leña, producción de miel, siropes y medicamentos. La harina de las hojas se puede incorporar como pigmento en proporciones del 5 al 10 % en raciones de gallinas ponedoras. Se planta como seto alrededor de los sembrados de yuca y en torno a las casas para protección de comejenes y topos, ya que sus raíces son venenosas. En Madagascar los gusanos de seda se alimentan de sus hojas (Leal, 2003).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y acuoso de las hojas secas del quinchoncho (*Cajanus cajan*). Las muestras frescas de las hojas fueron deshidratadas en una estufa convencional a 65°C y 105°C y los extractos fueron obtenidos por el método de Goldfish, Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, por separado, con los extractos obtenidos y , se colocaron en cajas de Petri, en donde previamente se realizó una siembra masiva con el microorganismo en estudio (*Escherichia coli*) en agar BHI y los respectivos controles, llevando a incubación a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo se procedió a medir los halos de inhibición formados.

OBTENCIÓN DE LAS HOJAS

Las hojas frescas del quinchoncho (*Cajanus cajan*), fueron recolectadas de plantas cultivadas en San Vicente Municipio Maturín hacienda “La Vicentina”, la recolección fue de forma manual en una cantidad de aproximadamente 2Kg.

Selección de las hojas

Se seleccionaron aquellas hojas que no presentaran daños físicos ocasionados por picaduras de insectos, pájaros, sin decoloración y que no manifestara indicios de alguna enfermedad.

Limpieza

Se realizó un lavado manual a las hojas con abundante agua destilada a objeto de eliminar tegumentos y todas impurezas adheridas que pudieran interferir de alguna forma en el resultado.

Secado

Las Hojas seleccionadas se sometieron a un proceso de secado, se colocaron en bolsas de papel con perforaciones para mejor penetración de las corrientes de aire y eliminar humedad, para ello, se utilizó una estufa convencional marca Thomas Scientific, a 65°C por 72 horas y una estufa convencional marca Felisa Horno, a 105°C por 4 horas.

Pulverización

Las muestras se llevaron a molienda utilizando un molino de martillo Thomas Wiley modelo 4 y una malla de 1 mm de diámetro.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La obtención de los extractos de etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y Acuoso de la hoja seca de quinchoncho (*Cajanus cajan*) y se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal y Forraje, Laboratorio de usos Múltiples de Tecnología de Alimentos y el análisis antimicrobiano en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Campus Los Guaritos.

Extracción con los diferentes extractos de etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y agua.

Se tomaron 2,5 gramos de las muestras deshidratadas a 65°C y 105°C de hojas de quinchoncho obtenidas en polvo y colocadas en un papel de filtro, doblando el papel de tal forma que la muestra no se pierda, se colocó el papel en un dedal de extracción, luego se añadieron 30 mL de etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y agua por separados en diferentes beakers 2 para cada para solvente, el cual de manera continua, estuvo en reflujo en el extractor de Goldfish por 6 horas a diferentes temperaturas aproximadamente de 80°C para el etanol, 70°C para el hexano, 65°C para el metanol y cloroformo, 50°C para el éter de petróleo y 100°C para el agua. Pasada la extracción, se dejó drenar el dedal completamente y se removió la muestra colocando en su lugar los tubos recolectores del solvente. El extracto se almacenó a 5°C hasta el momento de la evaluación de sus propiedades antimicrobianas. (ver figura1)

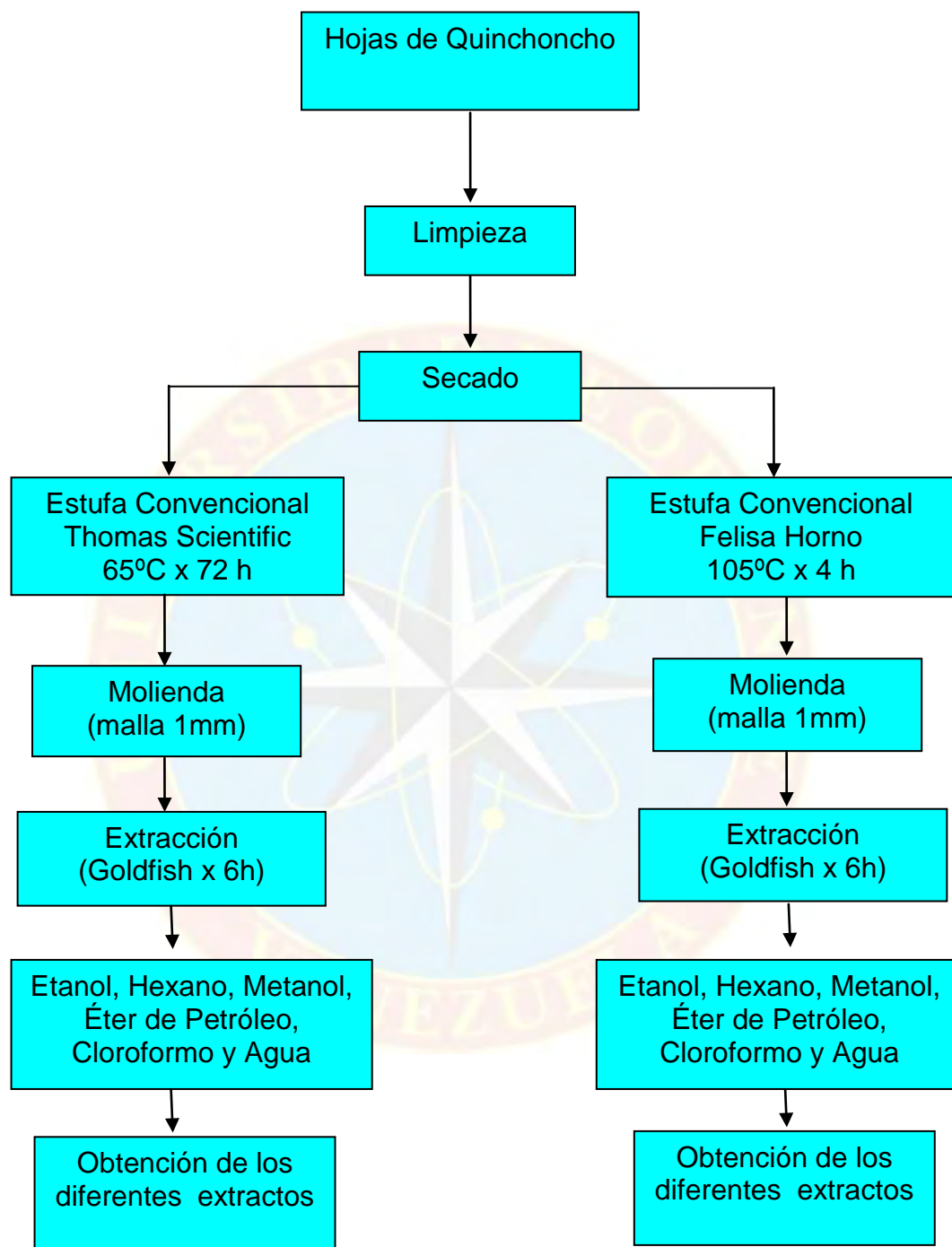


Figura 1. Proceso de elaboración de extractos de hojas de quinchoncho empleando Etanol, Hexano, Metanol, Éter de Petróleo, Cloroformo y Agua como solventes.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO

Para determinar el efecto inhibitorio de los extractos obtenidos de las hojas secas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*, se llevó a cabo una siembra masiva del microorganismo a estudiar, utilizando placas de Petri con agar Nutritivo (BHI) previamente estéril y sólido, sobre el cual se sembró cultivo de *Escherichia coli*, con la ayuda de un hisopo estéril, tanto el microorganismo como el agar fueron obtenidos del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Oriente Núcleo Monagas. Seguidamente, se impregnaron 4 discos de papel de filtro Whatman nº 40 de 6 mm de diámetro por cada repetición con los extractos obtenidos y un disco impregnado con etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y agua (control) y se colocaron sobre los medios de cultivos. Las placas se rotularon y se llevaron a incubar a 37°C por 24 h, se realizaron 4 repeticiones de todos los extractos. Transcurrido el tiempo se procedió a evaluar las placas de Petri a fin de determinar si hubo o no efecto antimicrobiano; este efecto inhibitorio se observó por la formación de halos de inhibición alrededor de los discos de papel de filtro, en los casos donde hubo formación de halos éstos se midieron con ayuda de un vernier, los resultados de la zona de inhibición fueron expresados en milímetros (mm). Se comparó el tamaño de los halos de inhibición de los extractos para el microorganismo a fin de identificar cual extracto causó el mayor efecto inhibitorio (Rangel *et al.*, 2001). (Ver figura 2).

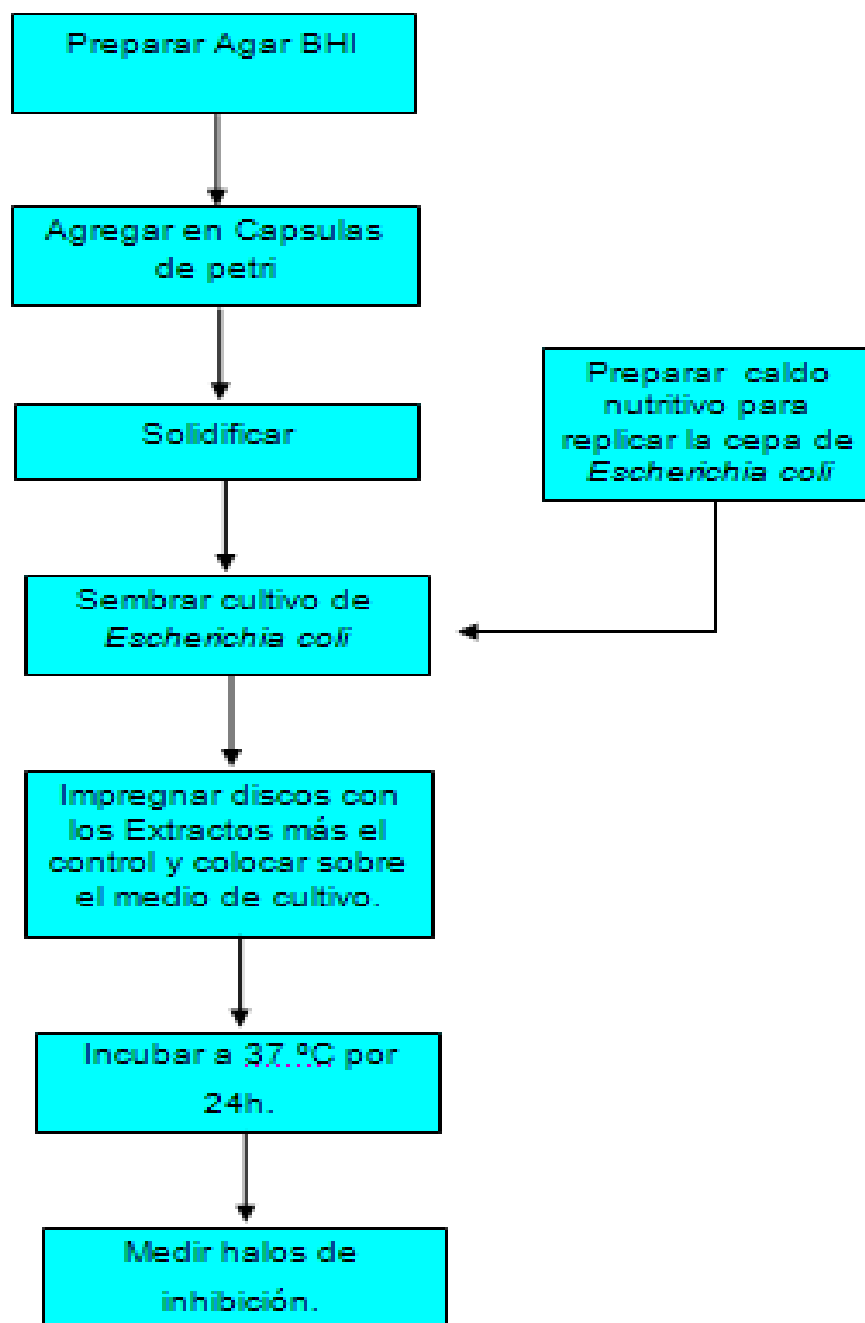


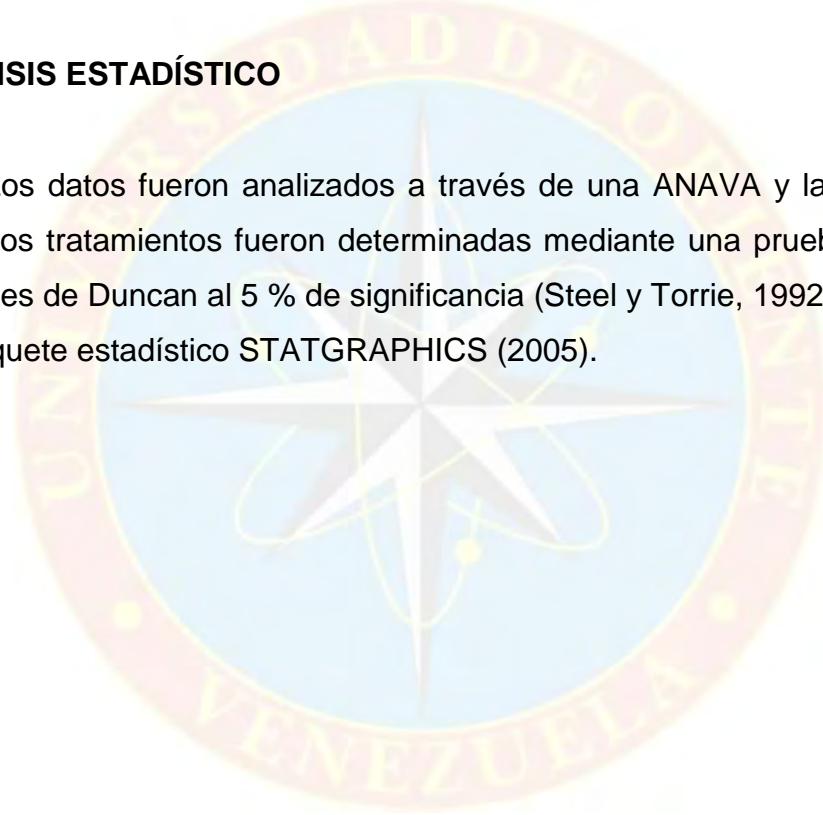
Figura 2. Proceso de siembra para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los resultados obtenidos se evaluaron mediante un diseño completamente al azar, con un arreglo de tratamientos factorial 2x2, dos solventes y dos temperaturas con 4 replicas para medir el efecto inhibitorio de *E. coli* con los extractos obtenidos de las hojas de quinchoncho (Extracto de Metanol a 65°C y 105°C) Y (Extracto de Cloroformo a 65°C y 105°C).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados a través de una ANAVA y las diferencias entre los tratamientos fueron determinadas mediante una prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % de significancia (Steel y Torrie, 1992), empleando un paquete estadístico STATGRAPHICS (2005).



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos de Etanol, Hexano, Metanol, Cloroformo, Éter de Petróleo y Agua de hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

EFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE METANOL Y CLOROFORMO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

En el cuadro 1, se observan los resultados obtenidos en la determinación del efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas deshidratadas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, los cuales refieren actividad inhibitoria solo en los casos de los extractos metanólicos y cloroformícos.,

Cuadro 1. Efecto antimicrobiano de los extractos de Metanol y Cloroformo de las hojas secas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli* a 65°C y 105°C.

Solvente	Obs.	Media \pm D. E.	Grupos homogéneos
Metanol	24	4,91667 \pm 1,5580	A
Cloroformo	24	8,08333 \pm 2,7333	B

* Letras iguales no hay diferencias significativas; letras diferentes si hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Desde el punto de vista estadístico estos resultados mostraron que hubo diferencias significativas entre los solventes metanol y cloroformo, mientras que no hubo diferencias significativas en cuanto a las temperaturas de 65°C y 105°C sin embargo, se puede notar que el mayor halo de

inhibición obtenido empleando el extracto con metanol sobre esta bacteria fue de 8 mm para ambas temperaturas; mientras que el del extracto con cloroformo fue de 14 mm para las dos temperaturas, este último fue mayor por lo que se puede deducir que el tratamiento del extracto de cloroformo tuvo mayor efecto inhibitorio.

En la presente investigación se encontró, que solo el metanol y el cloroformo fueron capaces de arrastrar los compuestos activos presentes en las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) para así producir el efecto antimicrobiano. Guzmán (2009), comenta que para evaluar la acción de agentes antimicrobianos deben controlarse algunos factores que pueden intervenir en la respuesta del microorganismo, como el pH, Actividad de agua (aw), nutrientes y el solvente, este último influye sobre la actividad antimicrobiana que pueda presentar un determinado extracto y la afinidad que tenga el solvente con los principios activos de la planta.

Iturriaga (2008) citado por Leon A. (2010), comenta que la composición química de los aceites, así como las cantidades sus componentes serán diferentes dependiendo de la parte de la planta de donde se extrae (hojas, raíces, semillas, tallos, flores, frutos), especies, temporada de cosecha, clima, composición de la tierra, fase de desarrollo o ciclo vegetativo.

En las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) se encuentran presentes compuestos o principios activos como taninos, fitosteroles, triterpenos, entre otros que muestran excelentes efectos antimicrobianos sobre bacterias. (Stevens, 2001).

El metanol es un compuesto de carácter polar con un punto de ebullición de 64,7°C y de muy bajo peso molecular, lo cual pudo tener

afinidad con los compuestos volátiles presentes en el extracto, produciendo así su permeabilidad a través de la ruptura de la membrana celular de la bacteria estudiada y causar el efecto antimicrobiano.

Los resultados obtenidos por Brito y Cedeño (2007), se relacionan con los reportados en este estudio, ya que, al emplear como solvente el metanol para demostrar el efecto inhibitorio de extractos del culantro (*Eryngium foetidum*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Ellos encontraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, señalando que la mayoría de los componentes activos presentes en el culantro son solubles en metanol.

En cuanto al extracto con cloroformo o triclorometano, se determinó que hubo inhibición de la bacteria estudiada a pesar de su baja polaridad y forma tetraédrica con un punto de ebullición de 61,05 °C que esta por debajo de los otros en comparación con otros solventes utilizados para esta investigación, infiriendo así que pudo lograr arrastrar los componentes activos de las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) como los taninos, triterpenos y fitosteroles para causar el efecto antimicrobiano.

La condición del extracto con cloroformo, pudo haber causado que este cruzara más fácilmente la pared celular accediendo al interior bacteriano por algún mecanismo de transporte específico, contrarrestando su resistencia la cual lesiona la membrana celular encargada de regular el paso de moléculas, ejerciendo el extracto su acción sobre proteínas y lípidos, componentes principales de ésta, encontrándose en altos porcentajes. (Basualdo y Coto, 1996).

Cada una de las numerosas enzimas que hay en una célula es un blanco potencial para la acción de un inhibidor, muchos agentes afectan enzimas que son claves en sistemas tan importantes como el glucolítico y el sistema de citocromos. La pared bacteriana, al sufrir modificaciones, puede transformar la bacteria en un protoplasto o en un esferoplasto que son formas esféricas sin capacidad de reproducción y se obtienen al tratar la bacteria con compuestos enzimáticos como la lisozima o antibióticos como la penicilina que desorganiza el peptidoglucano o mureína. (Montoya H. 2008).

EFFECTO ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE ETANOL, HEXANO, ÉTER DE PETRÓLEO Y AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

En el cuadro 2, se expresan los resultados obtenidos en la determinación del efecto antimicrobiano de los extractos de Etanol, hexano, Éter de Petróleo y Agua sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Se pudo observar que los extractos evaluados a temperaturas de 65°C y 105°C no causaron efecto sobre el crecimiento de *E. coli*.

Cuadro 2. Efecto antimicrobiano de los extractos de etanol, hexano, éter de petróleo y agua de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*. a 65°C y 105°C.

Solvente	Obs.	Media \pm D. E.	Grupos homogéneos
Etanol	24	0	C
Hexano	24	0	C
Éter de Petróleo	24	0	C
Agua	24	0	C

* Letras iguales no hay diferencias significativas; letras diferentes si hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se puede apreciar que los extractos de hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) obtenidos con hexano, éter de petróleo, agua y etanol no generaron efecto inhibitorio en *Escherichia coli*, no obstante los pocos compuestos que se pueden llegar a extraer sumado con el hecho de que la membrana externa de esta bacteria actúa como una barrera, se puede decir, que los componentes activos de las hojas deshidratadas no presentaron afinidad con los solventes y la cantidad liberada no es suficiente para inhibir crecimiento bacteriano o no existe difusión de los compuestos en el agar empleado en el cultivo del microorganismo, lo que generó la ausencia del efecto inhibitorio.

Alcalá y Lisboa (2007), destacan que el hecho de que el extracto hexanoico no produjera efecto inhibitorio, pudo ser ocasionado por el carácter apolar del hexano, debido a que posee las moléculas mas grandes, formada por seis átomos de carbono, lo que cierta forma logra imposibilitar que tenga afinidad por los principios activos de la muestra y producir la ruptura de la membrana celular de la bacteria.

En estudios realizados sobre el efecto inhibitorio, utilizando extractos hexanoícos Rada, 2008, Castillo, 2008 y Bastardo, 2009, observaron que no hubo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, similarmente los resultados en esta investigación reportan que el extracto con hexano hace muy difícil la extracción de los compuestos volátiles en las muestras utilizadas.

Colivet (2004), destaca que el agua solo es capaz de extraer sustancias con las cuales pueda hacer puentes de hidrogeno, por lo tanto se puede inferir que al utilizar el agua como solvente para extraer los compuestos activos de las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) no produjo efecto

inhibitorio, posiblemente la polaridad del agua y las altas temperaturas utilizadas arrastraron compuestos de las hojas deshidratadas que repercutieron en el desarrollo y crecimiento de *Escherichia coli* por lo cual el extracto no pudo penetrar la membrana celular del microorganismo.

En cuanto al éter de petróleo también llamado bencina, es una mezcla líquida de diversos compuestos volátiles, de carácter apolar, lo cual se puede inferir de que no es afín con los principios activos presentes en las hojas deshidratadas, ya que su punto de ebullición es muy bajo aproximadamente de 30°C a 40°C y no se pueden extraer los compuestos para lograr un efecto antimicrobiano sobre *E. coli*.

Los resultados obtenidos por Contreras (2009), se pueden comparar con el presente estudio, ya que, reporta en su trabajo que el extracto etanólico de onoto, no generó halos de inhibición cuando fue empleado sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, posiblemente los compuestos activos presentes en el onoto se encontraban en una proporción pequeña o no eran similares con el etanol.

En el trabajo realizado por Bastardo y Buriel (2009), observaron que el extracto etanólico de sábila (*Aloe vera*) no inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, y los resultados obtenidos en el método utilizado no solo pueden deberse a la actividad antimicrobiana del *Aloe vera* sino también a otras variantes, entre esta, destaca el coeficiente de difusión de los componentes del *Aloe vera* en el medio, es decir, que los datos pueden variar debido a que puede existir una mejor difusión en el medio del cultivo de un elemento o en el de otro de la misma naturaleza.

Sin embargo, en otros estudios con extractos etanólicos como los reportados por Rada (2008), donde se determinó el efecto inhibitorio de extractos de pazote (*Chenopodium ambrosioides*) fresco y deshidratado sobre *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* y Rodríguez (2009), con extractos de perejil (*Petroselinum crispum*) fresco y deshidratado sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, generaron halos de inhibición cuando fueron aplicados sobre el crecimiento de *E. coli*, señalando que los componentes activos de dichos extractos son afines con el solvente utilizado.

Se puede decir también que el solvente etanol con un punto de ebullición de 78,4°C y masa molar de 46,07 g/mol utilizado en el presente estudio, en comparación con el solvente metanol con punto de ebullición de 64,7°C y masa molar de 32,04 g/mol, influye notablemente con los compuestos activos ya que su punto de ebullición y masa molar es mayor al del metanol por lo tanto no pudo arrastrar los componentes activos de las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*), en cambio el metanol es una molécula de menor tamaño y pudo arrastrar dichos compuestos.

El microorganismo *Escherichia coli* es un tipo de bacteria Gram negativa, lo que significa que cuenta con una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos, que ofrece resistencia al paso de la mayoría de los compuestos bioactivos con poder antimicrobiano presentes en ciertos extractos, se puede decir que para el extracto resulta difícil causar lisis de la membrana externa que posee la bacteria (Madigan, 2000).

Además, esta membrana rodea a la compleja pared celular que posee este tipo de bacterias. Esta pared celular contiene en su interior 20% de peptidoglucano, el cual se encuentra confinado dentro de una zona conocida como espacio periplasmático, que también disminuye el paso de esos

compuestos químicos hacia el interior de la célula bacteriana. (Madigan, 2000).

COMPARACION DE LAS TEMPERATURAS DE SECADO DE LAS HOJAS DE QUINCHONCHO

En el cuadro 3, se expresan los resultados de las temperaturas de secado de las hojas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*), dando como resultado que no hubo diferencia significativa entre las dos temperaturas.

Cuadro 3. Efecto de las temperaturas de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Temperatura	Obs.	Media de los halos	Grupos homogéneos
65°C	24	6,33333	a
105°C	24	6,66667	a

* Letras iguales no hay diferencias significativas; letras diferentes si hay diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estadísticamente se puede apreciar que los resultados del efecto de las temperaturas en cuanto al secado de las hojas de quinchoncho (*Cajanus cajan*), muestran diferencias significativas, por lo tanto se puede decir que resulta difícil concretar de forma simple la influencia de la temperatura sobre la extracción, este factor influye de forma compleja sobre todos los efectos relacionados con la extracción a grandes rasgos; el calor facilita la extracción al permeabilizar las paredes celulares que se desnaturalizan.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los extractos de Metanol y Cloroformo obtenidos de las hojas secas de quinchoncho (*Cajanus cajan*), fueron los únicos que causaron halos de inhibición.
- Los extractos de Etanol, hexano, Éter de Petróleo y Agua, no causaron ningún efecto antimicrobiano.
- No hubo diferencia significativa entre las dos temperaturas de secado a 65°C y 105°C .
- Estadísticamente hubo diferencia significativa entre los solventes metanol y Cloroformo.
- El halo de mayor inhibición para el extracto con metanol fue de 8 mm a una temperatura de secado de 105°C.
- El halo de mayor inhibición para el extracto con cloroformo fue de 14 mm a una temperatura de secado de 65°C.

RECOMENDACIONES

- Ampliar la cantidad de solventes con carácter polar tales como butanol, propanol, alcohol etílico, o algunas mezclas, entre otros, para realizar extracciones y determinar si poseen efecto antimicrobiano.
- Utilizar otros microorganismos tanto Gram –, como Gram + para comparar la efectividad de las extracciones.

- Sustituir los antimicrobianos sintéticos en alimentos por antimicrobianos naturales como las hojas secas de quinchoncho (*Cajanus cajan*).
- Determinar el efecto antimicrobiano de las hojas frescas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) para comparar su actividad antimicrobiana con los resultados obtenidos en el presente estudio.
- Ampliar el número de especies naturales para determinar su efecto antimicrobiano.
- Realizar un análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) que permita conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes que conforman las hojas secas deshidratadas estudiadas.
- Utilizar otros métodos de extracción para las hojas secas de quinchoncho (*Cajanus cajan*).
- Aplicar los extractos obtenidos en alimentos para medir la actividad antimicrobiana en ellos.
- Determinar el efecto de extractos obtenidos a partir de temperaturas diferentes a las estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCALÁ, R y LISBOA, C. 2007. Análisis Preliminar del Efecto Inhibidor de Extractos de la Nuez de Merey (*Anacardium occidentale L*) Sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Trabajo de grado. Escuela de zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 23 p.
- APONTE, A. y M. SALAS. 1985. Aspectos generales del Cultivo. Agroeconomía e Industrialización del Quinchoncho. Fonaiap. Yaritagua, Yaracuy, Venezuela. 6 p.
- BASTARDO, L. y BURIEL A. 2009. Análisis preliminar del efecto antimicrobiano del extracto etanólico y hexanoico de sábila (aloe vera) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Escuela de zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 33 p
- BASUALDO, J y COTO, C. 1996. Microbiología Biomédica. OCEANO, España. 317 p.
- BELL, C. y KIRIAKIDES, A. 2000. *E. coli*, una aproximación practica al microorganismo y su control en los alimentos. Acribia. Zaragoza, España. pp 2-15, 52-61.
- BERNARD, D; DULBECO, R; EISEN, H y GINSBERG, H. 1996. Tratado de Microbiología. Masson. Barcelona. España. 943 p.
- BRITO, H. y CEDEÑO J. 2007. Determinación del efecto inhibidor de extractos de culantro (*eryngium foetidum*) sobre el crecimiento de *escherichia coli* y *bacillus sp.* Trabajo de grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas.33 p.
- CASTILLO, B. 2008. Efecto inhibitorio de extracto de pseudofruto de merey (*anacardium occidentale l*) fresco y deshidratado sobre el crecimiento de *Eschericha coli* y *Bacillus sp.* Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. pp16-17

- COLIVET, J. 2004. Comparación del Efecto Inhibidor de Extractos de Ají Dulce (*Capsicum chinense*) Sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Trabajo de grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 54 p.
- CONTRERAS, R. 2009. Efecto Antimicrobiano de extracto de Onoto (*Bixa orellana l.*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Trabajo de grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 37 p.
- COVA, E. Y RODRIGUEZ, M. 2008. Análisis preliminar del efecto inhibitorio de extractos de orégano (*origanum vulgare*) sobre el crecimiento de *bacillus sp.* Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 20 p.
- GUZMAN, A. 2009. Efecto inhibitorio de extractos de lechosa (*carica papaya*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *staphylococcus aureus.* Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 36 p
- DOYLE, M; BEUCHAT, L. Y MONTVILLE, T. 2001. Microbiología de los Alimentos Fundamentos y Fronteras. Acribia. Zaragoza. España. 543 p.
- HAYES, P. 1993. Microbiología e Higiene de los Alimentos. Acribia. Zaragoza. España. 369 p.
- LEAL, L. 2003. Beneficios Nutricionales del Quinchoncho para Venezuela. [Documento en línea]. Disponible en: <http://html.beneficios-nutricionales-del-quinchoncho-para-venezuela.html>. Consultado: 15/05/09.
- LEÓN, A. 2010. Efecto Inhibitorio de Extractos de Granos de Café Verde Seco (*Coffea Arábica L.*) Sobre el Crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus.* Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 45 p
- MADIGAN, M. 2000. Biología de los microorganismos. Pretice Hall. Madrid, España. 1064 p.

- MAFART, P. y BELIARD E. 1994. Ingeniería Industrial Alimentaria. Volumen II. Técnicas de Separación. Acribia. Zaragoza – España. pp 29 – 30, 35 – 37, 52 – 54.
- MOLINOS, A. 2003. Fitoquímicos: nutrientes del futuro. [Documento en línea]. Disponible en: www.molinos.com.ar/nutrición. Consultado: 12/05/09.
- MONTOYA, H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Editorial Universidad Antioquia. 2da Edición. Colombia 222p.
- MOSSEL, D y MORENO, B. 1994. Microbiología de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, España. 375 p.
- RANGEL, D; GARCIA, I; VELASCO, J; BUITRAGO, D y VELAZCO, E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónicos y acuosos de *Baccharis nitida*. Revista de la Facultad de Farmacia. Universidad los Andes. Mérida. Venezuela. Vol 42. 43 – 46 pp.
- RADA, K. 2008. Determinación del efecto inhibitorio de extractos de pazote (*Chenopodium ambrosioides*) Fresco y Deshidratado Sobre *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 53 p
- RAYBAUDI-MASSILIA R., SOLIVA R. y MARTÍN O. 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida. Lleida – España. pp 16 – 19.
- RODRIGUEZ, Y. 2009. Efecto Inhibitorio con extractos de perejil (*Petroselinum crispum*) fresco y deshidratado sobre el crecimiento de *escherichia coli* y *staphylococcus aureus*, Trabajo de Grado. Escuela de Zootecnia. UDO-Núcleo Monagas. 50 p
- STATGRAPHICS. 2005. Statgraphics Centurion XV. Statpoint. Inc. USA.

- STEVENS, E. 2001. Malezas de Mexico. [Documento en línea]. Disponible en: www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/cajanuscajan/fichas/ficha.htm. Consultado: 15/05/09.
- TORTORA, G. 1993. Introducción a la Microbiología. Acribia. Zaragoza. España. 792 p.





APENDICE

Cuadro 1. Medias de los halos de inhibición de los extractos a 65°C y 105°C de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Solvente	Media de halos de inhibición (mm) a 65°C	Media de halos de inhibición (mm) a 105°C
Etanol	0	0
Metanol	5,33±0,457786	4,50±0,457786
Hexano	0	0
Cloroformo	7,33±0,457786	8,83±0,457786
Éter de petróleo	0	0
Agua	0	0

Cuadro 2. Análisis de Varianza de los extractos de Metanol y Cloroformo para los halos obtenidos de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:secado	1,33333	1	1,33333	0,27	0,6092
B:solvente	120,333	1	120,333	23,92	0,0000
RESIDUOS	226,333	45	5,02963		
TOTAL (CORREGIDO)	348,0	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Cuadro 3. Tabla de medias por mínimo cuadrado con intervalo del 95% para los halos obtenidos de las hojas deshidratadas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Estandard</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	48	6,5			
secado					
65°C	24	6,33333	0,457786	5,4113	7,25536
105°C	24	6,66667	0,457786	5,74464	7,5887
solvente					
Metanol	24	4,91667	0,457786	3,99464	5,8387
Cloroformo	24	8,08333	0,457786	7,1613	9,00536

Cuadro 4. Estadística descriptiva de los extractos de Metanol y Cloroformo para los halos obtenidos de las hojas deshidratadas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Muestra	48
Promedio	6,5
Desviación Estándar	2,72108
Coefficiente de Variación	41,8627%
Mínimo	2
Máximo	14
Rango	12

Cuadro 5. Halos de inhibición de los extractos de Metanol de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Solvente	halos de inhibición (mm)
<p style="text-align: center;">Metanol 65°C</p>	<p style="text-align: center;">6 6 6 4 6 6 6 4 4 6 6 4</p>
<p style="text-align: center;">Metanol 105°C</p>	<p style="text-align: center;">4 4 6 2 2 4 2 6 6 4 6 8</p>

Cuadro 6. Halos de inhibición de los extractos de Cloroformo de las hojas secas de Quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre *Escherichia coli*.

Solvente	halos de inhibición (mm)
<p style="text-align: center;">Cloroformo 65°C</p>	<p style="text-align: center;">4 8 6 2 8 10 4 8 14 8 8 8</p>
<p style="text-align: center;">Cloroformo 105°C</p>	<p style="text-align: center;">10 10 12 6 6 10 8 6 10 8 8 12</p>



Figura1. Planta de quinchoncho



Figura 2. Hojas de quinchoncho



Figura 3. Estufa Convencional Thomas Scientific a 65°C



Figura 4. Estufa Convencional Felisa Horro a 105°C



Figura 5. Hojas deshidratadas de quinchocho



Figura 6. Equipo de martillos Thomas Wiley modelo 4



Figura 7. Proceso de molienda de las hojas secas de quinchoncho



Figura 8. Muestras secas a 65°C y 105°C de hojas de quinchoncho



Figura 9. Pesada de las muestras secas de las hojas de quinchoncho



Figura 10. Balanza Denver Intrument company TR-104



Figura 11. Equipo de Goldfish



Figura 12. Extracción de los extractos con el equipo de Goldfish.



Figura 13. Extractos de metanol, cloroformo y éter de petróleo.



Figura 14. Extractos de etanol y hexano.



Figura 15. Materiales utilizados para determinar el efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos.



Figura 16. Siembra de *E. coli* en placas de petri.



Figura 17. Placas de Petri con discos de papel impregnados con los diferentes extractos.

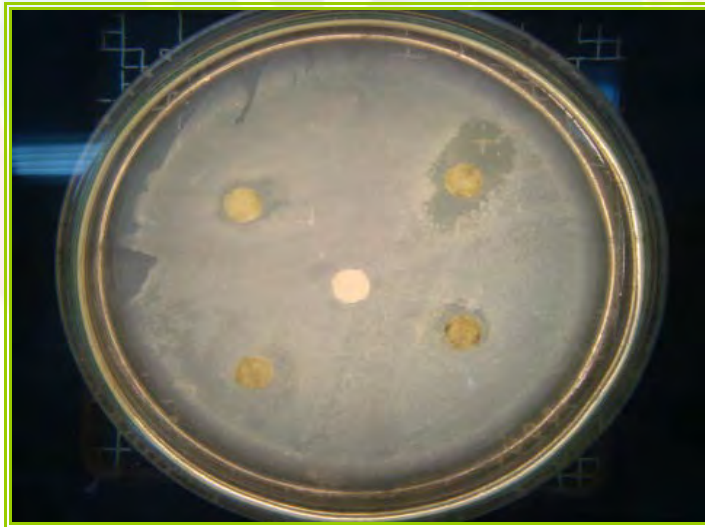


Figura 18. Halos de inhibición en discos de papel impregnados con metanol.

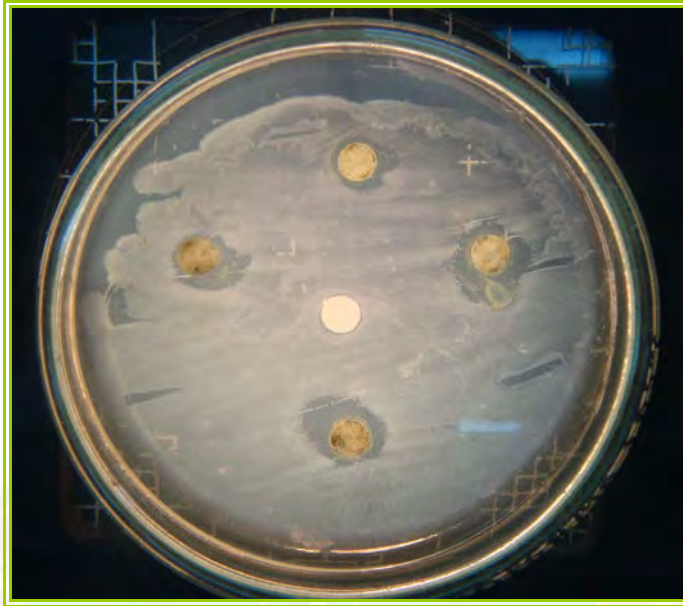


Figura 19. Halos de inhibicion en discos de papel impregnados con cloroformo.

HOJAS METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 1/6

Título	EFFECTO ANTIMICROBIANO DE HOJAS DESHIDRATADAS DE QUINCHONCHO (<i>CaJanus cajan</i>) SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i>.
Subtítulo	

El Título es requerido. El subtítulo o título alternativo es opcional.

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Vásquez Castro Rodolfo José	CVLAC	14.424.793
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Se requiere por lo menos los apellidos y nombres de un autor. El formato para escribir los apellidos y nombres es: "Apellido1 InicialApellido2., Nombre1 InicialNombre2". Si el autor esta registrado en el sistema CVLAC, se anota el código respectivo (para ciudadanos venezolanos dicho código coincide con el numero de la Cedula de Identidad). El campo e-mail es completamente opcional y depende de la voluntad de los autores.

Palabras o frases claves:

Efecto Antimicrobiano
Extracto
Quinchoncho

El representante de la subcomisión de tesis solicitará a los miembros del jurado la lista de las palabras claves. Deben indicarse por lo menos cuatro (4) palabras clave.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Sub-área
Tecnología y Ciencias Aplicadas	Licenciatura en Tecnología de Alimentos

Debe indicarse por lo menos una línea o área de investigación y por cada área por lo menos un subárea. El representante de la subcomisión solicitará esta información a los miembros del jurado.

Resumen (Abstract):

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de hojas deshidratadas de quinchoncho (*Cajanus cajan*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Para ello, se seleccionó 1Kg de hojas frescas para 2 diferentes temperaturas, las cuales se llevaron a secar en una estufa convencional marca Thomas Scientific, a 65°C por 72 horas y en una estufa convencional marca Felisa Horno, a 105°C por 4 horas; luego se llevó a molienda utilizando un equipo de martillos Thomas Wiley modelo 4 y una malla de 1 mm de diámetro. Los extractos de las muestras fueron obtenidos por el método de extracción de Goldfish, empleando como solventes etanol, hexano, metanol, cloroformo, éter de petróleo y agua. Para el estudio del efecto antimicrobiano se empleó el método de difusión en agar con discos de papel de filtro y se llevó a cabo una siembra masiva del microorganismo a estudiar en placas de Petri con agar nutritivo (BHI), se utilizaron discos estériles de papel de filtro de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con los extractos por separado, así como un disco control para cada uno, estos se colocaron sobre los medios de cultivo y se incubaron a 37 °C por 24 h, los resultados obtenidos mostraron efecto antimicrobiano solo con los extractos de metanol y cloroformo, por lo cual se midieron los halos de inhibición para estos dos extractos. Los resultados fueron interpretados mediante un paquete estadístico. Estos resultados mostraron que entre los extractos de cloroformo y metanol presentaron diferencias significativas, siendo el halo de mayor inhibición para *Escherichia coli* de 14 mm para el extracto con cloroformo a una temperatura de secado de 65°C. Se aplicó una prueba de medias de Mínima Diferencia Significativa (MDS) de Duncan al 5%. Estadísticamente no hubo diferencia significativa para las 2 temperaturas. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal y Forrajes, Laboratorio de Microbiología de Alimento y Laboratorio de Tecnología de Alimento de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Oriente Núcleo Monagas Campus los Guaritos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Doc(a). Belloso, Genette	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4.354.713
	e-mail	gebelloso@yahoo.com
	e-mail	
Msc. Colivet, Julio	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	15.322.624
	e-mail	julicolivet@gmail.com
	e-mail	
Mcs. Cabello, María	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	4.717.369
	e-mail	Mc13@latimail.com
	e-mail	

Se requiere por lo menos los apellidos y nombres del tutor y los otros dos (2) jurados. El formato para escribir los apellidos y nombres es: "Apellido1 InicialApellido2., Nombre1 InicialNombre2". Si el autor esta registrado en el sistema CVLAC, se anota el código respectivo (para ciudadanos venezolanos dicho código coincide con el numero de la Cedula de Identidad). El campo e-mail es completamente opcional y depende de la voluntad de los autores. La codificación del Rol es: CA = Coautor, AS = Asesor, TU = Tutor, JU = Jurado.

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	11	25

Fecha en formato ISO (AAAA-MM-DD). Ej: 2005-03-18. El dato fecha es requerido.

Lenguaje: spa Requerido. Lenguaje del texto discutido y aprobado, codificado usando ISO 639-2. El código para español o castellano es spa. El código para ingles en. Si el lenguaje se especifica, se asume que es el inglés (en).

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo
RODOLFO VASQUEZ.DOCX

Caracteres permitidos en los nombres de los archivos: **A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 _ - .**

Alcance:

Espacial: _____ (opcional)
Temporal: _____ (opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Tecnología de Alimentos

Dato requerido. Ejemplo: Licenciado en Matemáticas, Magister Scientiarium en Biología Pesquera, Profesor Asociado, Administrativo III, etc

Nivel Asociado con el trabajo: Licenciado

Dato requerido. Ejs: Licenciatura, Magister, Doctorado, Post-doctorado, etc.

Área de Estudio:

Zootecnia

Usualmente es el nombre del programa o departamento.

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo Monagas

Si como producto de convenciones, otras instituciones además de la Universidad de Oriente, avalan el título o grado obtenido, el nombre de estas instituciones debe incluirse aquí.

Hoja de metadatos para tesis y trabajos de Ascenso- 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho


Estimado Profesor Martínez:


Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.


Leído el oficio SIBI - 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,


JUAN A. BOLAÑOS CUNELE
Secretario



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR 
FECHA 5/8/09 HORA 5:20

C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/marija

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso - 6/6
Derechos:

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicado CU-034-2009): "Los Trabajos de Grado son de exclusiva propiedad de la Universidad y solo podrán ser utilizados a otros fines, con el consentimiento del Consejo de Núcleo Respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización."



Rodolfo Vásquez
C.I.: 14.424.793
AUTOR



Doc (a) Genette Beloso
C.I.: 4.354.713
TUTOR