

J  
615.321  
F38

NO SALE A  
DOMICILIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ACUOSO E HIDROALCOHÓLICO  
LIOFILIZADO DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L (guayaba) FRENTE A  
*Escherichia coli* ATCC 25922

LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO - FCB - UNAP  
2008 - 2009"



00054

Presentado por:

Bach. Lenin Fernández Arellano.

Bach. Laizamon Ushiñahua Pérez.

DONADO POR:

Bach. Lenin Fernández Arellano

Iquitos, 05 de 10 de 2010

Asesores:

F. Luis Vílchez Alcalá.

Q.F. Carlos Calloapaza Valladares.

IQUITOS - PERU

2009



**"Año de la Consolidación Económica y Social del Perú"**

**ACTA DE SUSTENTACION**

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los nueve días del mes de Marzo del dos mil diez, siendo las 11:30 a.m. horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según resolución de Coordinación N°115-FFB-UNAP-2008, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. Luis D. Nonato Ramírez                      Presidente
- Ing. Gladys Cárdenas de Reátegui            Miembro
- Q.F. Carlos A. Licetti Contreras              Miembro

Se constituyeron en las instalaciones del Laboratorio N° 4 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada **"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ACUOSO E HIDROALCOHÓLICO LIOFILIZADO DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L (guayaba) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO-FCB-UNAP"** presentado por los Bachilleres **LENIN FERNÁNDEZ ARELLANO Y LAIZAMON USHÍÑAHUA PÉREZ**, para optar el **TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACÉUTICO**, que otorga la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas: en forma satisfactoria.

Los miembros del Jurado Calificador llegó a la conclusión siguiente:

- 1.- La Tesis ha sido Aprobada por unanimidad.
- 2.- Observaciones ninguna.

Siendo las 12:45 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su adecuada exposición.

Ing. Gladys Cárdenas de R.  
Miembro

Q.F. Luis D. Nonato Ramírez  
Presidente

Q.F. Carlos A. Licetti Contreras  
Miembro

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

- TITULO** : ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ACUOSO E HIDROALCOHÓLICO LIOFILIZADOS DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L “guayaba” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922. LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO - FCB – UNAP - 2008 - 2009
- AUTORES** : Bach. Lenin Fernández Arellano  
Bach. Laizamon Ushiñahua Pérez
- ASESORES** : Q.F. Luis Vilchez Alcalá  
Q.F. Carlos Calloapaza Valladares
- COLABORADORES:** Blga. Nila Fernández Sandoval  
Blgo. Carlos Dávila  
Dra. Blga. Blanca Diaz Bardales
- DURACIÓN** : 06 meses

**IQUITOS – PERU**

**2009**

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ACUOSO E  
HIDROALCOHÓLICO LIOFILIZADOS DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium  
guajava* L “guayaba” FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922**

**Bach. Lenin Fernández Arellano, Bach. Laizamon Ushifñahua Pérez.**

## **RESUMEN**

---

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso e hidroalcohólico de la yema foliar (cogollo) de *Psidium guajava* L “guayaba” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Los extractos de la yema foliar (cogollo) de *Psidium guajava* L fueron sometidos a la validación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión de discos en agar y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a través del método de macrodilución en caldo frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Los extractos fueron evaluados a concentraciones de 400, 200, 100 y 50mg/ml utilizando como solvente el dimetil sulfoxido (DMSO) y control positivo discos de Cloranfenicol 30µg. Se demostró que el extracto hidroalcohólico presentó actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco a concentraciones de 400 mg/ml, el cual no se evidencia en el extracto acuoso, además de ello se demostró la actividad del extracto hidroalcohólico por el método de macrodilución en caldo con una concentración mínima inhibitoria de 3.125 mg/ml.

Se concluye que el extracto hidroalcohólico de la yema foliar de *Psidium guajava* L posee actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, el cual abre posibilidades de descubrir nuevos compuestos químicos antimicrobianos clínicamente efectivos.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, extracto acuoso, extracto hidroalcohólico, *Psidium guajava* L, concentración mínima inhibitoria, Tamizaje Fitoquímico.

**"ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT AND FREEZE  
Hydroalcoholic leaf bud burst of Psidium guajava L" guava "against Escherichia  
coli ATCC 25922**

**Bach. Lenin Fernández Arellano, Bach. Laizamon Ushiñahua Pérez.**

## **ABSTRACT**

---

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of leaf bud burst (bud) of *Psidium guajava* L "guava" against *Escherichia coli* ATCC 25922. Extracts of the leaf bud (bud) of *Psidium guajava* L were subject to validation of antimicrobial activity by disc diffusion method in agar and determining the minimum inhibitory concentration (MIC) through the method in broth macrodilución against *Escherichia coli* ATCC 25922. The extracts were evaluated at 400, 200, 100 and 50mg/ml using as solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) and positive control disks Chloramphenicol 30µg. It was demonstrated that the hydroalcoholic extract antimicrobial activity presented by the disk diffusion method at 400 mg / ml, which is not evident in the extract, it also demonstrated the activity of the hydroalcoholic extract by the method in macrodilución broth with a minimum inhibitory concentration of 3.125 mg / ml.

It is concluded that the hydroalcoholic extract of leaf bud burst of *Psidium guajava* L has antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, which opens up possibilities of discovering new compounds clinically effective antimicrobial.

**Keywords:** Antimicrobial activity, aqueous extract, hydroalcoholic extract, *Psidium guajava* L, minimum inhibitory concentration, phytochemical screening.

## **DEDICATORIA**

---

A Dios por darme La vida y por su sabiduría, por hacer de mí un hombre de bien, por estar presente en todo momento cuando más lo necesitaba guiándome siempre por el camino de bien

A mis padres Laizamon y Herlinda que son la razón de mi existir, los que estuvieron conmigo en todo momento apoyándome, brindando sus sabios consejos en todo momento y su ayuda incondicional, a quienes les dedico este trabajo.

A mi hermana Ana Lis y su esposo Gerver, los responsables de brindarme un techo donde vivir y apoyarme en muchas cosas no solo en lo material sino en los consejos.

A todos mis hermanos y mis sobrinos Gilson Favio y Denilson Daniel, los que crecieron conmigo y a quienes les tengo un gran cariño.

**Laizamon**

## **DEDICATORIA**

---

A mis padres Gilberto y Olinda que siempre están conmigo en todo momento y que siempre contare con sus apoyos y por haberme enseñado que el sacrificio y esmero en las cosas que hacemos, son recompensadas siempre. A mis hermanos Josimar, Tania, Patricia y Raúl por apoyarme durante mis estudios y lo siguen haciendo hasta ahora y agradezco a Dios por darme una familia maravillosa que en mis momentos difíciles siempre están ahí para apoyarme.

En especial a unos niños que llenaron aun más de alegría y dicha nuestro hogar a los cuales aprecio con todo mí ser, a mis sobrinos Grecia y Raulito.

A mis amigos que me apoyaron en todo y siempre me alentaron a no rendirme nunca ante las adversidades.

Y pido a Dios la sabiduría, para ser un hombre de bien, cuide y bendiga a mi familia y a mis amigos en todo momento.

**Lenin**

## **AGRADECIMIENTO**

---

A la Facultad de Ciencias Biológicas en especial al Centro de Prestación de Servicio de Análisis Clínico por brindarnos el lugar para poder desarrollar nuestro trabajo.

A la Dra. Blanca María Díaz Bardales, Directora del Centro de Prestación de Servicios de Análisis Clínico, a la Blga. Nila Fernández Sandoval y a todos los trabajadores de dicho centro por brindarnos su ayuda y sus experiencias para realizar las pruebas de investigación de nuestro proyecto.

A los miembros del jurado calificador Q.F. Luis Nonato Ramírez, Q.F. Rodolfo Contreras Licetti, Ing. Gladys Cárdenas Cárdenas; por sus valiosos aportes y sugerencias en toda la etapa de elaboración, ejecución y culminación de la investigación.

A los Q.F. Luis Vilchez Alcalá, Q.F. Carlos Calloapaza Valladares, asesores del presente trabajo de investigación por brindarnos su apoyo incondicional. Por sus valiosos conocimientos profesionales impartidos y por su acertada dirección que permitió la culminación satisfactoria de nuestra tesis.

A todas la personas que de una u otra manera nos apoyaron incondicionalmente para ser posible la realización de este trabajo de investigación.

**Gracias...**

# INDICE DE TEMAS

---

Resumen	III
Dedicatoria	VI
Agradecimiento	VII
Lista de cuadros	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de gráficos	XIV

## CAPITULO I

1.1. Introducción	01
1.2. Problema de Investigación	05
1.3. Objetivos	07

## CAPITULO II

2.1. Marco Teórico.	09
2.1.1. <i>Psidium guajava L.</i>	11
2.1.1.1. Clasificación Taxonómica	11
2.1.1.2. Aspectos botánicos	11
2.1.1.3. Principales constituyentes fitoquímicos	12
2.1.1.4. Uso tradicional	12
2.1.1.5. Antecedentes	13
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.2.1. Generalidades	19
2.1.2.2. Clasificación	20
2.1.2.2.1 <i>Escherichia coli enterohemorrágica</i>	20
2.1.2.2.2 <i>Escherichia coli enteropatogénica</i>	21

2.1.2.2.3	<i>Escherichia coli enterotoxigénica</i>	22
2.1.2.2.4	<i>Escherichia coli enteroinvasiva</i>	23
2.1.2.2.5	<i>Escherichia coli enteroagregante</i>	24
2.1.3.	Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.	25
2.1.3.1.	Generalidades	25
2.1.3.2.	Antecedentes de la prueba.	25
2.1.3.3.	Tipos de pruebas.	26
2.1.3.3.1.	Antibiograma en Dilución.	26
2.1.3.3.2.	Método de difusión en Agar.	27
2.2.	Definiciones Operacionales.	29
2.2.1.	Variable independiente.	30
2.2.2.	Variable dependiente.	30
2.3.	Hipótesis.	33
<b>CAPITULO III</b>		
3.1.	Metodología y diseño de investigación.	35
3.1.1.	Método de investigación.	36
3.1.2.	Diseño de la investigación.	36
3.2.	Población y muestra.	39
3.2.1.	Población vegetal.	40
3.2.2.	Muestra vegetal.	40
3.2.3.	Población bacteriana	40
3.2.4.	Muestra bacteriana	41
3.3.	Instrumentos y materiales.	42
3.3.1.	Instrumentos.	43

3.3.2.	Material vegetal.	43
3.3.3.	Material biológico.	43
3.3.4.	Materiales de plástico.	43
3.3.5.	Materiales de vidrio o metal.	43
3.3.6.	Otros materiales.	44
3.3.7.	Equipos.	44
3.3.6.	Reactivos.	45
3.4.	Procedimiento de recolección de datos.	46
3.4.1.	Procedimiento para la recolección de los extractos vegetales.	47
3.4.1.1.	Recolección e identificación de la muestra vegetal.	47
3.4.1.2.	Preparado de los extractos liofilizados	47
3.4.1.3.	Preparación de los discos de sensibilidad	49
3.4.1.4.	Preparación del inóculo	49
3.4.1.5.	Replicación del inóculo	49
3.4.2.	Ensayos de actividad antimicrobiana.	50
3.4.2.1.	Método de difusión en agar	50
3.4.2.2.	Método de Dilución en caldo	52
3.4.2.3.	Preparación del estándar para el inóculo	53
3.4.3.	Tamizaje fitoquímico.	55
3.5.	Plan de Análisis e interpretación de datos.	57
3.6.	Criterios de Bioseguridad	59

## CAPITULO IV

4.1.	Resultados.	61
4.1.1.	Análisis descriptivo de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de <i>Psidium guajava</i> L. a diferentes concentraciones	63
4.1.2.	Análisis descriptivo de la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de <i>Psidium guajava</i> L. por el método de macrodilución en caldo.	71
4.1.3.	Descripción cualitativa de las características vegetales de <i>Psidium guajava</i> L.	72
4.1.4.	Descripción cualitativa de los datos etnofarmacológicos de <i>Psidium guajava</i> L.	73
4.1.5.	Descripción cualitativa del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de <i>Psidium guajava</i> L.	74
4.1.6.	Prueba de comparación de promedios de diámetros del halo de inhibición de los extractos acuoso e hidroalcohólico de la yema foliar de <i>Psidium guajava</i> .	75
4.2.	Discusión.	80
4.3.	Conclusión.	84
4.4.	Recomendaciones.	86
4.5.	Bibliografía.	88
4.6.	Anexos	98

## LISTA DE CUADROS

---

N°	TÍTULO	Pág.
01	Operacionalización de variables: Variable Independiente	31
02	Operacionalización de variables: Variable Dependiente	32
03	Distribución de los grupos de trabajo por el método de Difusión en Agar	37
04	Distribución de los grupos de trabajo por el método de Dilución en Caldo	38
05	Clasificación de la Actividad Antimicrobiana según porcentaje de Inhibición	51
06	Clasificación de la Actividad Antimicrobiana según Concentración Mínima Inhibitoria	53
07	Clasificación de la Actividad Antimicrobiana del extracto Acuoso de <i>Psidium guajava L.</i> , a partir del porcentaje de inhibición.	70
08	Clasificación de la Actividad Antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L.</i> , a partir del porcentaje de inhibición.	70
09	Concentración Mínima Inhibitoria del extracto Hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L.</i>	71
10	Características vegetales de <i>Psidium guajava L.</i>	72
11	Datos etnofarmacológicos de <i>Psidium guajava L.</i>	73
12	Tamizaje Fitoquímico del extracto Hidroalcohólico de la yema foliar de <i>Psidium guajava L.</i>	74

## LISTA DE TABLAS

---

Nº	TÍTULO	Pág.
01	Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Acuoso de <i>Psidium guajava L.</i> Frente a <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)	63
02	Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L.</i> Frente a <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)	65
03	Porcentaje de Inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L.</i> Frente a <i>Escherichia coli ATCC 25922</i> a diferentes concentraciones (Expresados en %)	68
04	Análisis de Varianza de los promedios de diámetro del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L.</i> ; en <i>Escherichia coli</i> .	75
05	Significancia de las comparaciones de pares de promedios de diámetros del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium guajava L</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	77

## LISTA DE GRAFICOS

---

N°	TÍTULO	Pág.
01	Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Acuoso de <i>Psidium guajava</i> L. Frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)	64
02	Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Hidroalcohólico de <i>Psidium guajava</i> L. Frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)	66
03	Porcentaje de Inhibición del extracto Hidroalcohólico de <i>Psidium guajava</i> L. Frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresados en %)	68
04	Comparación múltiple de los diámetros del halo de inhibición de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium guajava</i> , Cloranfenicol y DMSO en <i>Escherichia coli</i>	79

## ***CAPITULO I***

## **1.1. INTRODUCCIÓN.**

---

Las infecciones gastrointestinales comprenden una amplia variedad de síntomas complejos y agentes infecciosos conocidos. Con excepción de la gastritis por *Helicobacter pylori*, el término gastroenteritis se aplica a los síndromes de diarrea o vómitos que tienden a involucrar una infección no inflamatoria del intestino delgado proximal o una infección inflamatoria del colon. Las infecciones del tracto gastrointestinal, sobre todo la diarrea infecciosa, se encuentra entre las enfermedades infecciosas debilitantes más comunes y que afectan a personas de todas las edades en todo el mundo. <sup>1</sup>

De cada 1000 niños nacidos, 55 mueren durante el primer año, contribuyendo las enfermedades diarreicas con 6.0 por mil nacidos vivos. Cada niño menor de cinco años se enferma entre 4 a 5 veces al año y es la tercera causa de muerte infantil en el Perú y en el mundo. <sup>2</sup>

En la Semana Epidemiológica 03-2008, 20 de las 33 regiones del país tuvieron una incidencia de enfermedades diarreicas mayor que la observada a nivel nacional (75,99x100 000 Habitantes), esto representó el 61,81% de los casos notificados (13.774 episodios de diarrea aguda). Las Regiones con mayor incidencia de episodios de diarrea aguda son: Amazonas, Pasco, Lima Provincias, Apurímac, Arequipa, Moquegua y Madre de Dios (IA >124,39 episodios de diarrea aguda por 100 000 habitantes.) <sup>3</sup>

En el año 2007, la Dirección Regional de Salud Loreto, reporto un total de 8286 casos de diarreas, de los cuales 1799 casos fueron en niños menores de un año; 4343 casos en niños entre 1 a 4 años y 2144 casos en niños mayores de 5 años. <sup>4</sup>

Actualmente las enfermedades gastrointestinales son las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo. La presencia de enterobacterias en los alimentos y el agua es una causa común de diarrea y disentería entre la población infantil. *Escherichia coli* es un ejemplo clásico de las bacterias entéricas capaces de producir enfermedades <sup>5</sup>.

Cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (ETEC) producen toxinas que afectan el intestino delgado, tales como enterotoxinas termolábil (LT) se asemeja a la toxina producida por *Vibrio cholerae*, y junto con otras toxinas termoestables (ST). Una sola cepa puede producir una o ambas de estas formas de toxinas genéticamente determinada por el plásmidos<sup>6</sup>.

Actualmente también existen una variedad de agentes causales de las diarreas agudas, las cuales pueden ser de origen bacteriano, vírico o parasitológico; los más frecuentes lo constituyen: *Rotavirus*, *Vibrio cholerae* y *Giardia lamblia*, produciendo generalmente diarreas líquidas; también tenemos a los responsables de los cuadros disentéricos, *Shigella sp*, *Campylobacter jejuni*, y *Entamoeba histolytica*.<sup>7</sup>

El aumento de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos tradicionales ha impulsado la búsqueda de nuevas formas eficaces y económicas para controlar las enfermedades infecciosas. Los estudios de las plantas medicinales, sometidos a diferentes pruebas para determinar su actividad antibacteriana, actualmente, han demostrado ser muy eficaz muchas veces, lo cual puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios, tales como, los alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas entre otros, que son los principales constituyentes encargados de la actividad antimicrobiana<sup>8</sup>.

En los últimos años, diversos organismos internacionales como la OMS, están impulsando la revalorización de la medicina tradicional, un hecho importante es que en 1977 la 30<sup>va</sup> Asamblea Mundial de la salud emitió una Resolución (RHA 30.49), en la que instaba a los gobiernos interesados a otorgar “Una Importancia Adecuada al Empleo de sus Sistemas Médicos Tradicionales con una Reglamentación Apropriada y Acorde con sus Sistemas Nacionales de Salud”. Recomienda la OMS, aplicar los recursos de la asistencia sanitaria tradicional e indígena a la ejecución de los programas nacionales de salud, particularmente en el nivel de atención primaria de salud (APS) y que la asistencia médica debe ser una combinación de medicina tradicional y moderna.<sup>9</sup>

La flora amazónica peruana constituye una de las más grandes reservas de recursos terapéuticos.<sup>10</sup> El hombre amazónico, a través de toda su historia, ha logrado identificar empíricamente las bondades terapéuticas de diversas plantas de su entorno, que han contribuido a aliviar y a curar diversas enfermedades entre ellas las gastrointestinales.

El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas está basado en la observación, la experiencia y el conocimiento profundo del entorno, transmitido de generación en generación y enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante, este saber ha devenido en la medicina popular y la herboristería actual.<sup>11</sup>

La especie *Psidium guajava* L., denominada comúnmente guayaba, pertenece a la familia Myrtaceae. Se usa en la medicina tradicional para combatir diferentes enfermedades como hemostático<sup>12</sup>, antiséptico, astringente, antidisentérico, tratamiento de la diabetes, digestivo y anticatarral<sup>13</sup>, entre otros usos.

Por tal motivo consideramos de importancia el estudio en el presente trabajo de esta especie vegetal que es utilizada empíricamente por los pobladores de nuestra región para el tratamiento de las infecciones gastrointestinales, entre ellas la diarrea. Así se contribuirá a demostrar si la terapia empírica tiene base científica y podría ser una alternativa validada, eficaz con un menor costo.

## **1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.**

Las enfermedades diarreicas agudas o EDAS son la principal causa de enfermedad en el mundo, pero es de particular preocupación en los países en vías de desarrollo; actualmente en el Perú es considerada como la tercera causa de morbi-mortalidad.<sup>14</sup> A raíz de este problema se plantea en la actualidad la búsqueda en la medicina tradicional alternativas terapéuticas con mayor eficacia y menor costo.

La Amazonía Peruana se caracteriza por presentar una gran biodiversidad de especies vegetales y animales. Los pobladores amazónicos con el transcurrir del tiempo han desarrollado conocimientos empíricos sobre los usos adecuados de ciertas plantas medicinales para el tratamiento de sus enfermedades.<sup>15</sup>

El uso de la “guayaba” (*Psidium guajava* L) como tratamiento antidiarreico, parasitario y astringente es frecuente en los pobladores amazónicos y las partes más empleadas son el cogollo, corteza y hojas.<sup>16</sup>

La información científica que se tiene de esta planta es a nivel general en donde se han realizado estudios farmacológicos y toxicológicos, considerándose al cogollo, corteza y hojas en las cuales se han reportado actividad antimicrobiana, antifúngica y antiparasitaria las cuales son atribuidas a los diferentes compuestos fitoquímicos presentes en la especie vegetal.<sup>17</sup>

Esto nos conduce a la selección y búsqueda del posible efecto antimicrobiano *In vitro* de esta planta en nuestra región ya que no se cuenta con estudios científicos realizados mediante selección de *Psidium guajava* L en la amazonía peruana.

¿Presentará actividad antimicrobiano *in vitro* el extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L frente a *Escherichia coli* ATCC 25922?

### **1.3. OBJETIVOS.**

---

**1.3.1. OBJETIVO GENERAL:**

- ◆ Determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L.

**1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- ◆ Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L mediante el Método de Difusión en agar (Método de Kirby Bauer).
- ◆ Determinar y estandarizar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L. mediante el Método de Dilución en Caldo (Método de Macro Dilución).
- ◆ Analizar y procesar los resultados obtenidos en el ensayos *in vitro* de la actividad antimicrobiana de la Yema foliar de *Psidium guajava* L. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

## ***CAPITULO II***

## **2.1. MARCO TEÓRICO.**

---

Los antimicrobianos constituyen uno de los hitos más trascendentales no sólo de la historia de la medicina, sino también de la historia de la humanidad, al reducir las cifras de mortalidad con su introducción en la clínica a principios de la década de 1940.<sup>18</sup> Representan la intervención más importante en la terapéutica de las enfermedades infecciosas. Por este motivo, su uso apropiado es esencial no solamente para recuperar la salud del paciente, sino también para evitar los potenciales efectos tóxicos, prevenir la emergencia de microorganismos resistentes y reducir los costos del cuidado de la salud.<sup>19</sup>

La medicina popular es rica en ejemplares de plantas utilizadas para los más diversos fines, que sustituyen muchas veces, la prescripción médica.<sup>20</sup> Esto se justifica, en parte, por el alto grado de accesibilidad de las plantas medicinales, debido a la gran disponibilidad de estos, muy diferente del que ocurre con los medicamentos industrializados que en la mayoría, dependen de la tecnología y materia prima externa.<sup>21</sup>

La cantidad de plantas existentes en el planeta, reconocida sobre el punto de vista científico son muy diversos pero solamente cerca del 5 % han sido estudiadas fitoquímicamente y un menor porcentaje han sido validadas sobre los aspectos biológicos.<sup>22</sup> El valor de la biodiversidad de la Amazonía ha sido muy discutido por la industria farmacéutica, debiéndose considerar que los tratamientos basados en productos naturales son utilizados por el 80% de la población mundial.

La investigación de nuevos agentes farmacológicamente activos, obtenidos de plantas ha permitido descubrir muchos fármacos clínicamente útiles para tratar muchas enfermedades.

### 2.1.1. *Psidium Guajava L.*

#### 2.1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

- ◆ **División** : *Magnoliophita*
- ◆ **Clase** : *Magnoliopsida*
- ◆ **Sub clase** : *Rosiidae*
- ◆ **Orden** : *Mortales*
- ◆ **Familia** : *Myrtaceae*
- ◆ **Género** : *Psidium*
- ◆ **Especie** : “*guajava*”

#### 2.1.1.2. ASPECTOS BOTANICOS.

##### ◆ *Descripción Botánica.*

*Psidium guajava* L “guayaba”, árbol de copa abierta e irregular, con 3 a 10 metros. Tallo de 10 a 18 cm. de diámetro, con las ramillas terminales cuadrangulares, corteza de color pardo-rojizo, oscura, lisa, se desprende fácilmente en escamas o costras (ritidoma). Hojas simples, opuestas y sin estípulas, ovada - elíptica u oblonga, de 3 a 18 cm. de largo y 2,5 a 6,5cm de ancho, pubescentes y con nervaduras prominentes en el envés; pedúnculos axilares; Inflorescencia, racimo, axilares, de uno a tres flores pubescentes. Fruto globoso o piriforme, amarillo de 3 a 6cm de diámetro.<sup>23</sup>

##### ◆ *Hábitat.*

Es una especie nativa del Perú cultivada desde tiempos remotos, crece entre 0 a 1500 m de altitud.<sup>24</sup>

◆ **Distribución Geográfica.**

Se encuentra distribuida por todo el Perú y se ha reportado en los departamentos de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, Lima, Loreto, San Martín, Ucayali.<sup>23,24</sup>

**2.1.1.3. PRINCIPALES CONSTITUYENTES FITOQUÍMICOS.**

Entre sus principales constituyentes fitoquímicos que presenta la planta tenemos: Hojas: taninos, aceite esencial, triterpenos, esteroides ( $\beta$ -sitosterol); Raíz: taninos, leucocianidinas, esteroides, cumarinas; Flor: cumarinas, flavonoides, triterpenos (ácido oceánico).<sup>25</sup>

**2.1.1.4. USO TRADICIONAL.**

En la medicina tradicional ha sido ampliamente usado y conocido en todo el Perú, desde épocas precolombinas, existiendo numerosas evidencias arqueológicas. Los usos tradicionales más conocidos y difundidos son como antidiarreicos. Otros usos reportados son en la gastroenteritis y disentería, cólico estomacal, antibacteriano que actúa en gérmenes patógenos del intestino, Indigestión, inflamaciones de la boca y garganta en forma de gárgaras o enjuagatorios. En algunas tribus de nuestra selva se mascan las hojas tiernas para controlar el dolor de muelas por su débil efecto sedante; se usa ocasionalmente como emenagogo y para lavados vaginales en leucorrea.<sup>26</sup>

---

Por un lado se debe recalcar su alto contenido de taninos (tanto de la familia de los catecoles como de los pirogaloles), en una proporción muy elevada que puede llegar a 30% en la corteza y que en las hojas alcanza a 8-15%, con una concentración similar en los frutos verdes, que pierden su tanino al madurar.<sup>26</sup>

Los taninos de la guayaba son los principales principios antidiarreicos que esta fruta contiene. Las hojas de la guayaba contienen, además de los taninos una gran cantidad de otras sustancias: ceras, resinas azúcares, pigmentos carotenoides, y vitaminas del grupo B entre los cuales predomina el ácido nicotínico. De todas las sustancias, es importante mencionar la guaijaverina y la avicularina, de gran actividad antibacteriana, probablemente los responsables por algunos de los efectos medicinales pues inhiben el crecimiento de la *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y del *Micrococcus pirógeno*.<sup>27</sup>

#### 2.1.1.5. ANTECEDENTES.

**Martínez et al (1997)**<sup>28</sup> **Cuba.** Evaluaron mediante un estudio comparativo la actividad antimicrobiana y antifúngica de un extracto fluido al 40 % (etanol al 40%) de *Psidium guajava* L. mediante el método de difusión en Agar a una concentración de 107 mg/ml; para ello utilizaron microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* como microorganismos gram negativos y la levadura *Candida albicans*; concluyendo que el extracto fluido de *Psidium guajava* L. evidencia una respuesta de inhibición en todas las cepas en estudio, menor que el 50 % respecto al control positivo y, en relación con la levadura, se apreció una carencia total de actividad inhibitoria.

**Torres et al (1998)**<sup>29</sup> **Cuba.** Evaluaron el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava* L. mediante el método de Kirby Bauer contra *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*. Concluyeron que el extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* L. presenta un mayor efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* con respecto a *Proteus mirabilis* y *Salmonella Typha*; además de ello comprobaron que el efecto antimicrobiano se atribuye a la presencia de taninos en las hojas de esta planta.

**Moron et al (1999)**<sup>30</sup> **Cuba.** Demostraron mediante ensayo *In vivo* el efecto antidiarreico de la tintura de hojas de guayaba al 20%, para lo cual emplearon como modelo el tránsito intestinal en ratones para determinar el efecto de la tintura sobre la movilidad intestinal; emplearon ratones suizos (OF - 1) agrupados aleatoriamente y administraron diferentes dosis (200; 400 y 800 mg/kg pc) de la tintura de guayaba; con los resultados obtenidos los autores concluyeron que la tintura de hoja de guayaba presenta efecto antidiarreico, dependiendo de la dosis administrada.

**Oranday et al (2000)**<sup>31</sup> **México.** Evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas pertenecientes a las familias Myrtaceae (*Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus camaldulensis*, y *Psidium guajava*) y Lauraceae (*Cinnamomum zeylanicum*) con tres solventes de distinta polaridad sobre bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, mediante el método de difusión en placa con discos de papel filtro. Como resultado observaron que los microorganismos más sensibles fueron *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Shigella flexneri*.

**Betancourt et al (2000)**<sup>32</sup> **Cuba.** Evaluaron la posible actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. Para ello se emplearon un sistema de ensayo a corto plazo que utilizaba el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* como microorganismo de prueba. Comprobaron que el extracto fluido no presentaba actividad genotóxica en el sistema evaluado: inducción de segregación somática en diploides heterocigóticos. Estos resultados contribuyen a avalar experimentalmente la inocuidad de esta planta, a fin de ratificar su uso en la medicina tradicional.

**Martínez et al (2001)**<sup>33</sup> **Cuba.** Mediante un estudio de toxicidad evaluaron el efecto toxicológico agudo de hojas secas de *Psidium guajava* L. utilizando los métodos de dosis letal media LD50 en ratones suizos (OF1) y toxicología alternativa (clases tóxicas agudas) en ratas wistar. Los resultados toxicológicos obtuvieron no arrojaron muertes en ninguno de los 2 modelos experimentales en el rango de dosis empleando hasta 2 000 mg/kg/p.c. y los resultados histológicos no sugirieron daños atribuibles a toxicidad del material vegetal probado, por lo que los autores concluyeron que las hojas de *Psidium guajava* no son tóxicas.

**Vieira et al (2001)**<sup>34</sup> **Brasil.** Evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos de etanol, de agua y de acetona de brotes de hojas de guayaba y hojas de papaya. Utilizando cepas de *Escherichia coli* y *S. aureus* para su ensayo. Los extractos de hojas de papaya (*Carica papaya* Linn) no mostró actividad microbicida mientras que los extractos de brotes de guayaba (*Psidium guajava* Linn) mostro halo superior a 13 mm de diámetro. Concluyeron que los extractos de brotes de guayaba constituye una opción viable de tratamiento para la diarrea causada por *Escherichia coli* y *S. aureus*, debido a su acción curativa rápida, fácil disponibilidad en los países tropicales y de bajo coste para el consumo.

**Carvalho (2002)<sup>35</sup> Brasil.** Evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y ramas de *Psidium guajava* L. sobre bacterias gram-negativas (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*), a una concentración de 100mg/ml; para lo cual utilizaron el método de difusión en disco de papel y determinaron su CMI por el método en dilución en caldo; concluyendo que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L. presenta una mayor actividad antimicrobiana que el extracto hidroalcohólico de ramas; además de ello ambos extractos no presentan actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella spp*.

**Abdelrahim et al (2002)<sup>36</sup> Sudan.** Evaluaron las actividades antibacteriana de los extractos acuosos y metanolicas de la corteza de *Psidium guajava* L a una concentración de 45 mg/ml; mediante el método de difusión en agar, y determinaron la CMI por el método de dilución en agar; contra *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* El extracto metanólico de la corteza mostro la mayor actividad en contra de todos los estándares de prueba de los microorganismos.

**Coelho de Souza et al (2003)<sup>37</sup> Brasil.** Evaluaron el extracto de metanol de *Psidium guajava* L en contra de siete microorganismos (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1600), mediante el test de difusión en agar. El extracto de metanol *Psidium guajava* L era activa contra al menos un microorganismo.

**Sánchez et al (2005)<sup>38</sup> Brasil.** Evaluaron las actividades antibacteriana de los extractos acuosos e hidroalcohólicos (agua: etanol), de las hojas, raíces y corteza de *Psidium guajava* L. mediante el ensayo de microdilución. Los extractos acuosos de *Psidium guajava* L fueron activos contra las bacterias gram-positivos *Staphylococcus aureus* (CIM = 500, 125 y 250 µg/ml, respectivamente) y *Bacillus subtilis* (CIM = 500 µg/ml), y prácticamente inactivo en contra de las bacterias gram-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (CIM > 1000 µg/ml). Los extractos hidroalcohólicos mostraron mayor actividad antimicrobiana en comparación con los extractos acuosos.

**Salgado et al (2006)<sup>39</sup> Brasil.** Estudiaron el extracto acuoso de las hojas de *Psidium guajava* L, a una concentración de 1000mg/kg pc, por su efectos antidiarreicos, a fin de racionalizar su uso en la medicina tradicional. El extracto produjo un descenso en el los movimientos de propulsión del contenido intestinal en ratones.

Estos resultados sugieren que un extracto acuoso de hojas de guayaba se puede utilizar como un tratamiento eficaz para una diarrea no específica en la medicina popular.

**Gonçalves et al (2008)<sup>40</sup> Brasil.** Evaluaron la acción antimicrobiana de aceites esenciales y los extractos de metanol, de hexano y de acetato de etilo de hojas de guayaba. Frente a bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Demostraron que *Staphylococcus aureus* fue más inhibido por los extractos. El extracto de metanol mostró una inhibición mayor de bacterias. El extracto de aceite esencial mostró actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Concluyeron, que el extracto de hoja de guayaba y los aceites esenciales son muy activos contra *Staphylococcus aureus*, constituyendo importantes fuentes potenciales de nuevos antimicrobianos.

**Odunbaku et al (2008)<sup>41</sup> Nigeria.** Evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de etanol y metanol de *Psidium guajava*, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona mirabilis*. Y utilizaron el método en difusión en agar. La inhibición más alta se obtuvo con el extracto de etanol (300-500 mg/ml).

**Obinna et al (2008)<sup>42</sup> Nigeria.** Evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de hojas de *Psidium guajava* L en contra de dos microorganismos clínicamente aislados del tracto gastrointestinal, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El extracto de etanol mostró un efecto inhibitor más en comparación con el extracto acuoso. El diámetro de las zonas de inhibición de los extractos de hojas de *P. guajava* fue de 8 - 16 mm y 14 - 21 mm, respectivamente, para los extractos acuosos y etanólicos. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) fueron 5,0 y 0,625 mg /ml respectivamente, para los extractos acuosos y etanólicos de *P. guajava*.

## 2.1.2. *Escherichia coli*

### 2.1.2.1 GENERALIDADES.

Fue descrita por primera vez en 1885 por el alemán Theodor von Escherich, quién la denominó *Bacterium coli* y Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.<sup>43</sup>

*Escherichia coli*, es una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, incluido el humano. Es la bacteria anaerobia facultativa más común de la microbiota intestinal. La colonización del tubo digestivo por la bacteria se presenta en las primeras horas de vida y tanto el microorganismo como el huésped se benefician por esta interacción. En individuos sanos, *Escherichia coli* de la microbiota no produce daño alguno: sin embargo, en pacientes inmunosuprimidos o cuando la barrera que representa el tubo digestivo es dañada y la bacteria sale de su hábitat natural pueden infectar y causar enfermedad.<sup>44</sup>

Actualmente se ha demostrado mediante estudios clínicos la existencia de *Escherichia coli* que en el proceso evolutivo han sufrido cambios genéticos (mutaciones, la adquisición de material genético horizontalmente, o ambas cosas), que han conducido a que estas cepas desarrollen la capacidad de causar diferentes enfermedades incluso en individuos sin trastornos inmunitarios graves.<sup>45</sup>

### 2.1.2.2. CLASIFICACION.

Se han identificado por lo menos cinco grupos diferentes de cepas de *Escherichia coli* productoras de diarrea. Las características clínicas de la enfermedad causada por cada grupo son de sintomatología diferente.

#### 2.1.2.2.1. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

La *Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de esta clase de microorganismos (y es el único para el cual existe información epidemiológica y clínica extensa). Las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 pueden ocurrir en forma esporádica o en brotes. La enfermedad en general comienza como una diarrea no sanguinolenta y puede progresar hasta una diarrea microscópicamente sanguinolenta. El dolor abdominal intenso es típico: aparece fiebre en un tercio de los casos. El periodo de incubación de esta cepa es de 1 a 8 días.<sup>46</sup>

#### ◆ **Signos y síntomas.**

Se asocian con diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico-hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica posdiarrea. Inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta el Síndrome Urémico Hemolítico.<sup>46, 47</sup>

#### 2.1.2.2.2. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).<sup>47</sup>

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. Es la causante de las diarreas típicamente en neonatos y niños menores de dos años en países en vías de desarrollo, en forma esporádica o en epidemias.

##### ◆ **Mecanismo de patogenicidad.**

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E).<sup>48</sup>

La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherente factor) y de algunos genes cromosomales.<sup>49</sup>

##### ◆ **Signos y Síntomas.**

La enfermedad se caracteriza por una diarrea acuosa que a menudo es grave y puede causar deshidratación. *Escherichia coli* enteropatógena es una causa importante de diarrea crónica que puede provocar falta de crecimiento.<sup>50</sup>



### 2.1.2.2.3. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

La diarrea causada por este tipo de cepa es una enfermedad autolimitada de gravedad moderada con deposiciones acuosas y cólicos abdominales. Se presenta en personas de todas las edades pero es una causa importante de diarrea en los lactantes de los países en vías de desarrollo. Se han producido brotes en adultos, habitualmente por la ingestión de alimentos o agua contaminados. *Escherichia coli* enterotoxigénica es la causa principal de diarrea del viajero.<sup>51</sup>

#### ❖ **Mecanismo de Patogenicidad.**

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones.<sup>48,51</sup> Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones.<sup>52</sup>

#### **Signos y Síntomas.**

El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave.<sup>39, 53</sup>

#### 2.1.2.2.4. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Esta cepa puede producir una disentería similar a la causada por *Shigella*. Esta cepa y *Shigella spp.* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas.

##### ❖ **Mecanismo de patogenicidad.**

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes.<sup>54</sup> La información genética para este mecanismo está en el loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea.

##### ❖ **Signos y síntomas.**

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.<sup>55</sup>

#### 2.1.2.2.5. *Escherichia coli* enteroagregante (EA<sub>agg</sub>EC)

Es un conjunto de cepas que parece causar diarrea crónica en lactantes y niños pequeños. Esta cepa ha sido reconocido como causa también de "diarrea del viajero" de brotes de enfermedad de origen alimentario, pero estos aspectos no han sido explorados todavía.<sup>57</sup>

##### ❖ **Mecanismo de patogenicidad.**

Esta especie originalmente agrupada por su modo peculiar de adherencia entre sí y a células eucariotas en cultivo, según observaciones originales de Craviotto, Scaletsky y Nataro.<sup>58</sup> La adherencia y la colonización del intestino delgado por este tipo de bacterias son mediadas por fimbrias codificadas en plásmidos.<sup>59</sup>

##### ❖ **Signos y Síntomas.**

EAEC produce una reacción inflamatoria con formación de mucus y segrega toxinas proteicas propias que contribuyen al daño epitelial.<sup>60</sup> El resultado es una diarrea líquida o mucosa, con escasa fiebre o vómitos, que en muchos casos se vuelve persistente (de duración superior a 14 días)<sup>61</sup>

### **2.1.3. MÉTODOS BÁSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.**

#### **2.1.3.1. GENERALIDADES.**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.<sup>63</sup>

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Su resultado, la farmacología del antimicrobiano, en particular en el lugar de la infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, sustentan la elección de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Asimismo, ofrece, en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.<sup>64,65</sup>

#### **2.1.3.2. ANTECEDENTES DE LA PRUEBA.**

Los ensayos de sensibilidad deben estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad.

Los métodos más comúnmente utilizados en el laboratorio por su sencillez y su rapidez, son: El Método de Difusión en Agar (Método de Kirby Bouer) y los Métodos de Dilución en Caldo y Agar (Método de Macro dilución), ambos métodos nos permiten obtener datos cuantitativos. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar.<sup>66</sup>

### 2.1.3.3. TIPOS DE PRUEBAS.

#### 2.1.3.3.1. ANTIBIOGRAMA EN DILUCIÓN.<sup>67</sup>

◆ *Fundamento.*

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguno de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos.

En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

#### 2.1.3.3.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR: <sup>68</sup>

##### ◆ **Fundamento.**

El test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias fastidiosas patógenas.

Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona correlacionado con la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS está basado en el método originalmente descrito por Bauer et al., (Método de Kirby-Bauer).

Este es el método de difusión en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

El método de Kirby Bauer, consiste en el inóculo de la bacteria en concentración conocida en una placa con medio sólido y la aplicación en la superficie de discos de papel impregnados en concentraciones conocidas de antimicrobianos. De acuerdo al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, alrededor del disco y medido en milímetros, se consigna a la bacteria como sensible o resistente al antimicrobiano evaluado.

Es una técnica simple y económica, pero aporta solo datos semi cuantitativos o cualitativos respecto a la susceptibilidad de la bacteria. No es útil para la mayoría de los microorganismos de crecimiento lento o difíciles de cultivar y no ha sido estandarizado para las bacterias anaerobias.

## **2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES.**

---

## 2.2.1. VARIABLES.

### 2.2.1.1. Independiente:

- ◆ Extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L.

#### Indicador:

- ✓ Dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/ml
- ✓ Concentración de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/ml para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

### 2.2.1.2. Dependiente:

- ◆ Actividad antimicrobiana.

#### Indicadores:

- ✓ Diámetro de la zona del halo de inhibición expresadas en milímetros (mm) formado alrededor del disco en los cultivos *in vitro* de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922.
- ✓ Presencia y/o ausencia de turbidez en los tubos con diferentes concentraciones del extracto acuoso e hidroalcohólico de la yema foliar de *Psidium guajava* L..

CUADRO 1 – OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: VARIABLE INDEPENDIENTE

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Extractos acuoso e hidroalcohólico liofilizados de la yema foliar de <i>Psidium guajava</i> L.	<b>Extracto acuoso Liofilizado:</b> Producto de la extracción de las yemas foliares, obtenidas por cocción con agua para luego ser conservada en congelación para su posterior liofilizado.	<b>Extracto acuoso liofilizado:</b> producto de la extracción acuosa por cocción del cogollo a 70°C durante 15 minutos; con posterior filtrado, concentrado y congelado a -22°C para luego ser liofilizado a -40°C con una presión de $1.33 \times 10^{-3}$ MBARR por un periodo de 72 horas.	<b>Dosis:</b> 50, 100, 200 y 400 mg/ml	<b>Intervalar</b> Tipo: Cuantitativo
	<b>Extracto hidroalcohólico Liofilizado:</b> Producto de la extracción de las yemas foliares, obtenidos por maceración en etanol a 70° para luego ser conservado en congelación para su posterior liofilizado.	<b>Extractos hidroalcohólicos liofilizados:</b> producto de la extracción por maceración del cogollo con etanol a 70° por un periodo de 3 días; Con posterior filtrado, concentrado en rotavapor, y congelado a -22°C para ser liofilizado a -40°C con una presión de $1.33 \times 10^{-3}$ MBARR x 72 horas.		

CUADRO 2 – OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES: VARIABLE DEPENDIENTE

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA
Actividad antimicrobiana	Propiedad por la cual una sustancia es capaz de inhibir o impedir el crecimiento de bacterias o es capaz de destruirlos.	<p><b>Capacidad Antimicrobiana:</b> Determinación del halo de inhibición mediante la aplicación del disco de sensibilidad que contiene el extracto en estudio en el medio de cultivo bacteriano.</p> <p><b>Concentración Mínima Inhibitoria:</b> Concentración más baja del extracto capaz de inhibir el crecimiento visible de las bacterias, la cual se determina mediante la ausencia de turbidez en una batería de tubos a diferentes concentraciones, después de las 18 -24 horas de realizado la siembra.</p>	<p>Diámetro del Halo de inhibición (mm).</p> <p>Presencia y/o ausencia de turbidez en los tubos con diferentes concentraciones de extracto.</p>	<p><b>Intervalar</b></p> <p>Tipo: <b>Cuantitativo</b></p>

### **2.3. HIPÓTESIS.**

---

El extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

### ***CAPITULO III***

### **3.1. METODOLOGIA Y DISEÑO DE INVESTIGACION**

### 3.1.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.

◆ **Tipo de Estudio: Cuantitativo.**

- **Experimental - Analítica:** Se realizó comparaciones de la variable dependiente entre las concentraciones en estudio.
- **Prospectivo:** En el registro de información se inició a partir de la fecha de estudio.
- **Longitudinal:** Se estudió las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

### 3.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

Ensayo *in vitro*, realizada bajo condiciones fisicoquímicas controladas, manteniendo siempre el control de muchos factores entre ellos la esterilización de los materiales utilizados en las diferentes pruebas realizadas como se detallan:

- ◆ Esterilización del laboratorio antes y después de las pruebas realizadas para dar mayor seguridad.
- ◆ Medios de cultivo con pH adecuado para no tener interferencia en los resultados.
- ◆ Autoclavado de los medios de cultivo y de los materiales utilizados antes, durante y después de las pruebas realizadas, para no crear falsos positivos.
- ◆ Conservación de los medios de cultivos y de la cepa bacteriana en refrigeración óptima.
- ◆ Conservación de los discos en refrigeración (4° 8°C).
- ◆ Siembra del cultivo en condiciones de esterilidad para no crear interferencias en el trabajo.
- ◆ Incubación de las placas en incubadoras a 36±2 °C por 24h.

La distribución de los grupos en estudio fue según el siguiente esquema:

- ◆ **Método de difusión en Agar.** Permitió evaluar la capacidad antimicrobiana de la especie vegetal en estudio, el cual se realizó por medición y registro del diámetro del halo de inhibición formado alrededor de los discos que contienen los extractos acuosos e hidroalcohólicos y de los discos estándares de antibióticos. Este método estuvo formado por los siguientes grupos:

**CUADRO 3 – DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE TRABAJO POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

Grupos de Trabajo	Muestra Problema	DOSIS		Método
		Piloto	Final	
Experimental	Extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de <i>Psidium guajava L</i>	400mg /ml	50, 100, 200 y 400 mg/ml	Difusión en Agar
Control (+)	Cloranfenicol		30 µg	
Control (-)	DMSO		0.5%	

- ◆ **Método de Dilución en caldo:** Permitió determinar la Concentración Mínima Inhibitoria, la cual se realizó por observación directa de la turbidez de los medios de cultivo tomando como referencia los tubos controles positivos y negativos. Estos grupos estuvieron constituidos por:

**CUADRO 4 – DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE TRABAJO POR EL MÉTODO DE DILUSIÓN EN CALDO**

Grupos de Trabajo	Muestra Problema	DOSIS		Método
		Piloto	Final	
Experimental	Extracto acuoso e hidroalcohólico	400mg/	400mg/	Dilución en Caldo
	liofilizado de la yema foliar de <i>Psidium guajava L</i>	ml	ml	
Control (+)	Caldo Mueller Hinton e inóculo.			
Control (-)	Caldo Mueller Hinton			

### **3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.**

### 3.2.1. POBLACIÓN VEGETAL:

La población estuvo constituida por la especie vegetal de *Psidium guajava* L. (Guayaba), que se encontró en las plantaciones de guayaba del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en la comunidad “El Dorado”, Km 25 de la carretera Iquitos - Nauta.

### 3.2.2. MUESTRA VEGETAL:

La muestra estuvo constituida por 200 gramos de yema foliar de *Psidium guajava* L, que fueron recolectadas de las plantaciones de guayaba del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en la comunidad “El Dorado”, Km 25 de la carretera Iquitos - Nauta.

#### **Criterios de Inclusión:**

- ◆ Las muestras de la especie vegetal que no presentaron alteraciones morfológicas en su desarrollo.
- ◆ Las yemas que presentaron diámetros menor o igual a 2 cm.

#### **Criterios de Exclusión:**

- ◆ Las muestras que presentaron alteraciones morfológicas en su desarrollo.
- ◆ Las yemas que presentaron un diámetro mayor a 2 cm.

### 3.2.3 POBLACIÓN BACTERIANA:

La población estuvo constituido por la cepa bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922, provenientes del Instituto Nacional de Salud, con sede en la ciudad de Lima.

### 3.2.4 MUESTRA BACTERIANA

Estuvo conformado por el número de colonias que se emplearon para la preparación del inóculo bacteriano, que osciló entre 3 a 5 colonias de tamaño y morfología similar.

#### **Criterios de inclusión**

- ◆ Cepas que reunieron las características microscópicas del microorganismo

#### **Criterios de exclusión**

- ◆ Cepas que presenten contaminantes.
- ◆ Cepas que no coincidan con el fenotipo del microorganismo.

### **3.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES.**

**3.3.1. Instrumentos.**

- ◆ Fichas de recolección de datos (Ver Anexo N° 01)

**3.3.2. Material vegetal.**

- ◆ Extracto acuoso liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L.
- ◆ Extracto hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava*

**3.3.3. Material biológico.**

- ◆ Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 que fueron adquiridas del Laboratorio Referencial DISA - LORETO.

**3.3.4. Materiales de plástico.**

- ◆ Micropipetas graduables de 10, 100 y 500  $\mu$ l
- ◆ Tip's 10, 100 y 500  $\mu$ l

**3.3.5. Materiales de vidrio o metal.**

- ◆ Asa de siembra bacteriológica.
- ◆ Cuchillo mediano.
- ◆ Matraz Erlenmeyer de 50, 250 y 500 ml
- ◆ Escobillas para tubos.
- ◆ Espátulas medianas.
- ◆ Gradilla metálica.
- ◆ Pinza estéril.
- ◆ Pipetas (1, 2, 5 y 10 ml)
- ◆ Placas petri.
- ◆ Regla graduada en milímetro.
- ◆ Termómetros
- ◆ Tubos con Tapa rosca.
- ◆ Tubos de ensayos estériles (10x10).

- ◆ Probetas de 50, 100 y 500 ml.
- ◆ Varillas.

### 3.3.6. Otros materiales.

- ◆ Algodón.
- ◆ Detergente.
- ◆ Guantes quirúrgicos.
- ◆ Hisopos para medios de cultivos.
- ◆ Mascarillas.
- ◆ Papel de despacho.
- ◆ Papel secante.
- ◆ Papel Wattman N° 03.
- ◆ Parafilm 2' x 250'
- ◆ Plumón marcador.
- ◆ Disco de sensibilidad de Cloramfenicol 30 µg
- ◆ Disco estériles de 6 mm de diámetro

### 3.3.7. Equipos.

- ◆ Autoclave (AUTESTER)
- ◆ Balanza analítica (SARTORIUS)
- ◆ Cámara de flujo laminar.(Macmehelic "Forma científic / Model:13089-79")
- ◆ Cámara fotográfica profesional (Sony Cyber Shop 7.2 pixeles)
- ◆ Centrifuga (CHRIST)
- ◆ Cocina eléctrica(PRACTIKA /Modelo: cocineta Eléctrica HP1)
- ◆ Cronómetro digital. (MERK)
- ◆ Espectrofotómetro (HACH)
- ◆ Incubadora.
- ◆ Refrigeradora DE 2-8°C (FRIOLUX)
- ◆ Mechero Bunsen

**3.3.8. Reactivos.**

- ◆ Ácido Sulfúrico 0.18M
- ◆ Agar Mueller Hinton (SIGMA)
- ◆ Agua destilada
- ◆ Cloruro de Bario dihidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,048M
- ◆ Caldo Mueller Hinton (SIGMA)
- ◆ Discos de sensibilidad de Cloramfenicol 30  $\mu\text{g}$
- ◆ Etanol q.p.
- ◆ Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5%

### **3.4. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

Para la recolección de datos y aplicación sistemática de las técnicas e instrumentos seleccionados se utilizaron durante la investigación como apoyo, instrumentos de fichas acerca de la muestra vegetal (ver Anexo N° 01)

Para la recolección de datos de la actividad antimicrobiana se empleó la observación directa, medición y registro de la inhibición observada en cada microorganismo integrante de la muestra. Los datos obtenidos fueron registrados en fichas de recolección de datos, teniendo en cuenta el método, microorganismo y sustancia.

### **3.4.1. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.**

#### **3.4.1.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal:**

Las yemas foliares de *Psidium guajava* L fueron recolectadas de las plantaciones pertenecientes al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en la comunidad “El Dorado”, Km 25 de la carretera Iquitos – Nauta de 7:00 a 9:00 a.m y para su selección se tomó en cuenta los criterios de exclusión e inclusión.

#### **3.4.1.2. Preparación de los extractos liofilizados**

##### **◆ Extracto acuoso liofilizado.**

Se llevó a cabo mediante la cocción de 200 gramos de la yema foliar en 500 ml de agua destilada, a una temperatura de 70° C durante 15 minutos; luego se dejó enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos para su posterior filtrado; luego se dejó en refrigeración por 3 días para que sedimente, pasado estos días se eliminó el sedimento para luego filtrarlo y concentrarlo por evaporación a 50 – 60°C, los extractos concentrados fueron congelados a -22°C por 72 horas para su posterior liofilización mediante sublimación (-40°C y  $1.33 \times 10^{-3}$  MBARR).

La muestra vegetal liofilizada se almacenó en un ambiente seco a temperaturas menores de 25°C en frascos con cierre hermético de color ámbar.

◆ **Extracto hidroalcohólico liofilizado.**

Se pesó 200 gramos de la yema foliar y se colocó en un recipiente aproximadamente de 1000 ml, luego se añadió el solvente Etanol/Agua (70:30) y se dejó macerar por 48 horas, se eligió este solvente porque en la medicina tradicional las especies vegetales son maceradas en aguardiente (Etanol/agua).

Luego de 48 horas de maceración hidroalcohólica, se procedió a filtrar por gravedad, para la filtración se utilizó un matraz en el cual se colocó un embudo de vidrio y papel filtro de 20-30 µm.

Al finalizar la filtración se obtuvo un residuo y una disolución etanólica. La disolución etanólica se transvasó a un balón con boca esmerilada y se llevó a rotavapor a presión reducida con la finalidad de evaporar la mayor cantidad del solvente (alcohol).

El extracto obtenido del rotavapor se colocó en recipientes de 250ml para proceder a congelar a (-20°C), por 3 días. Luego se realizó la liofilización de la muestra que consiste en eliminar el agua del extracto mediante sublimación con un equipo de liofilización durante 72 horas.

### **3.4.1.3. Preparación de los Discos de Sensibilidad para la Muestra Vegetal.**

Se utilizó un perforador nuevo, el cual fue esterilizado por Autoclave. Luego se procedió a perforar el papel filtro Wattman N° 3, obteniéndose discos de 5.5mm de diámetro.

De la solución stock de 400mg/ml y de cada una de las diluciones (200, 100 y 50 mg/ml) del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizado que se utilizó para la prueba antimicrobiana, se procedió a preparar los discos de sensibilidad añadiendo 10 µl de los diferentes extractos en los discos de papel elaborados.

### **3.4.1.4. Preparación del Inóculo:**

Usando un asa estéril, se picó 4 ó 5 colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922, a un tubo que contenía 3 ml de caldo Müller-Hinton para luego ser incubada a 37°C por 5 horas para obtener una suspensión equivalente a la turbidez 0.5 de la escala de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) como la del antibiograma.

### **3.4.1.5. Replicación del Inóculo**

Una vez obtenida el tubo madre conteniendo *Escherichia coli* ATCC 25922 se replicó semanalmente en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar de la siguiente manera:

- ◆ Se tomó una alícuota del tubo madre con un asa redonda y se sembró por estría en un tubo que contiene Agar nutritivo. Luego se procedió a incubar por 24 horas a 37°C para ser conservada en refrigeración de 4-8°C.

### **3.4.2. Ensayos de la Actividad Antimicrobiana.**

Todos los ensayos que se describen a continuación serán realizados por duplicado.

#### **3.4.2.1. Método de Difusión en Agar - Método de Kirby Bauer (Figura N° 04).**

##### **◆ Técnica operatoria:**

Se utilizó y preparó el medio de cultivo Mueller-Hinton, por ser de gran reproductibilidad.

Luego se procedió a preparar el inóculo según el estándar de la escala Mc Farland.

Se vertió en las placas el medio de cultivo con un espesor de 4mm.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido.

Luego se procedió a colocar los discos con el antibiótico (control positivo) y el extracto acuoso liofilizado a una concentración de 400, 200, 100 y 50 mg/ml, sobre la superficie de la placa con el agar de forma manual con ayuda de una pinza estéril, se presionó ligeramente los discos con el agar para asegurar el contacto uniforme.

Una vez colocados los discos se dispuso las placas en la estufa de cultivo y se dejó allí por 24 horas a una temperatura de 35° C.

Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa y se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

En los casos de *Escherichia coli* el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia.

El porcentaje de inhibición se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra}}{\text{Diámetro del control}} \times 100$$

CUADRO 5 – CLASIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SEGÚN EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	< 55%
Poco activo	55 – 65 %
Moderadamente activo	66 – 80 %
Buena actividad	> 80 %

Fuente: Carvalho Xavier, 2002.

Se seleccionó la muestra positiva (halo mayor a 16 mm de diámetro), para someterla a la prueba de dilución en caldo y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

#### **3.4.2.2. Método de Dilución en Caldo - Método de Macro Dilución (Figura N° 05).**

##### **❖ Técnica operatoria:**

Se añadió 0.5ml de Caldo Mueller Hinton desde el tubo N° 2 al N° 12.

Se añadió 0.5 ml del extracto hidroalcohólico liofilizado (400mg/ml) al tubo N° 1 y N° 2 y transferir 0.5 ml del tubo N° 2 al tubo N° 3.

Se mezcló el tubo N° 3 y se transfirió 0.5 ml de este tubo al tubo N° 4. Se continuó con el mismo procedimiento hasta el tubo N° 10.

Se descartó 0.5 ml de la dilución del tubo N° 10.

Se colocó 0.5 ml del inóculo desde el tubo N° 1 al N° 11.

Los tubos se incubaron a 35° C durante 24 horas.

Tras la incubación se procedió a la lectura e interpretación de los resultados, la cual se determinó a simple vista, por falta de turbidez del caldo, para ello se comparó cada tubo con el tubo de control de crecimiento.

CUADRO 6 – CLASIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SEGÚN LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	CONCENTRACIÓN
Inactivo	>1000mg/ml
Poco activo	500-1000mg/ml
Moderadamente activo	100-500mg/ml
Buena actividad	< 100mg/ml

FUENTE: HOLETZ et al., 2002.

### 3.4.2.3. Preparación del estándar (0,5 mc Farland) para el inóculo.

Para estandarizar la densidad del inóculo se uso una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mc Farland) como estándar.

#### 3.4.2.3.1. Preparación del estándar de turbidez:

- ◆ Sé agregó 0,5 ml de una solución de  $BaCl_2$  0,048 M ( $BaCl_2 \cdot H_2O$  al 1,175% P/V) a 99,5 ml de una solución de  $H_2SO_4$  0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.
- ◆ Se verificó la densidad óptica correcta del estándar usando un fotocolorímetro ó espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.

- ◆ Se distribuyo de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca o tapón de jebes, similares a los que se usaron para preparar el inóculo.
- ◆ Se ajusto bien las tapas o tapones y conservaron en la oscuridad a temperatura ambiente y se anotó la fecha de preparación.
- ◆ Antes de ser usado se agitó vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.
- ◆ Se verificó mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y se reemplazó cuando sea necesario.

### 3.4.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto Hidroalcohólico, el cual presenta actividad en los ensayos antimicrobianos. En el anexo 08 y 09 se muestra, en resumen, los ensayos realizados para el extracto. A continuación se detalla cada uno de los ensayos fitoquímicos para la identificación de los metabolitos secundarios.

⊕ **Identificación de Alcaloides: Ensayo de Dragendorff**

La fracción disuelta en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% en ausencia de solvente orgánico, se mezcló con 1 gota de reactivo, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) de color rojo ladrillo.

⊕ **Identificación de aldehídos: Ensayo de Fehling**

El residuo se disolvió en 1-2 ml de agua, en caso que la fracción no sea acuosa, se adicionó 2 ml del reactivo, se calentó la mezcla en baño de agua durante 10-30 min. El ensayo se consideró positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

⊕ **Identificación de glicósidos: Ensayo de Molish**

2 ml del extracto se mezcló en un tubo de ensayo y se le añadió 3 gotas de solución o-naftol al 5% en etanol. Se mezcló y por la pared del tubo se adicionó 1mL de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de anillo violáceo en la interfase indica reacción positiva.

⊕ **Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda**

A 5 ml de la fracción ácida se le adicionó 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y una alícuota de magnesio metálico o zinc. Cuando la reacción termina, se añadió 1 ml de alcohol amílico y se agita.

El ensayo se consideró positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, anaranjado, carmelita o rojo intensos en todos los casos.

⊕ **Identificación de fenoles y taninos: Ensayo de Cloruro Férrico**

A la fracción disuelta en 1 ml de etanol, se le añadió 0.5 ml de una solución de Cloruro Férrico al 5% en solución salina. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indicó la presencia de fenoles y/o taninos. En el extracto acuoso se adiciona acetato de sodio previo al ensayo.

### **3.4. PLAN DE ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS**

Se calculó la media y la desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, que son presentados mediante tablas y gráficos. Los resultados se evaluaron mediante el método de Análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS v 15.0 y las diferencias entre medidas fueron analizadas mediante el test de comparaciones. Valor  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

Se calculó el porcentaje de inhibición de los extractos acuosos e hidroalcohólicos, en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de Disco Difusión, estos valores son presentados en tablas y gráficos.

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas de los extractos acuosos e hidroalcohólicos, son presentadas en tablas y gráficos que facilitan su visualización y clasificadas de acuerdo a las especificaciones del cuadro 6.

### **3.6. CRITERIOS DE BIOSEGURIDAD**

---

Se aplicaron las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N° 18-INS), aplicable al personal, uso y desecho de sustancias y materiales, acceso a los locales, y el medio ambiente. Las bacterias mencionadas en el presente trabajo corresponden trabajarlas a un nivel de bioseguridad 2. (INS, 2002).

Las principales medidas de bioseguridad incluyen:

- ◆ Ingreso restringido al laboratorio.
- ◆ Utilizar siempre guardapolvo o mandilones de laboratorio en la zona de trabajo.
- ◆ No pipetear con la boca.
- ◆ En caso de tener cabello largo, recogerlo y cubrirlo.
- ◆ Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
- ◆ Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).
- ◆ El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
- ◆ Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas por el operador antes y después de cada actividad.
- ◆ Los reactivos deben estar etiquetados y almacenados en viales adecuados con tapa rosca.
- ◆ Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de eliminarlos en solución desinfectante o ser autoclavados a 121°C durante 20 minutos, o incinerarse.
- ◆ Limpiar a diario los pisos con un trapeador limpio y solución desinfectante.

## ***CAPITULO IV***

#### **4.1. RESULTADOS.**

---

Los resultados se organizaron para su presentación de acuerdo a los objetivos planteados según el siguiente orden:

- a) Análisis descriptivo de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizados de *Psidium guajava L.* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de Difusión en agar.
- b) Análisis descriptivo de la Concentración Mínima Inhibitoria al crecimiento microbiano de los extractos acuosos e hidroalcohólicos liofilizados de *Psidium guajava L.* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de Macro dilución en Caldo.
- c) Descripción cualitativa de las características vegetales de la especie *Psidium guajava L.*
- d) Descripción cualitativa de los datos etnofarmacológicos de la especie *Psidium guajava L.*
- e) Descripción cualitativa del Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso e hidroalcohólico liofilizados *Psidium guajava L.*
- f) Análisis descriptivo e inferencial de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, para la prueba de hipótesis sobre actividad antimicrobiana en los extractos acuosos e hidroalcohólicos liofilizados de la yema foliar de *Psidium guajava L.*, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS E HIDROALCOHÓLICOS LIOFILIZADOS DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, A DIFERENTES TIPOS DE CONCENTRACIONES**

**TABLA N° 01**

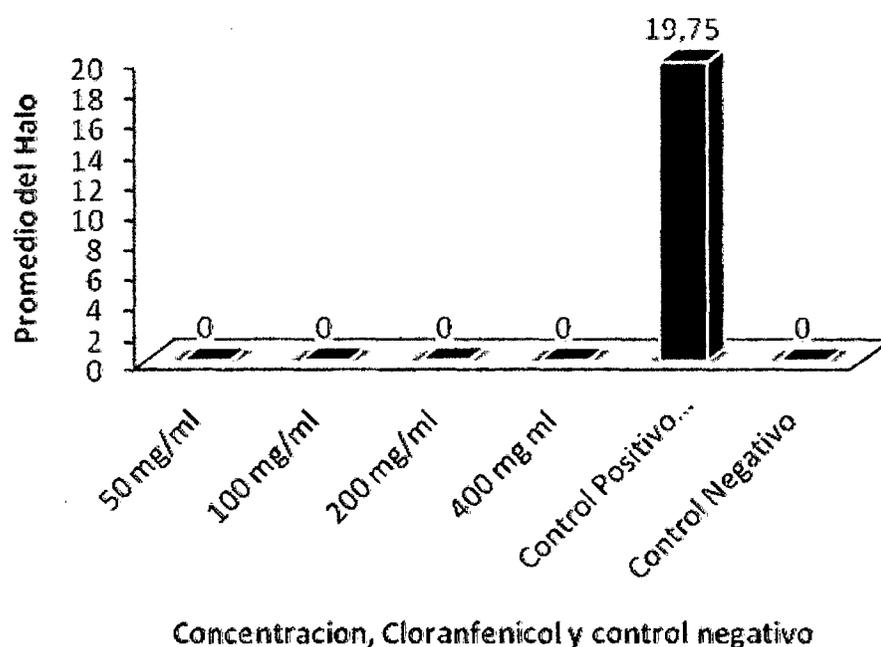
Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Acuoso liofilizado de *Psidium guajava* L. Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)

Tratamientos (Concentracion de la Muestra)	Promedio del halo de inhibición
50 mg/ml	-
100 mg/ml	-
200 mg/ml	-
400 mg ml	-
Control Positivo (Cloranfenicol)	19.75
Control Negativo (DMSO 0.5%)	-

(-) Ausencia de halo de inhibición; *Valor promedio de dos réplicas.*

## GRAFICO N° 01

Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Acuoso liofilizado de *Psidium guajava* L. Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresados en mm)



a) Los promedios de diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L. por el método de Disco Difusión en agar se detallan en la Tabla y Gráfico 01 en el que se aprecia lo siguiente:

- ◆ Los diámetros de los halos de inhibición promedios del Extracto acuoso liofilizado de *Psidium guajava* L., sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 0.00, mientras que con el antibiótico Cloranfenicol como control positivo fue de  $19.75 \pm 1.0$  mm.

TABLA N° 02

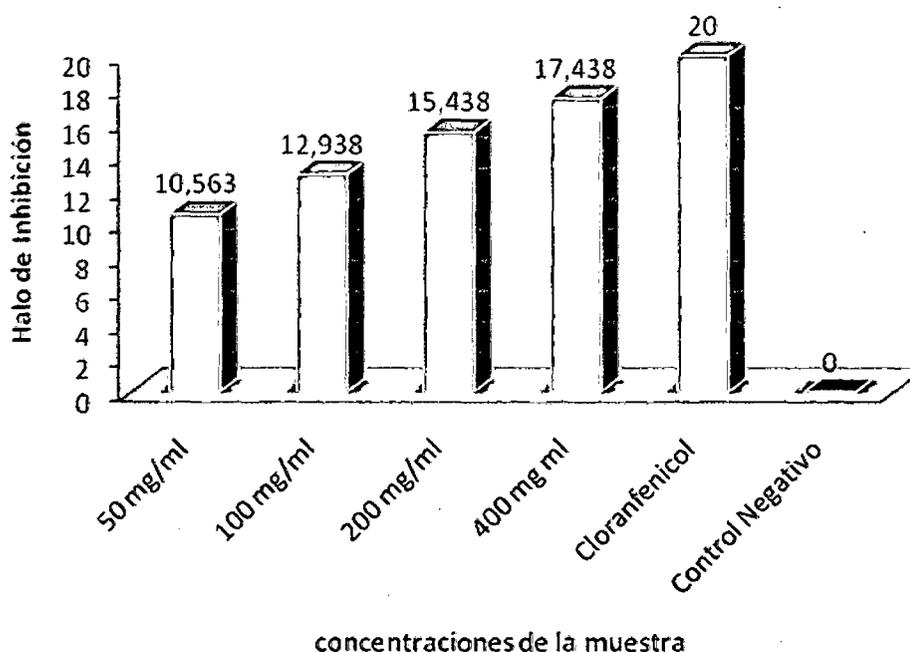
Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Hidro alcohólico liofilizado de *Psidium guajava L.* Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresadas en mm)

Tratamientos (Concentracion de la Muestra)	Promedio del halo de inhibición
50 mg/ml	10,563 ± 1.2 mm
100 mg/ml	12,938 ± 1.0 mm
200 mg/ml	15,438 ± 1.1 mm
400 mg ml	17,438 ± 1.3 mm
Control Positivo (Cloranfenicol)	20 ± 0.0 mm
Control Negativo (DMSO 0.5%)	-

(-) Ausencia de halo de inhibición; Valor promedio de dos réplicas.

GRAFICO N° 02

Promedio de Diámetros del halo de Inhibición del extracto Hidroalcohólico liofilizado de *Psidium guajava* L. Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresados en mm)



b) Los promedios de diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano *in vitro* del extracto hidroalcohólicos liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L. por el método de Disco Difusión en agar se detallan en la Tabla y Gráfico 02 en el que se observa lo siguiente:

- ◆ El diámetro promedio del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Psidium guajava* a 50 mg/ml contra *Escherichia coli* fue de  $10.563 \pm 1.2$  mm, promedio de inhibición muy inferior al del antibiótico Cloranfenicol que fue el control positivo, el cual muestra un diámetro de inhibición de  $20.00 \pm 0.0$  mm.

- 
- ◆ El promedio de diámetro del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a 100 mg/ml frente a *Escherichia coli* fue de  $12.938 \pm 1.0$  mm, un promedio superior con respecto al extracto de 50 mg/ml que fue de  $10.563 \pm 1.2$  mm, e inferior al antibiótico control que fue de  $20.00 \pm 0.0$  mm.
  
  - ◆ El promedio de diámetro del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a 200 mg/ml frente a *Escherichia coli* fue de  $15.438 \pm 1.1$  mm, promedio superior con respecto a los extractos de 50 y 100 mg/ml cuyo halo de inhibición oscila entre  $10.563 \pm 1.2$  mm y  $12.938 \pm 1.0$  mm, pero inferior al halo de inhibición del Cloranfenicol que fue de  $20.00 \pm 0.0$  mm.
  
  - ◆ El promedio del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L. sobre *Escherichia coli*, presenta el mayor diámetro en el extracto de 400 mg/ml con  $17.438 \pm 1.3$  mm, promedio muy superior con respecto a los extractos de 50, 100 y 200 mg/ml, cuyo halo oscila entre  $10.563 \pm 1.2$  mm y  $15.438 \pm 1.1$  mm; por otro lado este extracto tiene una leve inferioridad con respecto al control positivo, cuyo halo fue de  $20.00 \pm 0.0$  mm.

TABLA N° 03

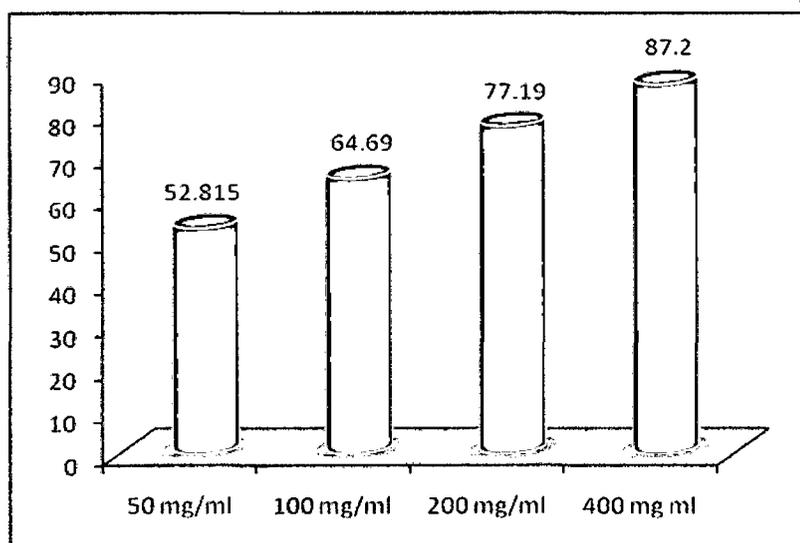
Porcentaje de Inhibición del extracto Hidro alcohólico liofilizado de *Psidium guajava L.* Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresados en %)

Tratamientos (Concentracion de la Muestra)	Porcentaje del halo de inhibición
50 mg/ml	52,815
100 mg/ml	64,690
200 mg/ml	77,190
400 mg ml	87,200

(-) Ausencia de halo de inhibición; *Valor promedio de tres réplicas.*

GRAFICO N° 03

Porcentaje de Inhibición del extracto Hidro alcohólico liofilizado de *Psidium guajava L.* Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (Expresados en %)



**c) Los porcentajes de inhibición del extracto hidroalcohólico liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava* L. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 se detallan en la Tabla y Gráfico 03 donde se observa lo siguiente:**

- ◆ El porcentaje del diámetro promedio del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a 50 mg/ml contra *Escherichia coli* fue de 52.815%, porcentaje de inhibición muy inferior tomando como referencia al antibiótico Cloranfenicol que fue el control positivo, al cual se le asignó un porcentaje de inhibición del 100%.
- ◆ Se encontró poca actividad antimicrobiana en el extracto hidroalcohólico de 100 mg/ml, cuyo porcentaje fue de 64.69%; porcentaje superior con respecto al extracto de 50 mg/ml que fue de 52.815%, pero inferior al 100%, que representa el grupo control positivo.
- ◆ El porcentaje del diámetro promedio del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a 200 mg/ml frente a *Escherichia coli* fue de 77.19%, porcentaje que representa una moderada actividad antimicrobiana, el cual es superior a las concentraciones de los extractos de 50 y 100 mg/ml cuyo porcentaje de inhibición oscila entre 52.815 y 64.69%, pero representa una marcada inferioridad con respecto al grupo control positivo, que representa el 100% de las pruebas.
- ◆ El extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L. que presentó mayor actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, fue el de 400 mg/ml cuyo porcentaje de inhibición fue de 87.2%, porcentaje muy superior con respecto a los extractos de 50, 100 y 200 mg/ml, cuyo halo oscila entre 52.5815 y 77.19%; por otro lado la tabla y el gráfico nos muestra gran actividad del extracto a esta concentración con respecto al control positivo, por el gran acercamiento y similitud al 100%, que representa la actividad máxima de la prueba.

- d) La clasificación de la Actividad Antimicrobiana de los extractos acuosos e hidroalcohólicos liofilizados de la yema foliar de *Psidium guajava* L. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a partir del porcentaje de inhibición, se detalla en los cuadros 7 y 8.

**CUADRO 7** – Clasificación de la Actividad Antimicrobiana del extracto Acuoso de *Psidium guajava* L., a partir del porcentaje de inhibición.

Tratamientos (Concentracion de la Muestra)	Promedio del halo de inhibición
50 mg/ml	Inactivo
100 mg/ml	Inactivo
200 mg/ml	Inactivo
400 mg ml	Inactivo

**CUADRO 8** – Clasificación de la Actividad Antimicrobiana del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Psidium guajava* L., a partir del porcentaje de inhibición.

Tratamientos (Concentracion de la Muestra)	Promedio del halo de inhibición
50 mg/ml	Inactivo
100 mg/ml	Poco activo
200 mg/ml	Moderadamente Activo
400 mg ml	Activo

**ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA  
INHIBITORIA DEL EXTRACTO ACUOSO E HIDROALCOHÓLICO  
LIOFILIZADO DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L. POR EL  
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.**

**CUADRO 9 – Concentración Mínima Inhibitoria del extracto Hidroalcohólico de  
*Psidium guajava* L.**

Microorganismo	Tubos	Concentración (mg/ml)	Turbidez	Actividad
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	100	--	Activo
	2	50	--	Activo
	3	25	--	Activo
	4	12.5	--	Activo
	5	6.25	--	Activo
	6	3.125	-	Activo
	7	1.5625	++	Inactivo
	8	0.78125	+++	Inactivo
	C	200	--	Activo

**DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DE LAS CARACTERÍSTICAS VEGETALES  
DE *Psidium guajava* L.**

**CUADRO 10** –Características vegetales de *Psidium guajava* L.

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b>Hábitat:</b>	Bosque secundario
<b>Estadio Productivo</b>	Fértil
<b>Posición de Hojas</b>	Opuestas
<b>Presencia de Órganos Accesorios en Hojas</b>	Pelos
<b>Forma del Tallo</b>	Cilíndrico
<b>Órganos Accesorios en Tallo</b>	-
<b>Características de la Corteza</b>	Con Ritidomas
<b>Látex</b>	-
<b>Color de Látex</b>	-
<b>Tipo de Inflorescencia</b>	Solitaria
<b>Posición de Inflorescencia</b>	Axilar
<b>Tipo de Flor por Sexo</b>	Hermafrodita
<b>Nº de Pétalos</b>	5
<b>Unión de Sépalos</b>	Unidos a la base
<b>N de Estambres</b>	Numerosos
<b>Posición de Estambres</b>	Alternos
<b>Posición de Ovarios</b>	Ífero
<b>Nº de Cárpeles</b>	2 – 4
<b>Tipo de Fruto</b>	Baya
<b>Consistencia</b>	Carnosa
<b>Dehiscencia</b>	-

**DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DE LOS DATOS ETNOFARMACOLOGICOS  
DE *Psidium guajava* L.**

**CUADRO 11** –Datos etnofarmacológicos de *Psidium guajava* L.

<b>PARTE UTILIZADA</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>FORMA DE PREPARACION</b>	<b>USO MEDICINAL</b>
<b>Hoja</b>	10 a 20 hojas	Cocción	Antidiarreico, astringente
<b>Flor</b>	5 a 10 flores	Cocción	Regulador menstrual
<b>Fruto</b>	2 a 3 frutos	Cocción	Astringente, febrífugo, antiinflamatorio
<b>Raíz</b>	5 a 10 gramos	Cocción	Leucorrea, antidiabético, astringente
<b>Corteza</b>	5 a 10 gramos	Cocción	Antiséptico, antimicrobiano, antiasmático
<b>Semilla</b>	2 a 5 gramos	Cocción	antidiabético

Fuente: RODRIGUEZ LE et al (1997)

De las diferencias de actividad antimicrobiana a través de los pares de promedios de diámetros del halo de inhibición de crecimiento en el extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones medidas frente a *Escherichia coli* que se muestran en la tabla 05 se tiene lo siguiente: se encontró alta actividad antimicrobiana en el tratamiento de 400 mg/ml. con una diferencia significativa con respecto a los extractos de 200, 100 y 50 mg/ml respectivamente, esto se puede apreciar en forma objetiva en el gráfico 04.

TABLA 05

Significancia de las comparaciones de pares de promedios de diámetros del halo de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L. frente a *Escherichia coli*

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de Medias (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Lim. Inferior	Lim. Superior
50 mg/ml	100 mg/ml	-2,38*	,356	,000	-3,32	-1,43
	200 mg/ml	-4,88*	,356	,000	-5,82	-3,93
	400 mg/ml	-6,88*	,356	,000	-7,82	-5,93
100 mg/ml	200 mg/ml	-2,50*	,356	,000	-3,44	-1,56
	400 mg/ml	-4,50*	,356	,000	-5,44	-3,56
	50 mg/ml	2,38*	,356	,000	1,43	3,32
200 mg/ml	100 mg/ml	2,50*	,356	,000	1,56	3,44
	400 mg/ml	-2,00*	,356	,000	-2,94	-1,06
	50 mg/ml	4,88*	,356	,000	3,93	5,82
400 mg/ml	50 mg/ml	6,88*	,356	,000	5,93	7,82
	100 mg/ml	4,50*	,356	,000	3,56	5,44
	200 mg/ml	2,00*	,356	,000	1,06	2,94

Basada en la observación de las medias

The error term is Mean Square (Error) = 1.013.

\*. La Diferencia de las medias es significativa en el nivel  $p \geq 0.05$

La Tabla 04 nos muestra el análisis de varianza de los promedios de diámetros del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava L* en *Escherichia coli.*, del que se aprecia que existe diferencias significativas entre los diámetros del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, antibiótico control positivo y el control negativo, con valores de  $p \ll 0,000$ . Dado las diferencias altamente significativas, se procedió a realizar las pruebas de comparaciones múltiples que a continuación se detallan.

**PRUEBA DE COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE DIÁMETROS DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSO E HIDROALCOHÓLICO DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L.; FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922.**

En la contrastación de la hipótesis sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos acuosos e hidroalcohólicos *Psidium guajava* L.; frente a *Escherichia coli*, se utilizó el Método del Análisis de Varianza (ANVA) y la comparación de pares de promedios si la prueba resultase significativa, con la finalidad de ver cuales pares de promedios de diámetros de halo de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones son diferentes.

**TABLA N° 04**

Análisis de varianza de los promedios de diámetro del halo de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L.; en *Escherichia coli*.

Fuente de Variación	gl	Sc	CM	Fisher	Sig.
Inter-grupos	3	428,69	142,90	690,50	0.000
Intra-grupos	15	51,44	3,43		
Error	45	9,31	0,21		
Total	63	489,44			

FUENTE: Programa estadístico SPSS v 15.

**DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL  
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO LIOFILIZADO DE LA YEMA FOLIAR DE  
*Psidium guajava L.***

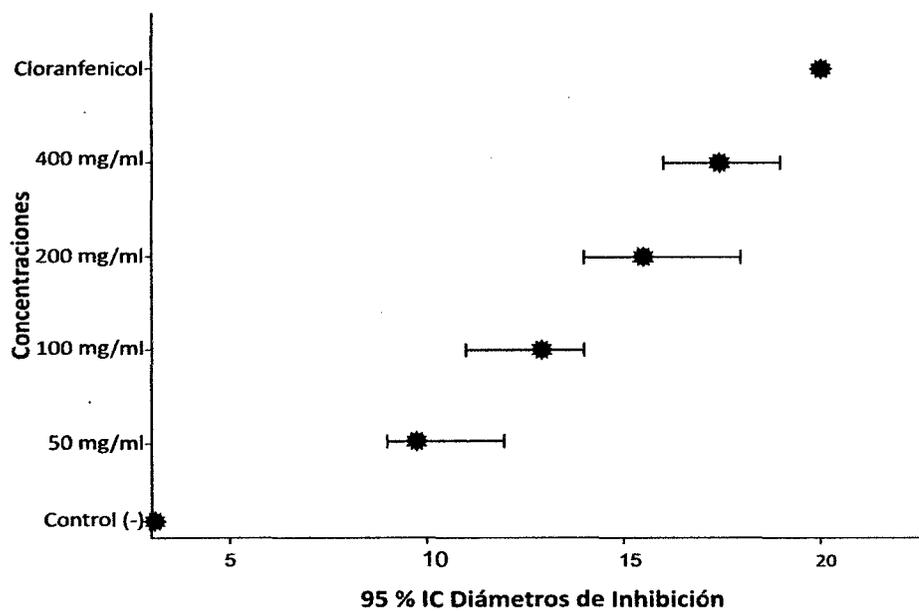
**CUADRO 12 – Tamizaje Fitoquímico del extracto Hidroalcohólico de la yema foliar de  
*Psidium guajava L.***

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	
Alcaloides	Dragendorff	++
Aldehidos	Fehling	+
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico	+++
Flavonoides	Shinoda ácido	+++
Glicósidos cardiotónicos	Molish	+

Donde: (+++) = Abundante; (++) = Moderado; (+) = Leve

## GRÁFICO 04

COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LOS DIÁMETROS DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Psidium guajava L*, CLORANFENICOL Y DMSO EN *Escherichia coli* ATCC 25922



## **4.2. DISCUSIÓN.**

---

Las propiedades antimicrobianas a partir de productos vegetales han sido comprobadas a través de intensas investigaciones en todo el mundo; Generalmente, son evaluadas y confirmadas a través de ensayos biológicos *in vitro* por medio de pruebas de sensibilidad con métodos de difusión o de dilución, como fue realizado en el presente trabajo; lo mismo que reportan en sus estudios Fisher y Phillips en el año 2006 en los cuales señalaron que actualmente para la evaluación antimicrobiana *in vitro* son utilizados los métodos de difusión en disco y de macrodilución en medio líquido, y que los parámetros que deben tenerse en cuenta para que los resultados aportados sean comparables deben ser: concentración de inóculo inicial del microorganismo, medio de cultivo, condiciones de incubación y concentración del producto ensayado.

Evaluando los resultado de la actividad antimicrobiana, por el método de difusión en Agar de los extractos de *Psidium guajava* L. frente a la cepa de referencia *Escherichia coli*, podemos señalar que las cuatro concentraciones estudiadas del extracto acuoso no presentaron actividad antimicrobiana, en tanto que el extracto hidroalcohólico presentó actividad antibacteriana en las concentraciones de 200 y 400 mg/ml, debido a que poseen mayor concentración de metabolitos secundarios como flavonoides, glicósidos cardiotónicos, fenoles y taninos tal como reportan Sánchez et al. (2005) y Belemtougri et al (2006), en sus trabajos de Tamizaje Fitoquímico en el que demuestran la ausencia de flavonoides y taninos en el extracto acuoso y la presencia de los mismos en el extracto hidroalcohólico, a las cuales les atribuyen como la responsable de la actividad antimicrobiana de las plantas.

Sin embargo al comparar la actividad del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L con el Cloranfenicol, se observó que existían diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre sus actividades, siendo el Cloranfenicol el que posee mayor capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, al inhibir la síntesis de proteínas

En general, el mayor promedio de diámetro del halo de inhibición fue observado en la concentración de 400mg/ml con valor de  $17,438 \pm 1.3$  mm frente a *Escherichia coli*, mientras que el diámetro del halo de inhibición más bajo se obtuvo a la concentración de 50mg/ml con valor de  $10.563 \pm 1.2$ mm. Estos resultados se asemejan con los aportados por *Vieira et al* (2001), quienes utilizaron extractos etanólicos al 50% a concentración de 300 mg/ml, y obtuvieron halo de inhibición de 18 mm para *Escherichia coli*, estas variaciones entre los resultados de ambos trabajos pueden ser explicadas por varios factores como la concentración del extracto, época y período de recolección de la planta. Se obtuvieron resultados similares en estudios realizados por *GONÇALVES et al.* (2008) quienes además mostraron la presencia de compuestos terpenoides y fenólicos (taninos y flavonoides) en los extractos hidroalcohólicos.

Podemos decir, que el extracto hidroalcohólico presentó mayor actividad antimicrobiana, en comparación con el extracto acuoso, por contener otros grupos de sustancias como trazas de alcaloides, glicósidos cardiotónicos y un abundante contenido de saponinas, además de los flavonoides y taninos las cuales no se encuentran presentes en los extractos acuosos. Esto se debe a que la mayor parte de los componentes de las plantas con actividad contra microorganismos son compuestos orgánicos aromáticos o saturados, quienes muchas veces son obtenidos a través de una extracción inicial con etanol o metanol (*Belemtougri et al* 2006).

Finalmente de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos indicar que el extracto acuoso liofilizado de *Psidium guajava L.* fue inactiva frente a la cepa *Escherichia coli*; y el extracto hidroalcohólico liofilizado de la planta en estudio presentó actividad antimicrobiana la cual va de acuerdo a la concentración. Este resultado nos permite confirmar otros resultados obtenidos por *Oranday* (2000), quien en su ensayo demostró la actividad de *Psidium guajava* frente este microorganismo en medio etanólico.

### **4.3. CONCLUSIÓN.**

---

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación se abordan de acuerdo a los objetivos que nos permiten concluir lo siguiente:

1. El extracto acuoso liofilizado de la yema foliar de *Psidium guajava L.* frente a *Escherichia coli*, no presentó actividad antimicrobiana mediante el método de Difusión en Agar en discos de sensibilidad a diferentes concentraciones.
2. En el extracto hidroalcohólico liofilizado a la concentración de 400mg/ml de la yema foliar de *Psidium guajava L.*, presentó una alta actividad antimicrobiana; con los extractos de 200 y 100 mg/ml la actividad antimicrobiana fue moderado a poco activo respectivamente y mientras que a la concentración de 50 mg/ml fue inactivo.
3. En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Extracto hidroalcohólico de la Yema foliar de *Psidium guajava L.* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, por el método de macrodilución, se determinó que la CMI fue de 3.125 mg/ml.
4. En la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico frente a *Escherichia coli* se encontraron diferencias altamente significativas de los promedios de diámetros del halo de inhibición entre las diferentes concentraciones evaluadas con respecto al control positivo y mucha significancia entre la concentración de 400 mg/ml con respecto a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/ml respectivamente.

#### **4.4. RECOMENDACIONES.**

---

- ◆ Continuar el trabajo de investigación, en especial con el extracto hidroalcohólico, por presentar actividad antimicrobiana, y realizar estudios fitoquímicos más precisos hasta obtener el (los) metabolito(s) responsable de la actividad antimicrobiana.
- ◆ Ampliar la investigación con la parte del extracto acuoso para estudios posteriores sobre otros microorganismos, especialmente bacterias gram positivas, porque hay algunos estudios que relatan la actividad sobre estos tipos de microorganismos.
- ◆ Realizar trabajos de investigación en el área de toxicología, para determinar la existencia de sustancias tóxicas para posteriores ensayos pre-clínico y clínico, para luego determinar si se puede obtener presentaciones farmacéuticas de dicha planta.
- ◆ Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánico con otras plantas de nuestra región, en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en general.

## **4.5. BIBLIOGRAFÍA.**

---

1. Park K. Park's Textbook of Preventive and Social Medicine 2000; Banarsidas Bharat Publishers Jabalpur.
2. ROBLES C. (2007). Guía de promoción y prevención de enfermedades diarreicas en la atención farmacéutica, Lima-Perú
3. Boletín Epidemiológico (Lima), Vol. 17 (03), 2008. Semana epidemiológica (SE) del 13 al 19 de Enero.
4. Dirección Regional de Salud Loreto. 2008 - Oficina de Estadística e Informática.
5. CÁCERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L. (1993) - Plants used in Guatemala for treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. J. Ethnopharm., 38: 31-38
6. FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. (1996) - Microbiologia dos alimentos. São Paulo, Atheneu, p. 44-53.
7. RAMÍREZ P. (2008) Indicadores semanales de enfermedades diarreicas agudas. Boletín Epidemiológico (Lima), Vol. 16 (02).
8. UDAYAKUMAR R, VELMURUGAN K, SIVANESAN D, RAGHU RK. (1990-1994.) Phytochemical and antimicrobial studies of extracts of *Solanum xanthocarpum*. Ancient sci life 2003; 23:
9. CABIESES M. (1999) Apuntes de medicina tradicional. Segunda edición. Lima, Perú: Editorial CONCYTEC.

10. MEJIA K, RENGIFO E. (2000). Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Segunda Edición. AECI - GRL - IIAP. Pag 7 - 8.
11. VIEIRA, L. (1992). Fitoterapia da Amazonas. Manual das Plantas Medicinals. Sao Paulo: Editora Agronómica Ceres. Pag 15 - 20.
12. ROIG JT. (1998) Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica. La Habana: Editorial Científico-Técnica:485-7.
13. ROBINEAU L. (1993) Hacia una farmacopea caribeña. Seminario Tramil 5 y 6 Santo Domingo: Enda-Caribe y CONAPLAMED
14. ROBLES C. (2007). Guia de promoción y prevención de enfermedades diarreicas en la atención farmacéutica. Rev de prevención y promoción de la salud (seriada en linea). 21(1):6-8.
15. PALACIOS V. (1997) Plantas Medicinales nativas del Perú II. Lima, Perú: Segunda Edición, Editorial CONCYTEC.
16. RENGIFO R. (2000) Plantas Medicinales de uso popular en la amazonia peruana. Iquitos, Perú: Editorial IIAP.
17. CÁCERES A, FIGUEROA L, TARACENA AM, SAMAYOA B. (2003). Plants used in Guatemala for the treatment of Acute diarrheal and respiratory diseases. 2: evaluation of 16 plants against Gram positive and negative bacteria. J Ethnopharmacol; 39:77-82.
18. GONZÁLEZ J., CALVO A. (2008). *Despertar de la era antibiótica. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.;25:50-65*

19. RAMOS M. (1997) Guías Para el uso de Antimicrobianos: Servicio De Infectología, Hospital Hipólito Unanue: Lima – Perú
20. MISTCHER, L.A.; DRAKES S.; GOLLAPUDI, S.R. E OKUNTE, K. (1987) A modern look at folkloric use of antiinfective agents. J. Nat. Proa., v. 50, p. 1025 – 40
21. AMORRIM , E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINIO, J.S.; SILVA, L.R.S.; ALBURQUEQUE U.P. (2003). Fitoterapia: instrumento para una mejor calidad de vida. Infarma, v. 15, n. 1-3, p.66-69.
22. YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. (2001) Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. Quim. Nova. V.24, n.1, p. 147.
23. ARELLANO, P. (1998) El libro verde. Guía de recursos terapéuticos vegetales. Lima- Perú. INMETRA.
24. ZELEDON, R; WAN FUH J. 2004. Descripción y cultivo de la guayaba, Cañas, Guanacaste, Costa Rica.
25. MEJÍA, K. Y RENGIFO, E. (2000). Plantas medicinales de uso popular en la amazonía peruana. 2ª Ed. Tarea Asociación Gráfica Educativa. Lima.
26. CÁCERES, A. (1999) Plantas de uso medicinal en Guatemala. Colección monografías Volumen N° 1. Editorial universitaria. Guatemala.
27. DI STASI L, GUIMARÃES S., MOREIRA D. S., Y AKIKO H. (1999) “ Estudio das Plantas Medicinaias na Amazõnia”, São Paulo, Brasil

28. MARTÍNEZ M., MOLINA N. Y BOUCOURT E. (1998), Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (GUAYABA).
29. TORRES A, M. Y LÓPEZ B. (1998), Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava* L. contra *Proteus mirabilis*, *Shigella disenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*..
30. MORÓN R.; RAMOS R. Y VIZOSO P. (1999), Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral.
31. ORANDAY C. (2000), Actividad Antimicrobiana y Citotoxicidad de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Psidium guajava*.
32. BETANCOURT B., RAMOS R., VIZOSO P., MARTÍNEZ G., LÓPEZ B. (2002). Ausencia de actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guayaba). Evaluada en un sistema de ensayo en *Aspergillus nidulans*.
33. MARTÍNEZ M.; MOLINA N. Y BOUCOURT E. (2001), Estudio Toxicológico Preclínico de *Psidium guajava* L. (GUAYABA)
34. REGINE H., SILVA D. F., VIEIRA (1), D. D. P. RODRIGUES (2), F. A. GONÇALVES (1), F. G. R. MENEZES (1), J. S. ARAGÃO (1) & O. V. SOUSA (1). (2001) Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*psidium guajava* linn. and *carica papaya* linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. rev. inst. med. trop. s. paulo vol.43 no.3 são paulo may/june.

- 
28. MARTÍNEZ M., MOLINA N. Y BOUCOURT E. (1998), Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Psidium guajava* L. (GUAYABA).
29. TORRES A, M. Y LÓPEZ B. (1998), Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava* L. contra *Proteus mirabilis*, *Shigella disenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*.
30. MORÓN R.; RAMOS R. Y VIZOSO P. (1999), Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral.
31. ORANDAY C. (2000), Actividad Antimicrobiana y Citotoxicidad de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Psidium guajava*.
32. BETANCOURT B., RAMOS R., VIZOSO P., MARTÍNEZ G., LÓPEZ B. (2002). Ausencia de actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guayaba). Evaluada en un sistema de ensayo en *Aspergillus nidulans*.
33. MARTÍNEZ M.; MOLINA N. Y BOUCOURT E. (2001), Estudio Toxicológico Preclínico de *Psidium guajava* L. (GUAYABA)
34. REGINE H., SILVA D. F., VIEIRA (1), D. D. P. RODRIGUES (2), F. A. GONÇALVES (1), F. G. R. MENEZES (1), J. S. ARAGÃO (1) & O. V. SOUSA (1). (2001) Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*psidium guajava* linn. and *carica papaya* linn.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. rev. inst. med. trop. s. paulo vol.43 no.3 são paulo may/june.

- 
35. CARVALHO X. (2002), Atividade Antimicrobiana *in vitro* de Extratos Hidroalcohólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram Negativas.
36. S. I. ABDELRAHIM, A. Z. ALMAGBOUL \*, M.E.A. OMER , A. ELEGAMI. (2002) Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* 73 . 713–715.
37. G. COELHO DE SOUZA, A.P.S. HAAS, G.L. VON POSER, E.E.S. SCHAPOVAL, E. ELISABETSKY. (2004) Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 90 (135–143. )
38. NEVITON R. S., D. GARCIA , M. S. SCHIAVINI, C. V. NAKAMURA, B. PRADO DÍAZ FILHO (2005). An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.) Vol.48, n. 3 : pp. 429-436, May.
39. SALGADO, H.R.N; RONCARI, A.F; MICHELIN, D.C. (2006). Evaluation of antidiarrhoeal effects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) aqueous leaf extract in mice. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 27, n.1, p.89-92.
40. A. GONÇALVES <sup>I</sup>, FLÁVIA; ANDRADE NETO, MANOEL <sup>II</sup>; BEZERRA NS JOSÉ <sup>II</sup>; ANDREW MACRAE<sup>III</sup>. (2008) Avaliação da atividade antibacteriana de extrato de folhas de goiabeira, *Psidium guajava* Linnaeus, sobre bactérias entéricas diarreio gênicas, isoladas de Camarão sete-Barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Rev Inst. Med. trop. S. Paulo* V.50 n.1 São Paulo Enero / fev.

41. ODUNBAKU, O.A AND ILUSANYA O.A. (2008) Antibacterial Activity of the Ethanolic and Methanolic Leaf Extracts of Some Tropical Plants on Some Human Pathogenic Microbes. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5): 373-376.
42. NWINYI OBINNA C., CHINEDU NWODO S. AND AJANI OLAYINKA O. (2008) Evaluation of antibacterial activity of *Pisidium guajava* and *Gongronema Latifolium*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(8), pp. 189-192, August.
43. KNUTTON S, LLOYD DR, MC NEISH AS. (1997) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun*; 55:69-77.
44. BROOKS GF, BUTEL JN, ORNSTON NL, JAWETZ E. MELNICK J. ADELBERG E. (1999) *Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno. S.A. de C.V. México D.F.*
45. GIRÓN JA, HO ASY, SCHOOLNIK GK. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*; 254:710-713.
46. DONNENBERG MS, GIRÓN JA, KAPER JB (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol*; 6:3427-3437.
47. NATARO JP, KAPER J (2008). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*;11:142-201.
48. CASSELS FJ, WOLF MK. (2003) Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol*; 15:214-226.

- 
49. SEARS CL, KAPPER JB. (2006) Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Revs*;60:167-215.
50. VEIGH A, FASANO A, SCOTT DA, JELACIC S, MOSELEY SL, ROBERTSON DC ET AL. (2001) IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable.
51. ESLAVA C, MATEO J, CRAVIOTO A. (1994) Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México: 251.
52. FLORES-ABUXAPQUÍ JJ, SUÁREZ-ITOIL GJ, HEREDIA-NAVARRETE MR, PUC-FRANCO MA, FRANCO-MONSREAL J. (1994) Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch Med Res* 1994; 25:303-307.
53. LAN R, LUMB B, RYAN D, REEVES PR. (2001) Molecular evolution of large virulence plasmid in *Shigella* clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 6303-9.
54. SNYDER JD, WELLS JG, YASHUK J, PUHR N, BLAKE PA. (1994) Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *Am J Trop Med Hyg* ; 33:281-284.
55. WOOD LV, MORRIS JG, SMALL PL, SETHABUTR O, TOLEDO MR, TRABULSI L ET AL. (1996) Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*;24: 498-500.

- 
56. FRANKEL G, RILEY L, GIRÓN J, VALMASSOI J, FRIEDMANN A, STROCKNINE N ET AL. (1990) Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification;161:1252-1256.
57. ADACHI JA, JIANG ZD, MATHEWSON JJ, VERENKAR MP, THOMPSON S, MARTÍNEZ- SANDOVAL F, STEFFEN R, ERICSSON CD, DUPONT HL. (2001) Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. Clin. Infect. Dis. 32: 1706-1709.
58. MATHEWSON J, CRAVIOTO A. (1999) Hep-2 cell adherence as assay for virulence among diarrheagenic *E. coli*. J. Infect. Dis. 159: 1057-1060, 1989.
59. CRAVIOTO A, GROSS RJ, SCOTLAND SM, ROWE B. (1999) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol;3:95-99.
60. OKEKE IN, NATARO JP. (2001) Enteroaggregative *Escherichia coli*. Lancet Infect. Dis. 1(5): 304-313, Dec.
61. BAUDRY B, SAVARINO SJ, VIAL P, KAPER JB, LEVINE MM. (1990) A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. J Infect Dis;161:1249-1251.
62. SCHMIDT H, KNOP C, FRANKE S, ALEKSIC S, HEESEMAN J, KARCH H. (1995) Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J Clin Microbiol;33:701-705.

- 
63. GRUPO MENSURA. (2000) Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap*; 13: 73-86.
64. COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. Statement 1996 CA-SFM. Zone sizes and MIC breakpoints for non-fastidious organisms. *Clin Microbiol Infect* 1996, 2(Suppl. 1):S24-S49.
65. JORGENSEN JH, FERRARO MJ. (1998) Antimicrobial susceptibility testing. General principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*; 26: 973-980.
66. LABORATORIO INTERNACIONAL DE REFERENCIA: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).(2000) Manual de pruebas de referencia de dilución: "Prueba de la CIM" aprobado por el estandard M7-A5.. NCCLS, Wayne, Pa.
67. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). (2000) Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Aprobado por el estándar, M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa.
68. GARCÍA R. J.A; CANTÓN E., GARCÍA S., MARTÍNEZ M., RODRÍGUEZ-AVIAL C. (2000) Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Madrid – España; 17: 03–06.
69. RODRIGUEZ LE, GUTIÉRREZ Y, QUINTERO R: Study of pharmacognosy and assessment of fluid extract obtained from leaves of *Psidium guajava* L. (guayava). *Rev Cubana Plant Med.* 1997;2(2-3):26-9

## **4.6. ANEXOS.**

---

**ANEXO N° 01 - DESCRIPCION DE LA ESPECIE *Psidium guajava* L-**

**FICHA DE CAMPO**

N° de Ficha:.....03.....

**I. DATOS GENERALES:**

Lugar de colección:..KM.25..... Distrito:..San Juan..... Provincia:..Maynas.....  
 Fecha:..01/NOV/2009..... Tipo de Bosque:..Secundario.....  
 Tipo de Suelo:..Arcillo-Arenoso..... Otras características:..Arbol con frutos.....  
 Nombre del Colector:..Larrazabal, Ushicuma, Perez..... N° Colección:..03.....

**II. TAXONOMÍA:**

Familia Vegetal:..Myrtaceae..... Nombre Científico:..*Psidium guajava*.....  
 Nombre Vulgar:..Guayaba.....

**III. CARACTERISTICAS VEGETALES:**

Hábitat:..Bosq. Secundario..... Estadio Productivo:..Fertil.....  
 Posición de Hojas:..opuestas..... Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:..Pelos.....  
 Forma del Tallo:..cilíndrico..... Órganos Accesorios en Tallo:.....  
 Características de la Corteza:..con rinitoma..... Látex:.....x..... Color de Látex:.....x.....  
 Tipo de Inflorescencia:..solitaria..... Posición de Inflorescencia:..axilar.....  
 Tipo de Flor por Sexo:..♀..... N° de Pétalos:.....5..... Unión de Sépalos:..unidos a base.....  
 N de Estambres:..Numerosos..... Posición de Estambres:..Alternos.....  
 Posición de Ovarios:..1 inferior..... N° de Carpelos:.....2-4.....  
 Tipo de Fruto:..Baya..... Consistencia:..Carbasa..... Dehiscencia:.....2.....

**IV. DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:**

Uso Medicinal 1:..... Parte Usada:.....  
 Cantidad Usada 1:..... Forma de Preparación:.....  
 Uso Medicinal 2:..... Parte Usada:.....  
 Cantidad Usada 2:..... Forma de Preparación:.....  
 Uso Medicinal 3:..... Parte Usada:.....  
 Cantidad Usada 3:..... Forma de Preparación:.....

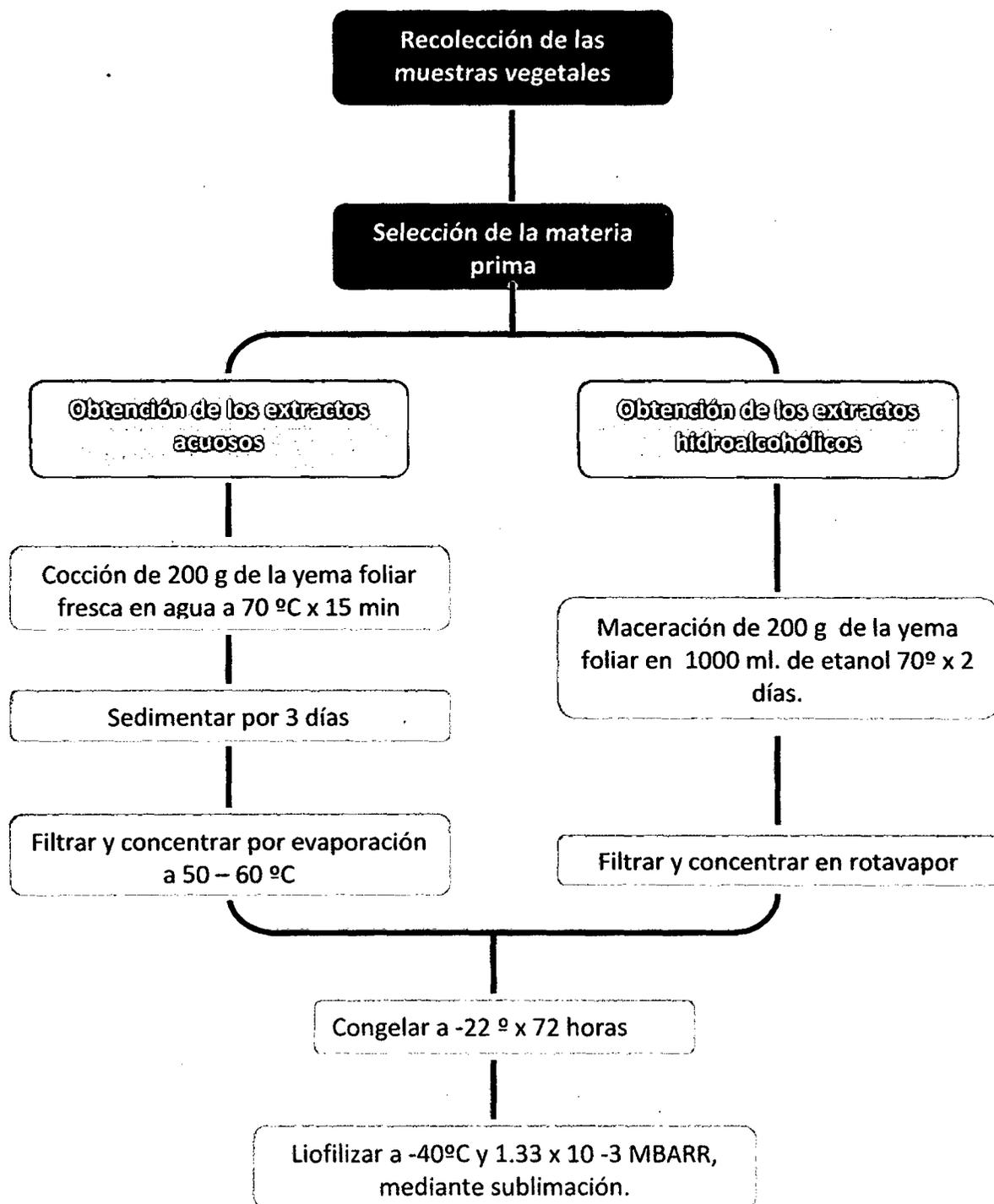
**V. COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:**

Peso:..200 gramos.....  
 Parte Colectada:..Yema foliar (cogollo).....  
 Observaciones:..La colección se realizó por la mañana, antes de la salida del sol.....



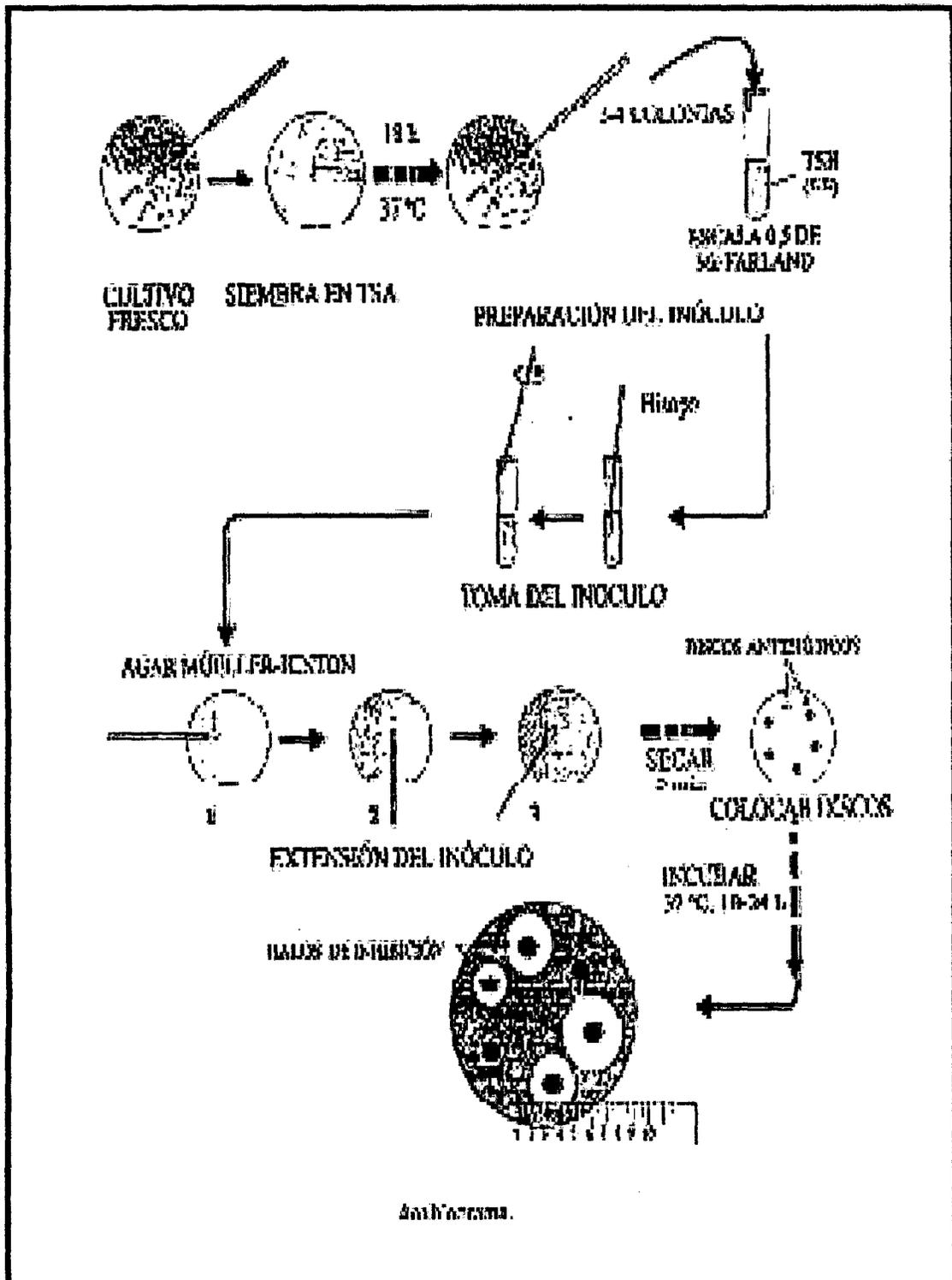
: 00054

**ANEXO N° 02 – ESQUEMA DE LA RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSOS E HIDROALCOHÓLICOS DE *Psidium  
guajava* L. (\*)**



(\*) FUENTE: Zumba Alvarado et al (2008).

**ANEXO N° 03 – ESQUEMA PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA: MÉTODO DE KIRBY BAUER**



**ANEXO N° 04 - MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO - MÉTODO DE MACRO DILUCIÓN**

Tubo	C	1	2	3	4	5	6	7	8	C.I.	C.E.
Caldo Mueller Hinton (ml)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto 400mg/ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	---	---
Inóculo	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	---
Volumen Final (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5
Concentración Final (mg/mL)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7812		

C.I: Control del inóculo.  
 C.E: Control de esterilidad.

**ANEXO N° 05 - FICHA DE EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA**

**MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.**

GRUPOS	Concentración	Promedio de halo de Inhibición (mm)	Porcentaje de Inhibición
<b>Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>Psidium guajava</i> L.</b>	50 mg/ml		
	100 mg/ml		
	200 mg/ml		
	400 mg/ml		
<b>Extracto acuoso liofilizado de <i>Psidium guajava</i> L.</b>	50 mg/ml		
	100 mg/ml		
	200 mg/ml		
	400 mg/ml		
<b>Control Positivo (Cloranfenicol)</b>	30 µg		
<b>Control Negativo (DMSO)</b>	0.5%		

**MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO.**

MICROORGANISMO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (mg/ml)
----------------	--

*Escherichia coli* ATCC

2592

---

**ANEXO N° 06 - CLASIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
SEGÚN EL DIÁMETRO DE INHIBICIÓN**

Sensibilidad	Diámetro (mm)
RESISTENTE	0 – 13
INTERMEDIO	13 – 16
SENSIBLE	16 a Más

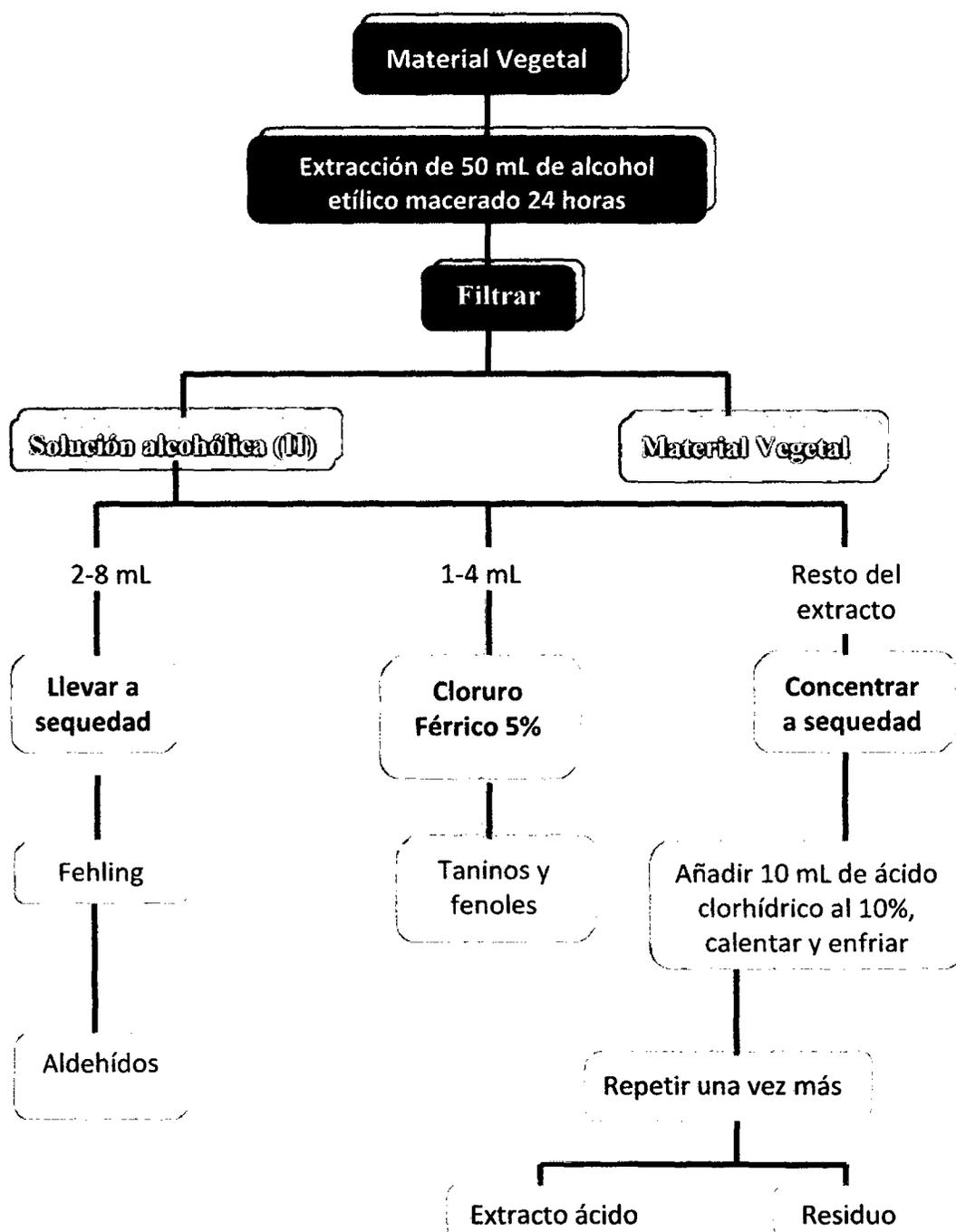
Fuente: Carvalho. 2002. Actividad Antimicrobiana

**ANEXO N° 07 - PATRONES ESTÁNDAR DEL HALO DE INHIBICIÓN, PUNTOS DE CORTE EQUIVALENTE A LA CMI PARA ENTEROBACTERIAS Y DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN PARA LA CEPA *Escherichia coli* ATCC25922**

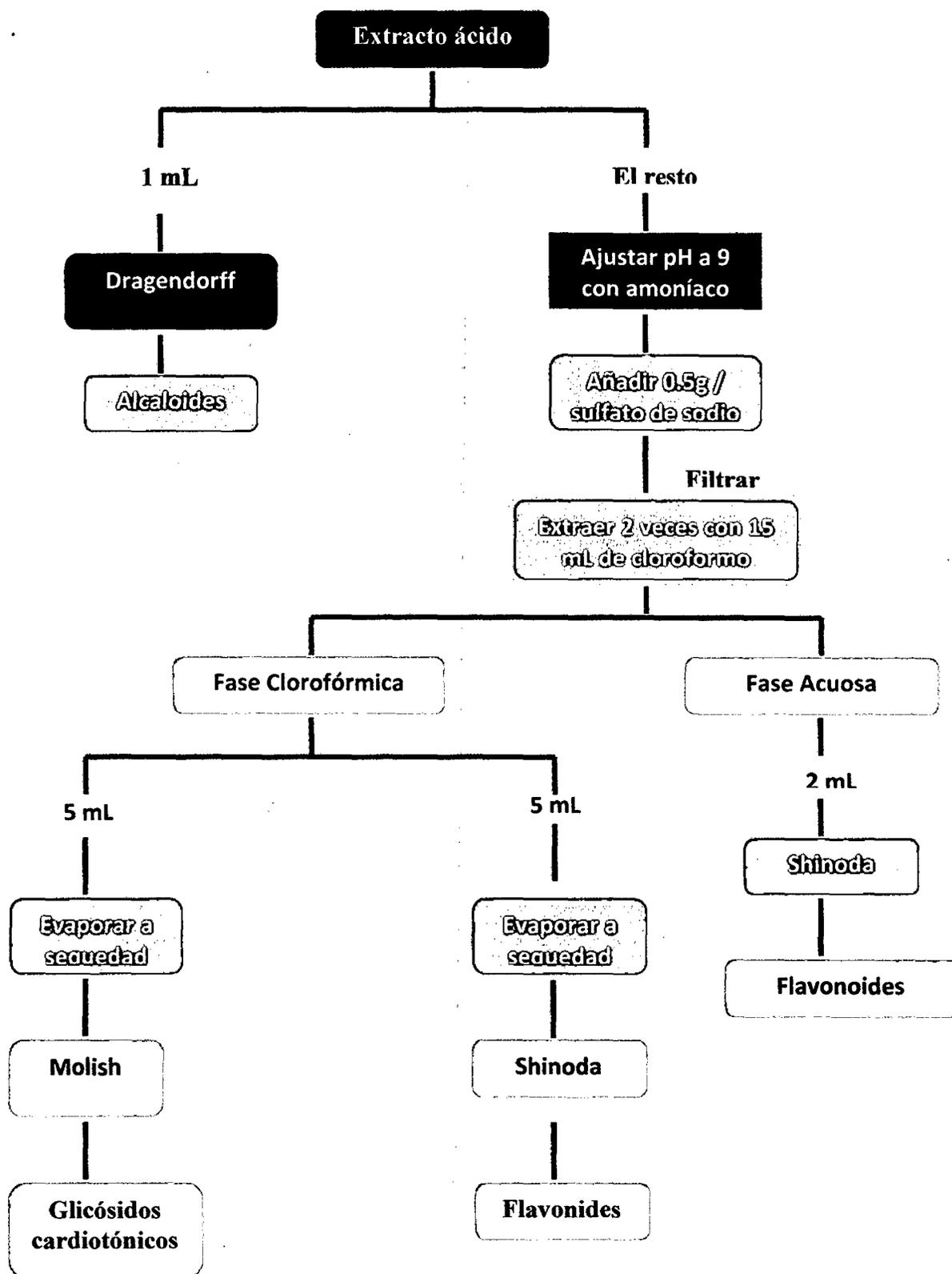
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 intervalo
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
C	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	21-27

Fuente: Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

**ANEXO N° 08 – ESQUEMA DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA EXTRACTOS VEGETALES HIDROALCOHÓLICOS ETAPA I.**



**ANEXO N° 09 – ESQUEMA DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA EXTRACTOS VEGETALES HIDROALCOHÓLICOS ETAPA 2**





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM AMAZONENSE

Apartado Postal 326  
E-mail [herbarium@amaz.com.pe](mailto:herbarium@amaz.com.pe)  
Iquitos - Perú

*Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza*

### CERTIFICADO

LA DIRECTORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA,

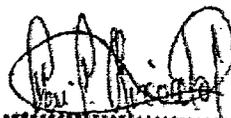
CERTIFICA:

Que, la muestra botánica de interés medicinal colectadas por las Bachilleres: Lenin Fernández Arellano y Laizamon Ushiñahua Pérez, pertenecen a la Tesis Titulado: " EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LA YEMA FOLIAR DE *Psidium guajava* L (guayaba) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO – FCB – UNAP 2008 - 2009", fueron verificados e identificados en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza, y la cual certifica que la muestra presentada por los Bachilleres pertenece a:

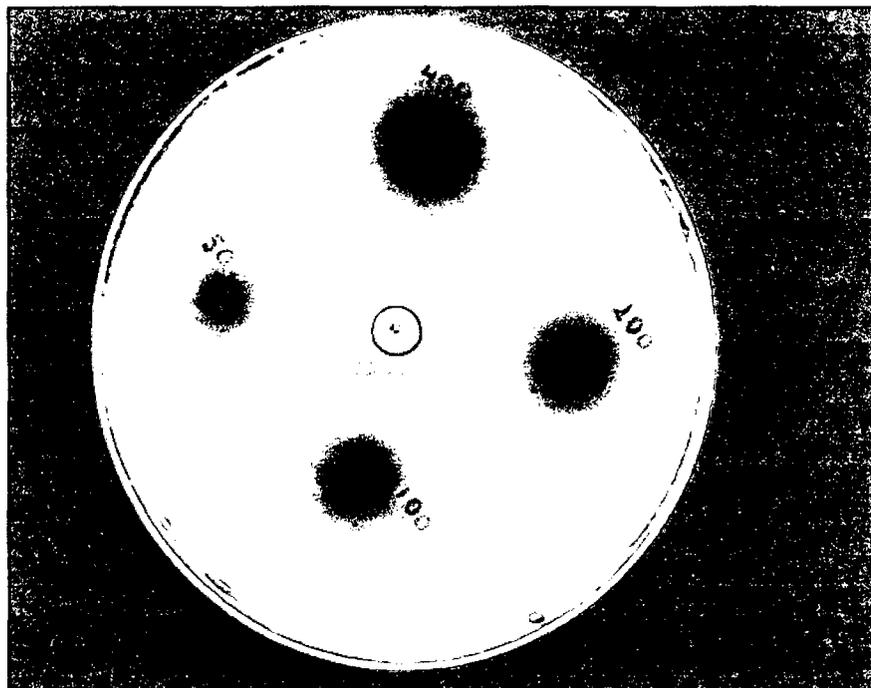
Familia : Myrtaceae  
Género : *Psidium*  
Especie : *Psidium guajava*  
Parte botánica: Yema foliar seca (cogollo)

Se expide el presente certificado, a solicitud de las interesadas para lo que estime conveniente.

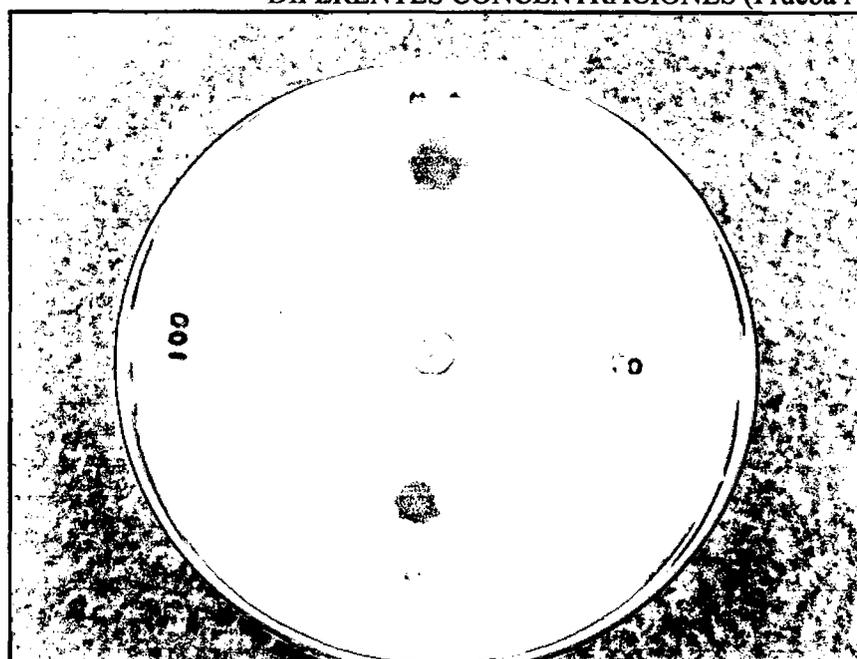
Iquitos, 02 de Noviembre del 2009

  
  
Dña. Mari Nancy Araya García  
Directora

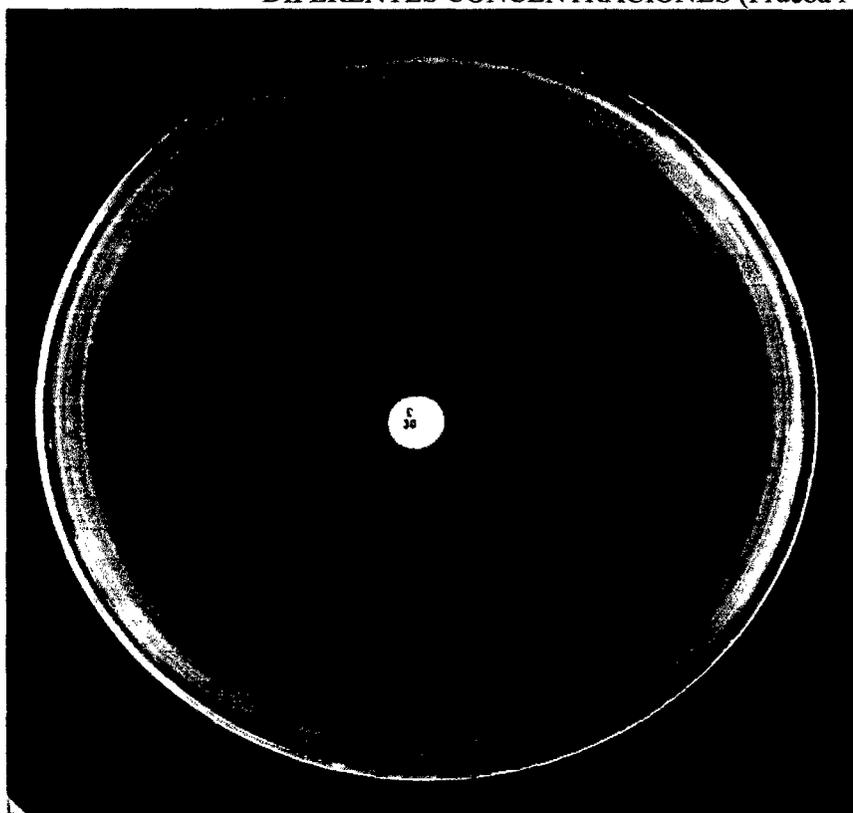
ANEXO N° 11 - HALOS DE INHIBICION DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHOLICO DE *Psidium guajava* L.  
FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES (Prueba N° 01)



ANEXO N° 12 - HALOS DE INHIBICION DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHOLICO DE *Psidium guajava* L.  
FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES (Prueba N° 08)



ANEXO N° 13 - HALOS DE INHIBICION DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHOLICO DE *Psidium guajava* L.  
FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES (Prueba N° 15)





**ANEXO N°14 – CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHOLICO DE *Psidium guajava* L. FRENTE A  
*Escherichia coli* ATCC 25922**

