

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



TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Staphylococcus aureus* DEL
EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Anacardium occidentale* Linn.
“Casho” MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-
BAUER)”**

AUTORES:

GÓMEZ SEOPA, SILVIA MARGARITA
PEREIRA SANDOVAL, JOHN EDWARD

ASESORA:

Ing. Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui

IQUITOS – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Staphylococcus aureus* DEL
EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Anacardium occidentale* Linn.
“Casho” MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-
BAUER)”

PAGINA DE APROBACIÓN

M.C. Charles Ocampo Falcón.

PRESIDENTE

Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.

MIEMBRO

Ing. Cleto Jara Herrera.

MIEMBRO

Ing. Reyna Gladys Cárdenas de

Reátegui

ASESORA

INDICE TEMÁTICO

	Pág.
Abreviaturas	12
Resumen	14
Dedicatoria	16
Agradecimiento	18
CAPITULO I	19
I.- INTRODUCCIÓN	20
II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	24
2.1 Formulación del Problema	24
III.- OBJETIVOS	25
3.1 General	25
3.2 Específicos	25
CAPITULO II	26
I.- MARCO TEÓRICO	27
1.1 <i>Anacardium occidentale</i> L. “CASHO”	28
1.1.1 Historia	28
1.1.2 Antecedentes	29
1.1.3 Clasificación Taxonómica	32
1.1.4 Descripción Botánica	32
1.1.5 Composición Nutricional	36
1.1.5.1 Pseudo fruto	36
1.1.5.2 Nuez	37
1.1.5.3 Semilla	37
1.1.5.4 Valor Nutricional Porcentual De La Nuez Y de Los Ácidos Grasos Del Aceite De Marañón.	37
1.1.6 Composición Fitoquímica	38

1.1.7	Estudios Farmacológicos y Toxicológicos	42
1.1.8	Uso Tradicional	45
1.1.9	Distribución Geográfica	46
1.2	Método de Susceptibilidad por Disco de Difusión Kirby – Bauer	46
1.2.1	Introducción	46
1.2.2	Principio del Método	48
1.2.3	Macrodilución en Caldo	49
1.2.4	Concentración Mínima Inhibitoria	50
1.2.5	Lectura e Interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria	51
1.3	Patrón de Turbidez	52
1.4	<i>Staphylococcus</i>	54
1.4.1	Introducción	54
1.4.2	Especies de <i>Staphylococcus</i>	54
1.4.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	55
1.4.2.2	Definición Taxonómica.	55
1.4.2.3	Características Microbiológicas	56
1.4.2.4	Metabolismo	56
1.4.2.5	Característica Genéticas	57
1.4.2.6	Fisiopatología	58
1.4.2.7	Identificación	62
1.4.2.8	Enfermedades Causadas Por <i>Staphylococcus aureus</i>	62
1.4.2.9	Tratamiento	67
1.4.2.10	Mecanismo De Resistencia Al Tratamiento	70
1.5	Antibióticos	71
1.5.1	Historia	71
1.5.2	Definición	71
1.5.3	Clasificación De Los Antibióticos	72
1.5.3.1	Según la acción del antibiótico sobre la bacteria	72
a.	Bacteriostáticos	72
b.	Bactericidas	72
1.5.3.2	Según el mecanismo de acción sobre la bacteria.	72
a.	Antibióticos que inhiben la síntesis de la Pared celular.	72

b. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad.	73
c. Antibióticos que inhiben la síntesis de Proteínas a nivel ribosomal.	73
d. Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos Nucleicos.	73
e. Antibióticos anti metabolitos.	73
1.5.3.3 Clasificación según su estructura química	74
a) Betalactámicos	74
b) Carbapenems	74
c) Aminoglucósidos	74
d) Macrólidos	74
e) Tetraciclinas	74
f) Lincosaminas	74
g) Quinolonas	74
h) Sulfonamidas	74
i) Rifamicinas	74
j) Cloranfenicoles	74
k) Antibióticos péptidos	74
l) Otros	74
Aminoglucósidos	74
1.5.4 Mecanismos de Acción de Los Antibióticos	76
1.5.4.1 Agente que inhiben la síntesis de la pared celular.	76
1.5.4.2 Agentes que modifican la permeabilidad de la Membrana celular.	77
1.5.4.3 Agentes que inhiben la síntesis proteica.	77
1.5.4.4 Agentes que inhiben la síntesis o función de Los ácidos nucleicos.	77

II.-	DEFINICIONES OPERACIONALES	78
2.1	VARIABLES	78
2.1.1	Variable Independiente	78
2.1.2	Variables Dependientes	78
2.2	Indicadores	78
2.2.1	Indicador Independiente	78
2.2.2	Indicador Dependiente	78
2.3	Operacionalización de las Variables	79
III.-	HIPOTESIS	81
	CAPITULO III	82
I.-	METODOLOGÍA	83
1.1	Método de Investigación	83
1.1.1	Tipo de Estudio	83
1.2	Diseño de la Investigación	83
1.3	Población Y Muestra	84
1.3.1	Población Vegetal	84
1.3.2	Muestra Vegetal	84
1.3.2.1	Criterio de Inclusión de la Muestra Vegetal	84
1.3.2.2	Criterio de Exclusión de la Muestra Vegetal	84
1.3.3	Cepa Bacteriana	85
1.4	Procedimiento Experimental	85
1.4.1	Recolección del Material Vegetal	85
1.4.1.1	Recolección de las Muestras Vegetales	85
1.4.2	Lavado de la Materia Prima	86
1.4.3	Secado de la Materia Prima	86
1.4.4	Triturado y Pesada de la Materia Prima	86

1.4.5	Método de Obtención del Extracto Alcohólico	86
1.4.5.1	Obtención del Extracto Alcohólico de las Hojas de <i>Anacardium Occidentale L.</i> (Casho)	86
1.4.6	Determinación de La Actividad Anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	87
1.4.6.1	Obtención de la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	87
1.4.7	Prueba de susceptibilidad por difusión de disco	87
1.4.7.1	Esterilización de los materiales a utilizar	87
1.4.7.2	Preparación de los Medios de cultivo	89
1.4.7.3	Preparación de los Discos	89
1.4.7.4	Preparación de la Solución Stock y de la Macrodilución del extracto	89
1.4.7.5	Preparación de los Discos impregnados con el extracto	90
1.4.7.6	Purificación de la Cepa	90
1.4.7.7	Preparación del Inóculo	90
1.4.7.8	Inoculación de las placas	91
1.4.7.9	Aplicación de los discos	91
1.4.7.10	Incubación de las Placas	92
1.4.7.11	Lectura de las placas e interpretación de los Resultados	92
1.5	Materiales	93
1.5.1	Material Vegetal	93
1.5.2	Material Biológico	93
1.5.3	Materiales de Laboratorio	93
1.5.4	Drogas e Insumos Químicos	95
1.5.5	Equipos e Instrumentos:	95
1.5.6	Medios De Cultivo	96
1.6	Técnicas Usadas en la Recolección de Datos	97

1.7	Análisis de Datos	97
	1.7.1 Técnicas de Análisis e Interpretación de la Información	97
1.8	Limitaciones	97
1.9	Protección De Los Derechos Humanos Y Bioseguridad	98
CAPITULO IV		100
I.-	RESULTADOS	101
1.1.-	Determinación de Rendimiento de Hojas	101
1.2.-	Actividad Antibacteriana De <i>Anacardium occidentale L.</i> (Casho)	102
	1.2.1 Método de difusión de disco (Kirby - Bauer)	102
II.-	DISCUSIÓN	106
III.-	CONCLUSIONES	110
IV.-	RECOMENDACIONES	111
V.-	BIBLIOGRAFIA	112
	5.1.- Referencias Bibliográficas	112
	5.2.- URL`s	132
	ANEXOS	133

INDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	Pág
ANEXO N°01: Datos de pasaporte de colección de especies de la planta medicinal en estudio.	134
ANEXO N°02: Sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por H. Melchior (1964), DE <i>Anacardium occidentale L.</i>	135
ANEXO N°03: Certificado de identificación taxonómica de <i>Anacardium occidentale L.</i>	136
ANEXO N°4 Ubicación geográfica del centro poblado cruz del sur.	137
ANEXO N°5: Diagrama de flujo de la obtención del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	138

ANEXO N°6: Diagrama de flujo de la actividad antibacteriana (difusión en disco kirby – Bauer).	139
ANEXO N°7: Recoleccion de las hojas, de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	140
ANEXO N°8: Secado de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	141
ANEXO N°09: Triturado de las hojas secas del <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	142
ANEXO N°10: Pesada de las hojas (trituradas) de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	143
ANEXO N°11: Macerado de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	144
ANEXO N°12: Filtrado de la maceracion de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	145
ANEXO N°13: Eliminación de un disolvente a presión reducida (rotavapor).	146
ANEXO N°14: Concentración del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho) en rotavapor	147
ANEXO N°15: Secado del extracto alcoholico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	148
ANEXO N°16: Esterilizacion de los materiales.	148
ANEXO N°17: Esterilizacion de los discos de sensibilidad.	150
ANEXO N°18: Preparación de la solución stock del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	150
ANEXO N°19: Obtencion de la macrodilucion del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho)	153
ANEXO N°20: Preparacion del agar Mueller Hinton, agar Tripticasa de Soya y Caldo Tripticasa de Soya.	154
ANEXO N°21: Transporte de la muestra y medios de cultivo	160
ANEXO N°22: Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	161
ANEXO N°23: Activacion de <i>Staphylococcus aureus</i>	161
ANEXO N°24: Cepas activadas de <i>Staphylococcus aureus</i>	163
ANEXO N°25: Preparacion del inculo de <i>Staphylococcus aureus</i>	164
ANEXO N°26: Preparación del estandar 0.5 de Mac Farland	166
ANEXO N°27: Preparacion de los discos impregnados con el extracto alcoholico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i> (casho).	168
ANEXO N°28: Ajustando la turbidez del inculo con el estándar 0.5 de Mac Farland.	169

ANEXO N°29: Inoculación en las placas.	170
ANEXO N°30: Aplicación de los discos.	171
ANEXO N°31: Incubación de las placas.	172
ANEXO N°32: Lectura de las placas.	173

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO

	Pág.
FIGURA N°01: Árbol de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho)	33
FIGURA N°02: Tronco de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho)	33
FIGURA N°03: Hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho)	34
FIGURA N°04: Flores de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho)	34
FIGURA N° 05: Pseudo Fruto del <i>Anacardium occidentale</i> L. (Cacho)	35
FIGURA N° 06: Fruto del <i>Anacardium occidentale</i> L. (Cacho)	35
FIGURA N° 07: Estructuras químicas del Ácido Anacárdico, cardanol, cardol y 2-metil-cardol	40
FIGURA N° 08: Estructuras químicas de los fitosteroles y fitostanoles identificados en el aceite de la nuez del <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho)	41
FIGURA N° 09: Estructuras químicas de la Zaeralona y Lasiodiplodina.	43
FIGURA N° 10: Patrón clásico de la melanogénesis según Raper-Mason	44
FIGURA N° 11: Bloqueo de la conversión aeróbica de tirosina	44
FIGURA N° 12: Relación entre los puntos de quiebre (break point) y el halo de inhibición en la técnica de antibiograma	50
FIGURA N° 13: Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).	50
FIGURA N° 14: Determinación e interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM)	51
FIGURA N° 15: Características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
FIGURA N° 16: Mecanismo de defensa del Huesped frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	58

INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
TABLA N° 01: Composición Nutricional del pseudo fruto	36
TABLA N° 02: Composición de la Semilla del pseudo fruto	37
TABLA N° 03: Valor Nutricional porcentual de la Nuez y de los ácidos grasos del aceite del marañon.	37
TABLA N° 04. Tamizaje Fitoquímico del extracto fluido y de la tintura al 20 % de hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i>	39
TABLA N° 05. Tamizaje Fitoquímico del extracto n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo obtenidos de la tintura al 20% de hojas de <i>Anacardium occidentale L.</i>	39
TABLA N° 06. Composición Química de la nuez de <i>Anacardium occidentale L.</i> , (casho)	40
TABLA N°07: Escala de McFarland de 0.5	53
TABLA N°08 Antimicrobianos recomendados para el tratamiento de la Infección Estafilocócica según localización del foco y sensibilidad de la cepa a meticilina.	67
TABLA N°09: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.	93
TABLA N° 10: Rendimiento del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale L</i> (Casho), por maceración en frio y posterior concentración en rotavapor	101
TABLA N° 11: Actividad antibacteriana obtenida del extracto alcohólico de <i>Anacardium occidentale L.</i> (Casho) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , según diámetro de la zona de inhibición.	102

INDICE DE GRÁFICOS

CONTENIDO	Pág.
GRAFICO N° 1: Categorización del extracto alcohólico de <i>Anacardium occidentale L.</i> (Casho) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según diámetro de la zona de inhibición.	104
GRAFICO N° 2: Actividad antibacteriana de <i>Anacardium occidentale L.</i> (Casho) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según porcentaje de inhibición.	105

ABREVIATURAS

MRSA	:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la meticilina.
HA-MRSA	:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la meticilina adquirido en el Hospital.
CA-MRSA	:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la meticilina adquirido en la Comunidad.
EUA	:	Estados Unidos de América.
MDR	:	Multi-Droga-Resistente
CMI	:	Concentración mínima inhibitoria
mm.	:	Milímetro.
CNSL	:	líquido de la cascara de la nuez del casho
sp.	:	Especie
<i>S.aureus.</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cm.	:	Centímetro.
M	:	Metro
<i>A. occidentale:</i>	:	<i>Anacardium occidentale</i>
ppm.	:	Partes por millón
NCCLS	:	Comité Nacional para Clínica y Laboratorio Estándar
CLSI	:	Instituto clínico y Laboratorio Estándar.
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
mL.	:	Mililitro
CBM	:	Concentración Bactericida Mínima
µg.	:	Micrógramo
UFC	:	Unidades formadoras de colonias
µm.	:	Micrómetro
kb	:	Kilo voltios
G	:	Guanina
C	:	Citocina
Tn	:	transposón
SaPIs	:	varias islas de patogenicidad
MHC	:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PVL	:	leucocidina de Panton-Valentine
PMN	:	polimorfonucleares

PCR		Reacción en cadena de la polimerasa
IM	:	Intramuscular.
PIR	:	Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo (PIR)
IMET	:	Instituto de Medicina Tradicional
DZI	:	Diámetro de la zona de inhibición
Conc	:	Concentración

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-*Staphylococcus aureus* DEL
EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Anacardium occidentale* Linn.
“Casho” MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY-
BAUER)”**

Silvia Margarita Gómez Seopa & John Edward Pereira Sandoval**

Resumen:

El propósito del presente trabajo fue determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (casho), a través del método de disco difusión o ensayo de Kirby Bauer; que determina la formación de halos de inhibición alrededor de los discos de pruebas. La muestra vegetal fue recolectada del Centro Poblado Cruz del Sur (km 8 de la carretera Iquitos-Nauta) y la cepa bacteriana de experimentación fue proporcionada por la Dirección de Salud Ambiental (DESA) de la Dirección Regional de Salud Loreto. La cepa bacteriana de experimentación fue *Staphylococcus aureus*. Para el método de disco difusión o ensayo de Kirby- Bauer se utilizó como control Positivo Gentamicina 10 ug, el cual obtuvo un promedio de 17.5 mm. en el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (>15 mm = Sensible). El extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn (Casho), se evaluaron a concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml. encontrándose diámetros en la zona de inhibición de 6.0mm., 6.7mm., 8.0 mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados RESISTENTE, por encontrarse por debajo del parámetro de comparación según control positivo (<12 mm = Resistente).

La actividad antibacteriana fue medida principalmente por el porcentaje de inhibición que demostró el extracto alcohólico a las diversas concentraciones evaluadas, encontrándose 34.29% y 38.29% en las concentraciones de 75mg/ml y 150 mg/ml respectivamente; lo cual demostró ser inactivo frente a *Staphylococcus aureus*. En la concentración de 300 mg/ml, se obtuvo un porcentaje de inhibición de 45.71%, considerándolo como Poco Activo.

Palabras claves: Anacardium occidentale Linn; *Método de disco difusión en agar; Actividad antibacteriana; Staphylococcus aureus.*

*Bachiller en Farmacia y Bioquímica

**“EVALUATION ACTIVITY ANTI-*Staphylococcus aureus* ALCOHOLIC
EXTRACT OF LEAVES Cashew Linn. “Casho” BY THE METHOD OF DISC
DIFFUSION (KIRBY -BAUER)”**

Silvia Margarita Gómez Seopa & John Edward Pereira Sandoval**

Abstract:

The purpose of this study was to determine the antibacterial activity in vitro of the alcoholic extract of leaves *Cashew Linn.* (Casho), through the disk diffusion method or assay Kirby Bauer; determining the formation of zones of inhibition around the discs test. The plant sample was collected from Southern Cross Town Centre (8 km Iquitos - Nauta road) and experimental bacterial strain was provided by the Directorate of Environmental Health (DESA) of the Loreto Regional Health Directorate. The experimental bacterial strain was *Staphylococcus aureus*. For disc diffusion method or Kirby Bauer assay it was used as a positive control Gentamycin 10 ug, which he earned an average of 17.5 mm. the diameter of the inhibition zone (DZI), SENSITIVE found as result as method parameters Kirby - Bauer (> 15 mm = Sensible). The alcoholic extract of leaves *Cashew L.* (Casho), They were evaluated at concentrations of 75, 150 and 300 mg / ml. finding diameters in the zone of inhibition of 6.0mm . , 6.7mm . , 8.0 mm. respectively, which they obtained as results RESISTANT, to be below the comparison parameter as a positive control (<12 mm = resistant).

The antibacterial activity was measured mainly by the percent inhibition demonstrating the alcoholic extract at various concentrations evaluated, finding 34.29 % and 38.29 % at concentrations of 75mg / ml and 150 mg / ml respectively; which proved to be inactive against *Staphylococcus aureus*. In the concentration of 300 mg / ml, a percentage of inhibition of 45.71 % , considering it as indolent was obtained.

Keywords; *Cashew Linn* , disk diffusion method in agar ; Antibacterial activity ; *Staphylococcus aureus* .

*Bachelors in Pharmacy and Biochemistry

DEDICATORIA:

*Sílvía Margarita
Gómez Seopa:*

A:

Dios.

Por Protegerme y Darme la Fortaleza de seguir adelante a pesar de las dificultades vividas, por brindarme la felicidad y permitirme estar junto a mi familia y a las personas que son muy importantes en mi vida.

*A mi Madrecita de mi vida **Etelvina Seopa Babilonia**
Por Cuidarme, amarme y ser desde el inicio de mi carrera el motivo que me inspiro a seguir adelante, me enseñaste los valores del amor, la responsabilidad y a seguir esforzándome día a día para lograr mis objetivos, y sé que siempre estuviste orgullosa de mis logros porque reflejaba los tuyos.
Y aunque ahora no estés a mi lado siempre seguirás siendo el Ángel que alumbrará por siempre mi vida.*

*A mi Papacito **Jaime Moises Gómez Guzmán** por Protegerme y brindarme su apoyo incondicional para poder desarrollarme como profesional.*

*A mis hermanos **Jaime, Orlando, Tania y Sara** por el apoyo, la confianza brindada y la comprensión por el tiempo que no estuve con Ustedes.*

*A mis Abuelitos **Pedrito Antonio Ceopa Linarez y Dolores Gongora Cordova**
Por ser los angeles que me cuidan y protegen*

***A mis sobrinos** por la ternura y Alegria brindada.*

*A mi Fiel y Amado compañero **Johncito**
Por que eres muy importante en vida y siempre estuviste a mi lado incondicionalmente, en las buenas y en las malas, por motivarme, brindarme tu apoyo, darme la confianza, por darme la mano siempre que la necesitaba y por estar ahora como siempre juntito a mí, y sé que seguiremos así hasta la eternidad. Gracias infinitamente por todo Amorcito.*

***John Edward Pereira
Sandoval:***

A:

Dios.

*Por darme la oportunidad de vivir, y por estar conmigo en cada paso que doy,
por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi
camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo
el periodo de estudio.*

*A mi querida y Amada madre **Carmen Rosario Sandoval Moreno.***

*Por darme la vida, quererme, orientarme y creer en mí en todo momento. Por
todo esto seguí adelante en los momentos más difíciles.
Mamá gracias por ser mi soporte y ejemplo a seguir en todo momento de mi
vida y mi carrera profesional.*

*A mi padre **Carlos Alberto Pereira Pinedo.***

*Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me
ha inculcado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su
amor, por todo esto tiene un lugar muy grande en mi corazón.*

A mis queridos hermanos.

Carmen, Ivonne, Carlos.

Por el apoyo incondicional como hermanos mayores.

A mis sobrinos.

*Porque soy para ellos un ejemplo a seguir, demostrándoles que con esfuerzo y
estudio se puede llegar muy lejos en la vida.*

*En memoria a la **señora Etelevina.***

Por ser una gran amiga y brindarme su cariño.

Este logro es de todos.

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a Todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de la presente investigación.

A todos los docentes de nuestra Prestigiosa Facultad, los cuales nos brindaron todos sus conocimientos cuando estuvimos en las aulas, para poder realizarnos como profesional.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica por brindarnos sus instalaciones para realizar el presente trabajo.

A la Ingeniera Reyna Gladys Cárdenas de Reátegui por el valioso apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Instituto de Medicina Tradicional (IMET-ESSALUD), por brindarnos sus instalaciones para realizar el proceso de desecación de la muestra vegetal estudiada. De manera especial al Ing. Jorge Isaac Villacres Vallejo y al Q.F. William Valdelomar Vigo Alfaro por la confianza brindada.

Al LIPNA, por brindarnos sus instalaciones para realizar la concentración del extracto a evaluar. De manera especial a la Dra Lastenia y a todo su equipo de trabajo.

A la Dirección de Salud Ambiental por brindarnos el material biológico a ensayar.

A todos los jurados Calificadores por las críticas constructivas y por su importante aporte para la realización del presente trabajo.

CAPITULO I

I.- INTRODUCCION

Las plantas medicinales son aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos. En la actualidad se calcula unas 260,000 especies de plantas, de las que el 10 % se puede considerar medicinal. Según la clasificación de tratados médicos de fitoterapia, en épocas modernas y pasadas, las regiones tropicales son favorecidas por la proporción de especies medicinales, teniendo en cuenta que todavía no se conoce la totalidad de la flora vegetal ¹.

Las plantas son laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y de distribución restringida. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, bacterias, hongos, como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides. Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas ².

Las hojas de *Anacardium occidentale* Linn (cacho) presentan contenidos óptimos de minerales, principalmente electrolitos, material saponificable, ácidos grasos monoinsaturados, fitoesteroles y proteínas solubles, por lo que se le atribuyen propiedades medicinales como hipoglicemiante, antihipertensiva, astringentes, antihelmíntica y antiinflamatoria ³⁻⁵. La literatura refiere información sobre la caracterización fitoquímica y antimicrobiana de la fruta de *Anacardium occidentale* Linn. así como también su semilla (nuez) sin embargo, estas determinaciones en las hojas son insuficientes.

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *Staphylococcus aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida⁶⁻⁸. La mayor parte de estas infecciones ocurren en personas en las que no se reconocen factores de riesgo, principalmente niños y adolescentes. Generalmente ocurre en poblaciones cerradas o semicerradas (militares, reclutas, prisioneros, atletas y guarderías), hombres que tienen sexo con hombres y grupos con bajo estatus económico. Estas cepas han sido encontradas en todo el mundo -incluyendo Norteamérica y Europa- con áreas que reportan una incidencia de alrededor del 20 %⁹⁻¹³. El impacto de las cepas de *Staphylococcus aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina.⁶⁻⁸.

A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. *Staphylococcus aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. En los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones por este microorganismo, en especial por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.⁶⁻⁸.

Las infecciones por MRSA fueron, en su inicio, de origen nosocomial (HA-MRSA), y ocurrían frecuentemente en personas hospitalizadas, enfermas o en trabajadores de la salud, por eso se les denominó MRSA adquirido en el hospital (HA-MRSA); sin embargo, a finales de los años 90, ha existido una emergencia de MRSA porque provoca infecciones en la comunidad, con una susceptibilidad antimicrobiana diferente que las cepas hospitalarias. Estas cepas representan un problema potencialmente muy serio, y los primeros reportes que llamaron la

atención sobre ellas fueron las muertes por neumonía necrotizante de 4 niños sanos en Estados Unidos entre 1997 y 1999 ¹⁴.

El primer reporte de una infección por CA-MRSA en Sudamérica fue hecho en Brasil en el año 2005¹⁵.

El Centro de Enfermedades Infecciosas estima que en EUA en el año 2005 se desarrollaron 94,360 infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento progresivo de infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, con una sensibilidad a los antibióticos diferente que afecta a la población sana sin haber tenido contacto previo con los hospitales o clínicas de salud. Estas infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina adquiridas en la comunidad pueden desarrollar diferentes enfermedades, siendo las más comunes en la piel y tejidos blandos ⁶⁻⁸.

La infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MSRA) es una de los principales patologías que se presenta a nivel mundial, presentando infecciones osteoarticulares, en piel, sistema gastrointestinal y respiratorio principalmente. Tradicionalmente el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) ha sido considerado un patógeno nosocomial, los aislamientos de MRSA nosocomiales se caracterizan por presentar resistencia a múltiples grupos de antibióticos además de los betalactámicos. En la última década se han publicado numerosos reportes de colonización e infección por SAMR en individuos provenientes de la comunidad, incluso en personas sin contacto hospitalario previo. De acuerdo con los resultados publicados. La incidencia anual es de 28,4 Casos por cada 100.000 ingresos hospitalarios lo que supone una tasa de Mortalidad anual de 4,9 casos por cada 100.000 personas ⁶⁻⁸.

La tasa de mortalidad de la infección invasiva por *Staphylococcus aureus* es alta, variando entre el 19 y el 34%; en el último estudio EPINE, correspondiente al año 2007, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente SAMR con una prevalencia del 10,6% ocupa el segundo lugar en orden de frecuencia entre los

microorganismos causales de infección nosocomial en los hospitales españoles, por detrás de *Escherichia coli* (15,4%) y por delante de *Pseudomonas aeruginosa* (10,3%).⁶⁻⁸.

Una serie de estudios transversales, 1996, 2002 y 2006 puso de manifiesto el progresivo incremento de la prevalencia de aislados de SAMR que, en las sucesivas revisiones pasó de un 10,5%, a un 11,2 Y 31,2 % Respectivamente, Asimismo, un estudio de 8.312 cepas procedentes de infecciones observadas entre 1993 y 2003 en 296 hospitales mostró un incremento de la resistencia desde el 22 % en 1993 al 41% en 2006. La incidencia de bacteriemia nosocomial por SAMRA fue de 1,45 episodios por 1.000 pacientes que ingresaron a unidades de cuidados intensivos ⁶⁻⁸.

La mayoría de los estudios de seguimiento y descripción en nuestro medio correspondientes a infecciones por SAMR se centran en infecciones del área de cuidados intensivos y complicaciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, así como su impacto en la salud pública de dichas infecciones. Sin embargo el *Staphylococcus aureus* puede recurrir con frecuencia en localizaciones osteoarticulares asociadas o no a material de osteosíntesis⁶⁻⁸.

En nuestro País, ya en 1996 en un estudio multicéntrico en Lima, se encontró 63 % de MRSA ¹⁶. Estudios posteriores muestran niveles que varían de 50 a 90% ^{17, 18}.

A finales de la década de 1950, aproximadamente el 85% de todas las cepas de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* eran resistentes a la penicilina en USA y Francia. La síntesis y comercialización de las nuevas penicilinas, Meticilina y Oxacilina, resistentes a la penicilinas, fue el aldabonazo que, así se creía, terminaría con el problema de las resistencias de las cepas de *Staphylococcus aureus* ⁶⁻⁸.

Sabiendo que las incidencias de enfermedades infecciosas producidas por *Staphylococcus aureus* en la Región Amazónica son frecuentes, nos propusimos

realizar el presente estudio de investigación esperando demostrar la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de hojas del casho , por tal motivo los resultados que obtendremos nos permitirán contar con la información científica validada, pudiendo utilizarse como una alternativa terapéutica, económica y eficaz para el tratamiento de las enfermedades producidas por esta bacteria .

Esperamos que Nuestro trabajo sea el inicio o continuación a proyectos de investigación para el descubrimiento de nuevos principios activos que hagan frente al problema de enfermedades infecciosas causadas por estos microorganismos.

II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1.-FORMULACION DEL PROBLEMA

¿El extracto alcohólico de hojas del *Anacardium occidentale* Linn. (casho), presentará actividad anti- *Staphylococcus aureus*, mediante el método de difusión en disco (Kirby – Bauer)?

III.- OBJETIVOS

3.1 GENERAL:

Determinar la actividad anti- *Staphylococcus aureus* del extracto Alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (casho), mediante el método de difusión en disco (Kirby - Bauer)

3.2 ESPECÍFICO:

- Obtener el extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) empleando el método de maceración en frío.
- Determinar el porcentaje de rendimiento del extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho).
- Medir los diámetros de los halos de inhibición de la cepa *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho)
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto alcohólicos de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) por el método de macro dilución.

CAPITULO II

I. MARCO TEÓRICO

En la actualidad existe una gran variedad de antibióticos de primera, segunda y hasta tercera generación que ofrecen una amplia variedad de opciones para el tratamiento de padecimientos causados por bacterias ¹⁹. Estos antibióticos están perdiendo eficacia por el aumento progresivo de la resistencia microbiana, lo que constituye un problema de primera línea para la salud pública global ^{20,21}. Esto se debe, principalmente al tratamiento farmacológico incompleto de los pacientes, debido a la automedicación, y abandono de los tratamientos respectivos.

A esto se suma, el uso irracional de antibióticos que contribuyen a la aparición de cepas microbianas Multi-Droga-Resistentes (MDR) ²². Este problema, se agudiza cada vez por el elevado costo de los fármacos, lo cual resulta inaccesible para la población de bajo recursos económicos ²³.

El conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces, políticas, estrategias, programas y metodologías que proporcionen una adecuada vigilancia en la elaboración y uso racional de antibióticos ²⁴⁻²⁸.

El Perú, posee una gran biodiversidad en cuanto a flora, siendo alrededor de 300 mil especies vegetales consideradas de uso medicinal y muchas de ellas han sido empleadas por nuestros ancestros en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos ²⁹⁻³² pero, en cuanto a estudios farmacológicos y principios activos de las plantas medicinales en la Amazonía peruana aún son escasos, por lo que existe poca información científica que determine la sensibilidad o resistencia a muchos microorganismos.

1.1 *Anacardium occidentale* L. “CASHO”

1.1.1 HISTORIA ^{URL-1}.

Su nombre original es “caju” palabra que proviene de “acajum”, que pertenece a un dialecto indígena de Brasil, se dice que en el año 1558 un monje y naturalista francés llamado André Thevet, ya hace referencia en sus relatos e ilustraciones a las plantas y su fruto. Cuando llegaron los colonizadores portugueses les llamó mucho la atención las propiedades nutricionales de sus nueces, se dice que los portugueses llevaron las semillas a La India para 1568 y a partir de aquí fue introducido en el sudoeste asiático, llegando a África en la segunda mitad del siglo XVI.

Las primeras importaciones de semillas desde la India fueron hechas por los Estados Unidos en el año 1905. Entre este año y 1914 ocurren las exportaciones de semillas a Francia e Inglaterra. Para 1923 la India exportaba 45 toneladas de semillas hacia los Estados Unidos, en aquella época, el viaje entre la India y Norteamérica tenía una duración aproximada de 45 a 50 días.

Ya para 1941 la India crea un monopolio mundial gracias a la exportación de este producto. A causa de la segunda guerra mundial las exportaciones sufrieron una paralización en 1943, pero fue reanudada cuando el gobierno norteamericano permitió el comercio de las nueces desde la India para conseguir su aceite corrosivo ya que era considerado de interés bélico para el país.

En 1956 se creó en Brasil un campo experimental del Instituto de Investigación y Experimentación Agropecuaria del Nordeste con el fin de experimentar con siembras de Merey a gran escala para su posterior estudio. Para 1965 se realizó un trabajo de selección en el campo experimental lleno de plantas para estudiar sus aspectos morfológicos, en 1976 se inició un

programa de desarrollo agronómico de la siembra de semillas de merey injertando genes de una planta de Merey adulta en una planta joven para obtener los frutos en un menor tiempo.

En los años 90 y comienzos del siglo XXI hubo un aumento en las exportaciones de Merey, convirtiéndose en uno de los alimentos con mayor demanda en el mundo.

1.1.2 ANTECEDENTES

Lima, Pastore y Lima (2000) estudiaron la actividad antimicrobiana de los ácidos anacárdicos del aceite de la cáscara de la nuez del *Anacardium occidentale* sobre los organismos de la cavidad bucal como el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida utilis*. Los ácidos anacárdicos obtenidos de los extractos etílicos, presentaron actividad antibacteriana contra los microorganismos citados, pero una mayor actividad inhibitoria ocurrió sobre la bacteria gram positiva *Streptococcus mutans*, considerada predominante en la caries dental. En cuanto a la susceptibilidad de la *Candida albicans* y *Candida utilis* hacia los ácidos anacárdicos, fue determinada por el método de dilución en tubos de ensayo. Después de la incubación respectiva, las fotografías demostraron que el medio de cultivo continuó turbio, por tanto, se observó una débil inhibición en el crecimiento de las levaduras³³.

Ferreira y Viera (2005) evaluaron la actividad antifúngica, in vitro, del extracto de la cáscara del *Anacardium occidentale* sobre las levaduras *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. krusei* y *C. tropicalis* en estudio comparativo con gluconato de clorhexidina al 0,12 %. Los ensayos fueron realizados por la técnica de difusión en agar para la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM). El extracto de la cáscara presentó actividad potencial antifúngica sobre *C. tropicalis* y *C. stellatoidea*, mientras que el gluconato de clorhexidina presentó actividad

antifúngica para todas las levaduras. Los valores de las CMI para el extracto de anacardo fueron 1:8 con halos de inhibición que varían de 12 a 18 mm y para la clorhexidina de 1:16 con halos de inhibición que varían de 11 a 22 mm ³⁴.

Fenner, Hemann, Auler y Kuze (2006) realizaron un levantamiento bibliográfico etnobotánica sobre plantas utilizadas por la población brasilera en tratamiento de signos y síntomas relacionados a infecciones fúngicas. Fueron citadas 409 especies, distribuidas en 98 familias, con mayor concentración en *Fabaceae* y *Asteraceae*. Para las diez especies más citadas, se realizó una búsqueda relativa a estudios de actividad antifúngica en base a datos MEDLINE-PubMed.

Solamente fueron encontrados estudios para *Phytolacca americana* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Mirabilis jalapa* L., *Schinus molle* L. Entre las diez especies más utilizadas, seis corresponden a especies nativas: *Anacardium occidentale* L., *Cecropia peltata* L., *Schinus molle* L., *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Tabebuia heptaphylla* ³⁵.

Brasil, *Abib, Kozlowski y Schwartz* (2007) demostraron la eficacia de los extractos de bardana, tanchagem y anacardo en proporción de 20, 30 y 100 % frente a microorganismos que originan endocarditis bacteriana. Las muestras estudiadas incluían suspensiones de cocos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sp* y *Micrococcus luteus*), bacilos Gram positivos (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*; bacilos Gram negativos (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y muestras de hongo *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* en concentración de 10 células. Placas de agar Muller Hinton fueron sembradas con las suspensiones de microorganismos y discos de papel de filtro fueron embebidos con las sustancias a ser estudiadas. Las placas fueron incubadas a 37°C/48h y luego se determinó el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento microbiano. El producto que presentó mejor acción antimicrobiana fue el propóleo en las

diferentes concentraciones, con acción frente a los cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos y negativos. Dentro de las especies de *Candida*, *C. tropicalis* fue más sensible a bardana y *C. albicans* fue la más resistente. La eficacia de productos naturales en la profilaxis direccionada contra los microorganismos causantes de endocarditis bacteriana *in vitro* fue baja, entretanto, se verificó que entre ellos el propóleo fue el más efectivo³⁶.

Rajesh y col. (2009) intentó identificar los fitoquímicos presentes en el CNSL (del inglés *Cashew Nut Shell Liquid*) con ayuda de un solvente para el extracto. La actividad antifúngica de acetona, etanol y acetato de etilo de los extractos de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Curvalaria sp.* y *Fusarium sp.* fueron estudiados. En distinto rango del espectro antimicótico observados se comparó con los fitoquímicos presentes. Se concluyó que los extractos de etanol poseían un amplio espectro y mayor porcentaje de actividad antifúngica³⁷

Pino y Stashenko (2009) evaluaron *in vitro* los extractos totales de 27 plantas usadas contra infecciones, mediante la técnica de dilución en agar, para convalidar la actividad de diferentes dosis frente a *Staphylococcus aureus*, como control positivo se usó sulfato de estreptomicina 10 µg/mL y como control negativo, agar Mueller Hinton; las lecturas se realizaron luego de 24 horas. Las pruebas se realizaron en tres tratamientos para cada extracto probado, por triplicado cada uno. Los resultados mostraron 52 % (14) de las muestras con inhibición total frente a *S.aureus*.³⁸

1.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchior (1964)³⁹, su clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: ANGIOSPERMAE
SUB DIVISION	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	: SAPINDALES
FAMILIA	: ANACARDIACEAE
GÉNERO	: <i>Anacardium</i>
ESPECIE	: <i>occidentale</i>
NOMBRE CIENTIFICO	: <i>Anacardium occidentale</i> ^{40, 41}
NOMBRES COMUNES	: Casho (Perú), marañón, cashew (Colombia), acajuiba, acajaiba, marañón (Brasil), merey (llanos de Colombia y Venezuela), cashew nut (islas de las Antillas), cashew apple (Hawai), Cajueiro, anacardo, cashu, caju, Acajou, acaju, alcayoiba, anacarde, anacardier, cacajuil, Cajou, gajus, jocote, Acajou d'Noix, pomme Cajou (Haití) ^{42, 43} .

1.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA⁴³.

Anacardo es un árbol multipropósito de la Amazonía que crece hasta 15 m. de alto. Tiene un tronco espeso y tortuoso con ramas tan serpenteantes que con frecuencia llegan al suelo. Actualmente todos sus componentes han sido utilizados en diferentes áreas, desde la elaboración de dulces y cosméticos, hasta la creación de medicamentos para tratar diferentes enfermedades.

Estos árboles, a menudo se encuentran cada vez más salvaje en los suelos arenosos en las llanuras centrales de Brasil y se cultivan en muchas partes de la selva amazónica. La vida de un árbol de casho es de

aproximadamente unos 30 años y produce frutos desde el tercer año de vida.



Figura N°01: Árbol de *Anacardium occidentale* L. (casho),

Referencia: autores

Tronco: Posee un tronco corto, tortuoso y con ramificación dispersa, así como una copa amplia en edad productiva. Su corteza, de color gris a pardo claro, contiene una savia lechosa.



Figura N°02: Tronco de *Anacardium occidentale* L. (casho),

Referencia: autores

Hojas: alternas, de pecíolo corto, de forma ovada u ovada-oblonga con base en cuña u obtusa y redondeada o ensanchada; algunas veces el ápice es muy obtuso, entero, coriáceo, pinatinervado con venas transparentes, de color verde oscuro o verde amarillento y brillante en el haz, verde brillante y opaco en el envés, liso en ambas superficies, de 7-20 cm. de

largo y 4-12 cm. de ancho. Los pecíolos son aplanados con la base un tanto dilatada y generalmente de color café y de 1-1,5 cm. de largo.



Figura N°03: Hojas de *Anacardium occidentale* L. (casho), Referencia: autores

Flores: se presentan en corimbos en un lado en las ramas de una terminal; son erectas, corimbiformes, anchas, fragantes, con flores bisexuales y masculinas presentándose intermezcladas; el panículo es de 15-85 cm. de largo. Los 5 sépalos son lanceolados en forma angosta, agudos, de color verde intenso y densamente pubescentes externamente, de color verde-amarillento por dentro y de 0,3-0,4 cm. de largo.



Figura N°04: Flores de *Anacardium occidentale* L. (casho), Referencia:
Autores

Pedúnculo o Pseudo-Fruto: Es la parte de la planta que se consume como fruta fresca. Se trata de un pedúnculo engrosado, con forma de pera, que mide de 4 a 8 cm. de largo, y posee una pulpa carnosa y jugosa. En su extremo se ubica el fruto verdadero con forma de nuez.



Figura N° 05: Pseudo-Fruto del *Anacardium occidentale L.* (Casho) [URL-2](#).

Fruto: Son nueces profundamente reniformes, de color verde-grisáceo, de brillo tenue, de 2,5-3 cm. de largo y 2-2,5 cm. de ancho [URL-2](#).



Figura N° 06: Se muestra el fruto del *Anacardium occidentale L.* (Casho)

1.1.5 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL:

1.1.5.1 Pseudo fruto:

Tiene un alto contenido de proteína y puede llegar a tener hasta cinco veces más el contenido de vitamina C que puede tener un cítrico. Además es muy perecedero, se deteriora en menos de 24 horas después de recolectado, lo atacan principalmente hongos y levaduras. Se ha determinado que se puede almacenar hasta por cinco semanas a 0-1,6 °C, y a una humedad relativa de 85 % a 90 %. El jugo es astringente y ácido pues tiene un alto contenido, 35 % de taninos y un 3% de una sustancia grasosa ⁴⁴.

Composición Nutricional de 100 gramos de parte comestible (pulpa de pseudo fruto) contienen:

Tabla N° 01: Composición Nutricional del pseudo fruto

COMPUESTO	CANTIDAD
Calorías	45 g
Agua	84.4 – 88.7 g
Carbohidratos	9.08 – 9.75 g
Grasas	0.05 – 0.50 g
Proteínas	0.101 – 0.162 g
Fibra	0.4 – 1.0 g
Cenizas	0.19 – 0.34 g
Calcio	0.9 – 5.4 mg
Fósforo	6.1 – 21.4 mg
Hierro	0.19 – 0.71 mg
Tiamina	0.023 – 0.03 mg
Riboflavina	0.13 – 0.4 mg
Niacina	0.13 – 0.539 mg
Ácido ascórbico	146.6 – 372 mg

Fuente: Fruits of warm climates ⁴⁵

1.1.5.2 Nuez:

La nuez del anacardo constituye más o menos un tercio del peso del fruto y su análisis indica un contenido de 55-60 % de aceite, 15-20 % de proteínas y el 5 % de carbohidratos (almidón y azúcar). El tejido interno de la concha que rodea la semilla contiene una savia muy aceitosa, sumamente cáustica, de color café oscuro y sabor picante que contiene un principio tóxico denominado "Cardol"⁴⁴.

1.1.5.3 Semilla de Marañón.

Tabla N° 02: Composición de la Semilla del pseudo fruto

COMPUESTO	CANTIDAD
Almendra	20-25
Cutícula	2-2.5
Cáscara o concha	18-23
Líquido de la cáscara	45-50

Fuente: Ficha técnica: industrialización del marañón ⁴⁶.

1.1.5.4 Valor Nutricional Porcentual De La Nuez Y De Los Ácidos Grasos Del Aceite De Marañón.

Tabla N° 03: Valor Nutricional porcentual de la Nuez y de los ácidos grasos del aceite del marañón.

COMPUESTO	CANTIDAD
SEMILLA	
Agua	5.0 g
Aceite	50.0 – 60.0 g
Proteínas	18.0 – 20 g
ACEITE	
Palmítico	11.7 g
Oleico	74.6 g
Linoléico	6.9 g

Fuente: Ficha técnica: industrialización del marañón ⁴⁶.

1.1.6 COMPOSICION FITOQUÍMICA

La familia *Anacardiaceae* es conocida por sus fenoles y sus ácidos fenólicos que causan serias irritaciones en la piel: anacardol, ácido anacárdico y sus derivados; también es común en la familia la presencia de terpenos, politerpenos y taninos. En la especie *A. occidentale* los principios responsables de las propiedades irritativas del aceite de la corteza del anacardo son primariamente el cardol y el ácido anacárdico ⁴⁶.

En general se considera que los principios activos de esta especie son, por una parte, un flavonoide, la catechina, que es un depresor del sistema nervioso central, y por otra, los taninos que actúan como antiinflamatorios y analgésicos. Las hojas contienen ácidos fenólicos; hasta un 3 % de aceite esencial; un 10 % de minerales; heterósidos derivados de la luteolina y apigenina; tanino y principio amargo. El aceite esencial, que es incoloro y de sabor picante, tiene mentol, mentona, acetato de mentilo, alfapineno, felandreno, cardineno, timol, carvacrol, alcohol amílico, terpineno, alcohol isoamílico, cineol, mentofurano, ácido isovalérico, isovalerianato de metilo y otros ⁴⁶.

Las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho) presentan el tamizaje fitoquímico del extracto fluido y de la tintura al 20 % presenta una gran variedad de metabolitos secundarios, en especial, cumarinas; los demás metabolitos se identificaron en menores proporciones, como saponinas, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos libres, triterpenos/esteroides, fenoles/taninos ^{2, 3, 47}.

Tabla N° 04. Tamizaje Fitoquímico del extracto fluido y de la tintura al 20 % de hojas de *Anacardium occidentale L.*

Ensayos de identificación	Extracto fluido	Tintura al 20%
Fenoles/taninos	+	+
Flavonoides	+	+
Aminoácidos libres	+	+
Quinonas	-	-
Triterpenos/esteroides	+	+
Cumarinas	++	++
Resinas	-	-
Antocianidinas	+	+
Azúcares reductores	+	+
Alcaloides (M)	-	-
Alcaloides (W)	-	-
Saponinas	+	+
Principios amargos	-	-

-: negativo, +: positivo.

Tabla N° 05. Tamizaje Fitoquímico del extracto n-hexánico, clorofórmico y acetato de etilo obtenidos de la tintura al 20% de hojas de *Anacardium occidentale L.*

Ensayos (metabolitos)	Extractos		
	n- hexánico	clorofórmico	Acetato de etilo
<i>Borntrager</i> (quinonas)	-	-	-
$FeCl_3$ (fenoles/taninos)		-	-
<i>Shinoda</i> (flavonoides)		-	-
<i>Baljet</i> (cumarinas)	-	+	+
<i>Mayer</i> (alcaloides)	-	-	-
Ninhidrina (aminoácidos libres)		-	-
<i>Fehling</i> (azúcares reductores)		++	+++

-: negativo, +: positivo

En el tamizaje fitoquímico (ver tabla N°05) se observaron cumarinas y azúcares reductores (+++) en los extractos clorofórmico y acetato de etilo, se debe destacar que las cumarinas no se encontraron en el extracto n-hexánico ^{2,47}.

Tabla N° 06. Composición Química de la nuez de *Anacardium occidentale L.*, (cacho)

Composición Química	
Ácido anacárdico	82 – 83.06 %
Anacardol o Cardanol	1.6 – 1.77 %
2 Metil-Cardol	2.6 – 2.76 %
Cardol	13.8 – 14.59 %

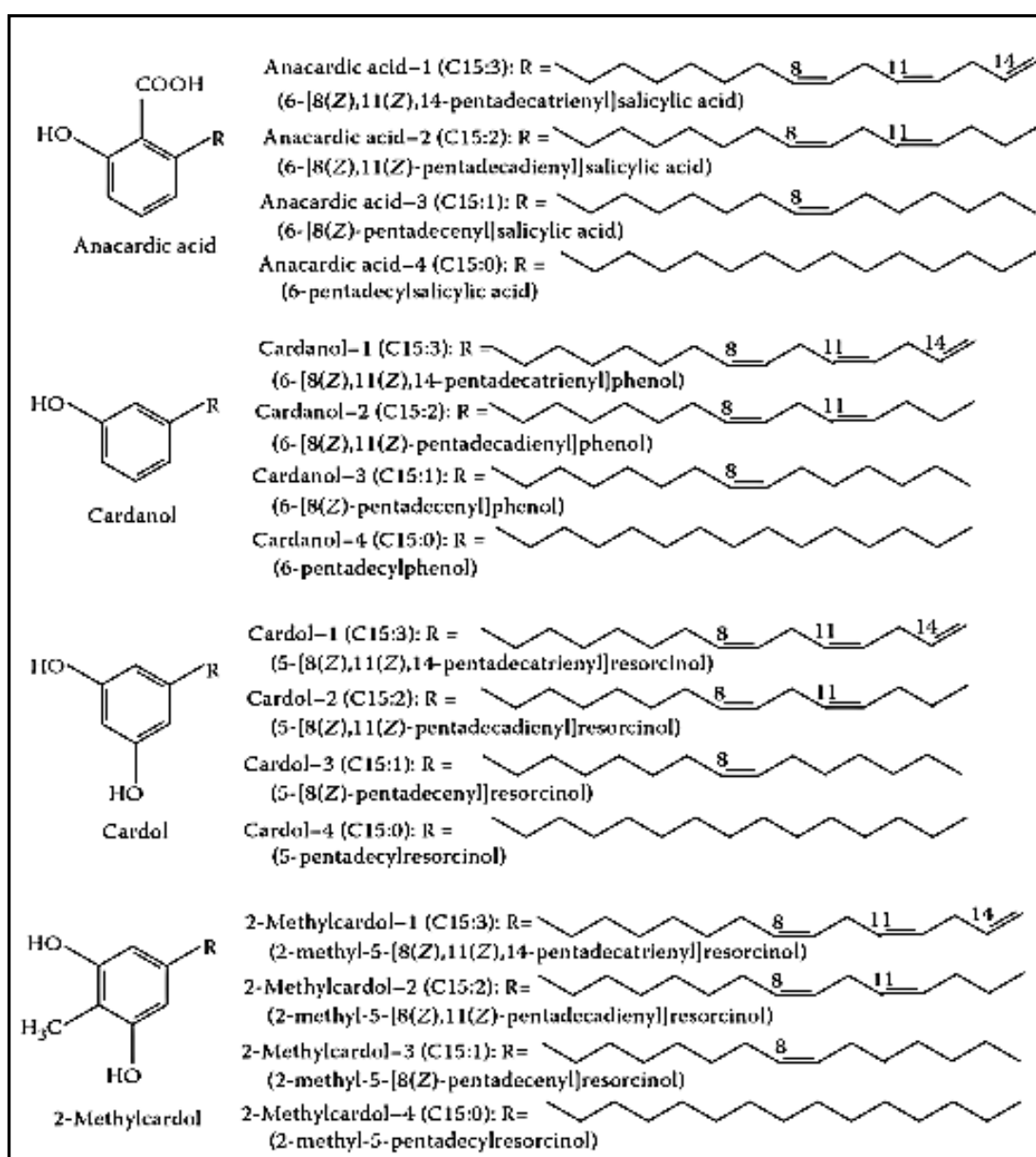


Figura N° 07. Estructuras químicas del Ácido Anacárdico, cardanol, cardol y 2-metil-cardol

Además el ácido anacárdico es el mayor componente fenólico que está presente en el los líquidos de la cascara de la nuez del casho (*Anacardium Occidentale* L.), representa aproximadamente el 80 al 85 %^{48, 49}, además tiene derivados como cardanol, cardol y metilcardol (ver figura N°07)⁵⁰.

El aceite de la nuez del casho contiene α -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol, además de fitosteroles como stosterol, campesterol, stigmasterol y fitostanoles como sitostanol, campestanol y Δ^5 -avenasterol (ver Figura N° 08)

El fruto del casho es conocido por sus componentes aromáticos volátiles, Deborah *et al* (2003) identificó 76 componentes volátiles del jugo del fruto del casho, predominando esteres (42%), además de aldehídos⁵¹. Resultados similares encontrados por Maciel *et al* (1986)⁵² y Bicalho *et al* (2000)⁵³. Los mayores componentes fueron etil 3-metil butanoato (16.70%), *trans*-2-hexenal (14.27%), metil 3-metil butanoato (9.72%), 2-metil-2-pental (9.27%), etil butanoato (8.47%), hexanal (7.68%), 2-butoxi-etanol (3.35%), 3-metil-1-butanol (3.23%) y 2-metil ácido butanóico (3.01%)⁵¹.

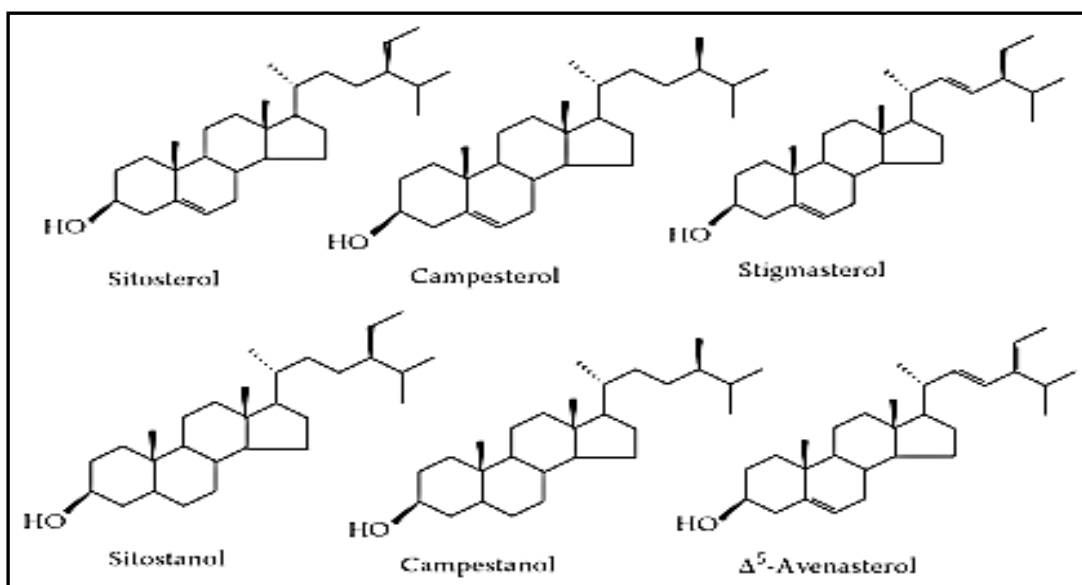


Figura N° 08. Estructuras químicas de los fitosteroles y fitostanoles identificados en el aceite de la nuez del *Anacardium occidentale* L. (casho).

Las hojas han dado respuestas positivas a las pruebas que determinan la presencia de alcaloides^{54, 55}. Además las hojas contienen como caroteno β -cryptoxantina⁵⁶.

1.1.7 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS

Además es bien conocido que la especies de *Anacardium* son conocidos por sus efectos antiinflamatorios y astringentes, actividad contra células cancerígenas y efectos beneficiar para úlceras gastrointestinales⁵⁷⁻⁵⁹.

Se ha reportado que el ácido anacárdico puede tener actividad antihelmíntica; igualmente se ha descrito la presencia de varias toxinas. Se han realizado varias investigaciones experimentales con esta droga vegetal para probar algunos efectos; así se han reportado resultados sobre las propiedades hipoglicemiantes y antihipertensivas en ratas. El extracto exanoico de la cáscara de la nuez de *A. occidentale* fue efectivo en pruebas realizadas como moluscicida contra babosas (*Biomphalaria glabrata*). También se ha probado la actividad antiinflamatoria de la epicatequina aislada de *A. occidentale* en comparación con la fenilbutazona, con resultados positivos. Algunos componentes del ácido anacárdico demostraron una moderada toxicidad. De *A. occidentale* se ha extraído un aceite del cual se ha separado la sal de sodio del ácido anacárdico; este aceite mata rápidamente las formas vegetativas de bacilos anaeróbicos, por ejemplo *Proteus*. El anacardato de sodio destruye *in vitro* los venenos de serpientes (*Crotalus* y *Bothrops atrox*), así como también las toxinas tetánica y diftérica. Los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales experimentales, validan algunos usos populares de esta planta. Se carece de información sobre estudios clínicos en humanos⁴⁶.

El ácido anacárdico, aislado por *Waaerman y Dawson (1948)*⁶⁰, se está utilizando como materia prima para la industria farmacéutica como coadyuvante para los efectos colaterales presentado por el ácido acetil

salicílico ⁶¹; La estructura peculiar de la lactona macrocíclica de 12 miembros (Lasiodiplodina) (ver figura N°09) estimuló al estudio de la síntesis a partir de su precursor del ácido anacárdico, por sus propiedades hormonal anabolizante en animales ^{62, 63}. Además la Zaeralona tiene como precursor al ácido anacárdico ⁶⁴, cuyo potencial biológico es su actividad Anti leucémica ⁶⁵(ver figura N°09).

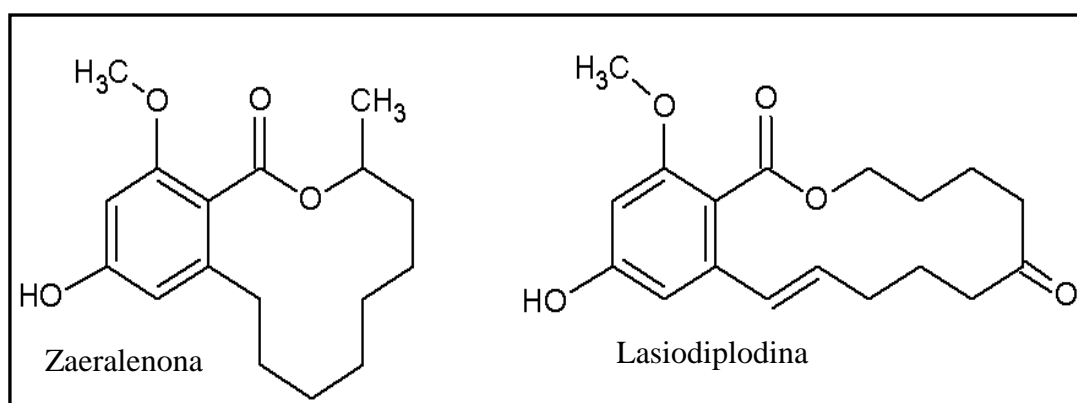


Figura N° 09. Estructuras químicas de la Zaeralona y Lasiodiplodina.

Kubo (1986, 1991, 1993) han observado que algunos de los componentes extraídos de la fruta del casho poseían una actividad citotóxica, con potencial anticancerígena. Sin embargo, la mayor atención se dirige hacia el aceite de nuez ^{58, 66-69}, este aceite representa el 25 % del peso total de la nuez (de 5 a 6 gr en promedio) ⁷⁰.

El Cardol (Alquil-5, 2,3-difenoles), ha demostrado ser uno de los componentes más activos, posee actividad antibacteriana principalmente contra las bacterias Gram +, en particular, las cadenas largas permiten el logro de un valor óptimo de la relación entre el carácter hidrófilo e hidrófobo, que es necesaria para una alteración eficaz de la permeabilidad de la célula bacteriana.

El Cardol también posee actividad inhibitoria de la actividad de la tirosinasa. Esta capacidad puede ser explotada para controlar la proliferación de insectos y luego como conservante de alimentos ⁷¹.

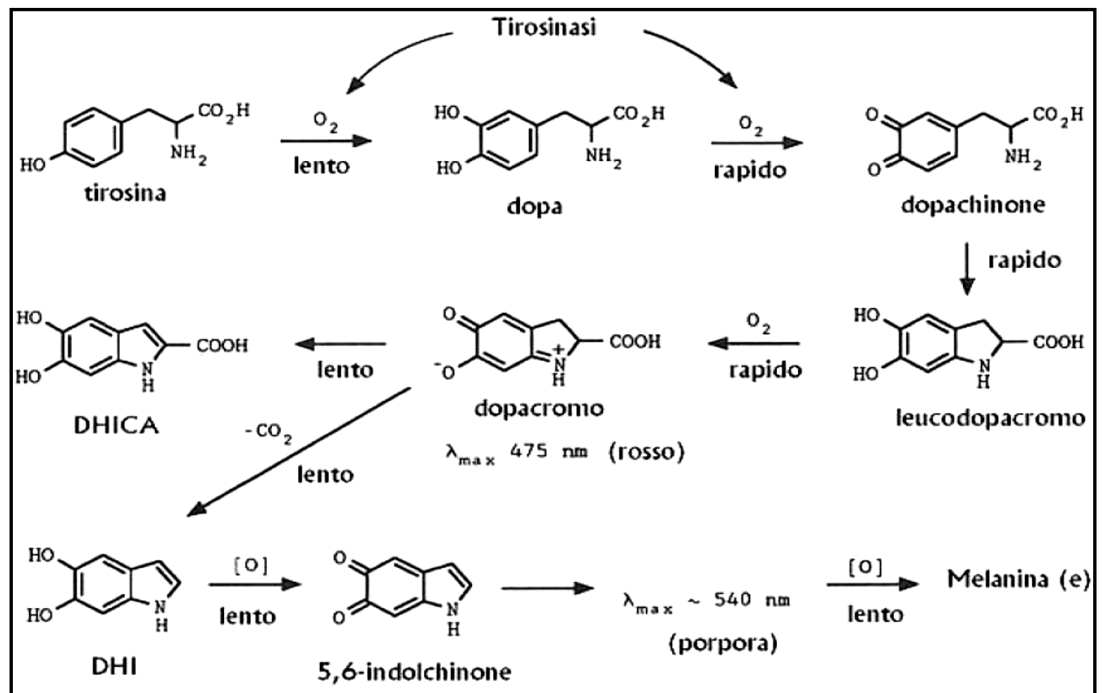


Figura N° 10. Patrón clásico de la melanogénesis según Raper-Mason

El Cardol, de manera similar a algunos derivados de la cumarina, han demostrado ser uno de los componentes más activos como inhibidores de la tirosinasa, la enzima clave en el proceso de melanogénesis, sin embargo, debido a su notable poder irritante no se puede utilizar como tal, teniendo en cuenta sí misma una gran actividad ⁶⁹ (ver figura N°10). En particular, su actividad inhibidora se expresa en el bloqueo de la conversión oxidativa de dopa a dopaquinona (ver figura N°11)

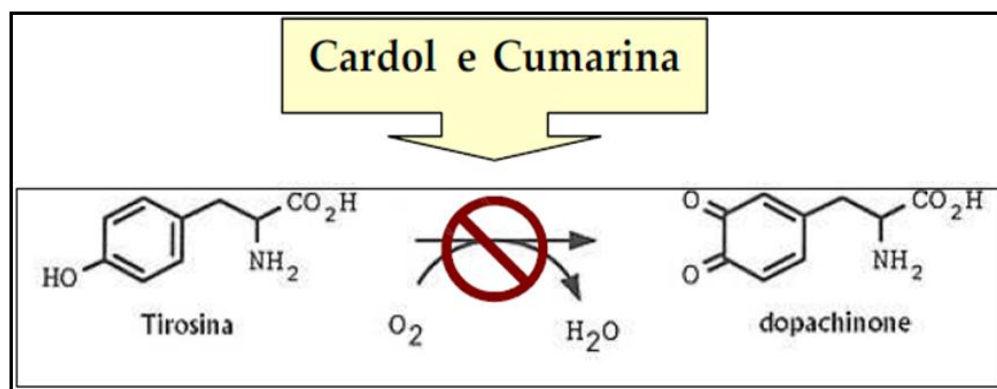


Figura N° 11. Bloqueo de la conversión aeróbica de tirosina

Laurens et al (1997) demostró las propiedades larvicida del aceite de la nuez del casho y calculo la CL₅₀ en larvas de *Aedes aegypti* con 12.6 ppm⁷².

Farias et al (2009) realizo la toxicidad del aceite de la nuez del casho en los estadios inmaduros de *Aedes Aegypti*, encontrando alta efectividad contra huevos, larvas y pupula⁷³. No hay publicaciones que evidencie el efecto larvicida del aceite de la nuez del casho sobre estadios inmaduros del mosquito anopheline⁷⁴. El látex del casho contiene heteropolisacáridos complejos identificados como: β-D-galactosa (72%), α-D-glucosa (14%), arabinosa (4.6%), ramnosa (3.2%) y ácido glucurónico (4.7%)⁷⁵.

Se ha reportado que el ácido anacárdico puede tener actividad antihelmíntica; igualmente se ha descrito la presencia de varias toxinas. En la especie *A. occidentale* los principios responsables de las propiedades irritativas del aceite de la corteza del anacardo son primariamente el cardol y el ácido anacárdico⁷⁶.

1.1.8 USO TRADICIONAL

Se cultiva como árbol ornamental y frutal. Su fruto se consume tostado y el pedicelo maduro se consume fresco. En Costa Rica también se obtiene vinagre, vino y conservas del casho⁷⁷. Entre sus propiedades medicinales destaca el uso del jugo como antidiarreico, el aceite de la semilla para eliminar las verrugas, la decocción de la corteza como antidiabético⁷⁸, la goma exudada de la corteza para retener lectinas⁷⁹ y los retoños de las hojas para tratar enfermedades renales⁸⁰.

El ácido anacárdico, el cardanol y el cardol son componentes estudiados del líquido de la cáscara de la semilla del casho, con los cuales se han obtenido películas por polimerización⁸¹.

Las globulinas de la nuez del casho disminuye el colesterol sanguíneo ⁸². Al igual que en el maní, las nueces y el ajonjolí, también se ha detectado la presencia de aflatoxinas ⁸³ y de alergenicos proteicos ⁸⁴, en la nuez del casho.

Por otro lado, Los extractos de polen se han vinculado con alergias asmáticas durante la floración del casho en Brasil ⁸⁵ y se conocen casos de dermatitis por contacto ⁸⁶. La aplicación de derivados apícolas del casho en apiterapia, luce prometedora porque tiene numerosas propiedades terapéuticas por la riqueza en compuestos fenólicos; sin embargo podría ser controversial por las evidencias de alergenicos recién mencionadas.

1.1.9 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es originaria de la zona tropical de Brasil. El género tiene un centro primario de diversidad en la Amazonia y uno secundario en Plan Alto, Brasil. Se extiende por todos los trópicos del Nuevo y del Viejo Mundo. Desde el sur de México hasta Perú y Brasil, de Cuba a Trinidad. Se le cultiva en la India y Malasia. Su límite geográfico (zonas cultivadas) va de los 27° N a los 28° Sur ^{21,23-27, 78, 87}.

1.2 MÉTODO DE SUSCEPTIBILIDAD - DISCO DE DIFUSIÓN (Kirby-Bauer)

1.2.1.-INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado muchos métodos específicamente para determinar la actividad antibacteriana de extracto vegetales ⁸⁸⁻⁹¹. El beneficio de basar los nuevos métodos en los ya existentes como los ensayos convencionales del “National Committe for Clinical and Laboratory Standards” (NCCLS), es que los nuevos ensayos tenderán a ser más fácilmente aceptados por cuerpos regulatorios ^{89, 90}. El NCCLS es un

subcomité desarrollado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), un centro de colaboración de la Organización Mundial de la Salud (OMS ó WHO por sus siglas en inglés) cuya función es estandarizar y acreditar las pruebas clínicas y que fue creado en 1967.

El NCCLS se encarga de determinar y en su caso mejorar, la calidad de los resultados de laboratorio identificando la necesidad, prioridad y manejo del desarrollo de los protocolos y guías en los laboratorios clínicos y manufactureros para que estos puedan caracterizar y mejorar los sistemas analíticos. Así mismo, cubre otras funciones: mejorar y estandarizar los procedimientos de control de calidad y la interpretación de los resultados de prueba en los laboratorios clínicos microbiológicos; establecer un criterio de proceso para los medios de cultivo, procedimientos automatizados o métodos de prueba en la microbiología clínica; y mejorar el manejo de los servicios clínicos y de laboratorio en bien del paciente. Además, los métodos del NCCLS se han diseñado específicamente para asegurar la actividad de los componentes antimicrobianos, y los factores que afecten la reproducibilidad se han investigado exhaustivamente ⁹². Aun cuando los métodos del NCCLS se han desarrollado para agentes antimicrobianos convencionales, se pueden hacer modificaciones menores para que estos métodos puedan ser usados para probar la efectividad de aceites esenciales y extractos vegetales ⁸⁹. La técnica actualmente utilizada para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales desde hace más de dos décadas enfocados a normatizar el método.

El comité de expertos de la OMS y grupos colaborativos internacionales dirigidos por *Ericsson* y *Sherris* sugirieron recomendaciones que fueron seguidas por la mayor parte de los países europeos. Sin embargo, la falta de un acuerdo general sobre los puntos de corte para la interpretación de estas pruebas continúa siendo un tema de importantes esfuerzos internacionales. Europa está dividida en varias regiones de influencia con

diferentes sistemas de sensibilidad antimicrobiana: Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos, el Sistema DIN, el de los países bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de Microbiología y el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS). En nuestro país y en la mayoría de los países latinoamericanos se siguen las pautas del NCCLS con algunas modificaciones.

1.2.2.- PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio.

El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño y fase de crecimiento del inóculo. Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente. El método recomendado por la NCCLS (Sub-committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se basa en los estudios de *Bauer* y colaboradores⁹³. Este es el método descrito de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio. El único método alternativo que ha sido estudiado adecuadamente y que demostró datos comparables de los diámetros de las zonas de inhibición, con precisión

similar y correlación satisfactoria con la CMI, es la modificación de doble capa de Barry, García y Thrupp^{93,94}.

Este método es una alternativa aceptable para la normalización del inóculo en las pruebas de sensibilidad de aislamientos de gérmenes patógenos de rápido crecimiento, como *S. aureus*, Enterobacterias y *P. aeruginosa*. El método de doble capa en agar no es aplicable a las pruebas con otros microorganismos tales como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., etc.

Las pruebas por cualquiera de los dos métodos pueden interpretarse con las mismas tablas de medida de los halos de inhibición si los resultados de las pruebas con las cepas controles se encuentran dentro de los rangos esperados.

1.2.3.-MACRODILUCIÓN EN CALDO

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método^{89, 93, 94}. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo; su fundamento consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CMI

1.2.4.- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria de un agente antimicrobiano es aquella que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible en una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina incubando una cantidad conocida de bacterias en presencia de diluciones definidas del agente antimicrobiano, posteriormente se hacen los conteos correspondientes para determinarla.

Ésta es probablemente la prueba de determinación de CMI más popular. Utilizando los criterios del NCCLS, los resultados son interpretados como microorganismo sensible (tratable), intermedio o resistente (intratable)⁹⁴.

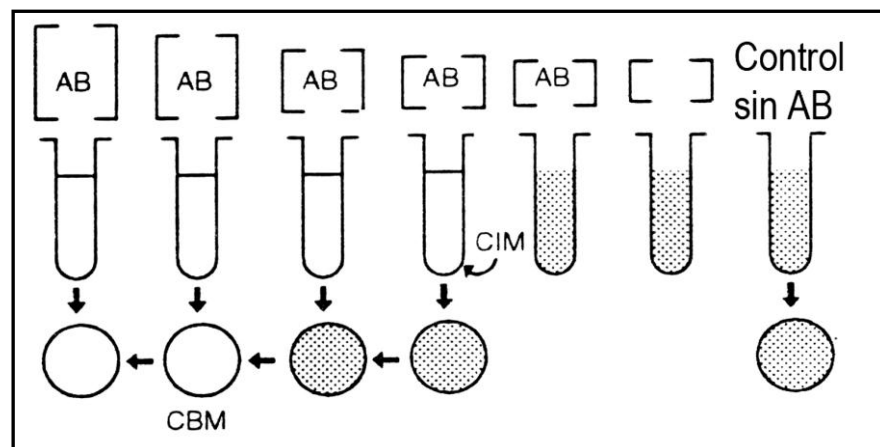


Figura N° 12. Relación entre los puntos de quiebre (break point) y el halo de inhibición en la técnica de antibiograma

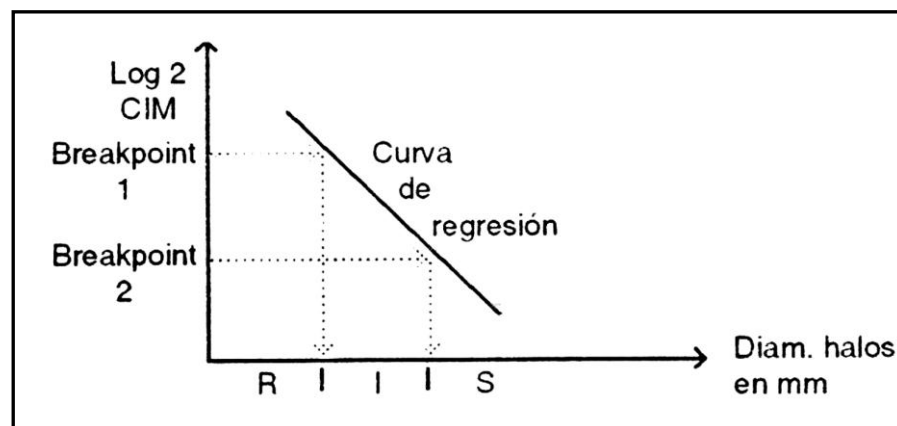


Figura N° 13. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

1.2.5.- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LA CMI

La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en $\mu\text{g/ml}$. Luego se debe recurrir, teniendo en cuenta el valor de CMI obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CMI que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico ⁹⁵.

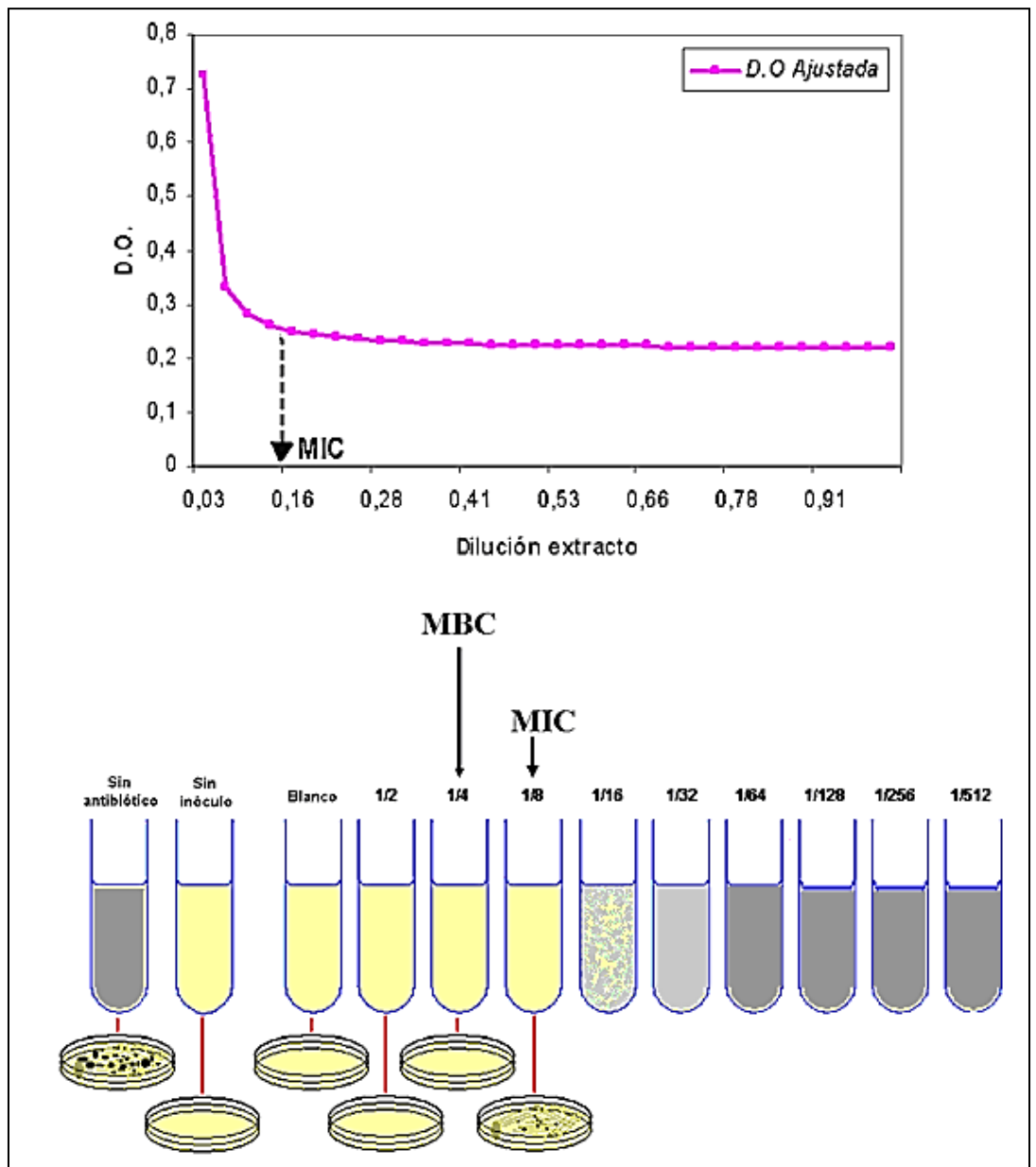


Figura N° 14. Determinación e interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM)

1.3 PATRON DE TURBIDEZ

Uno de los primeros usos de la turbidez para el cálculo de poblaciones bacterianas fue en la preparación de vacunas⁹⁶. En 1907 McFarland desarrollo una serie de soluciones de sulfato de bario para calcular aproximadamente el número de bacterias en soluciones de turbidez equivalente, según lo determinado por los recuentos en placas^{97,98}.

Los **estándares de turbidez de McFarland** se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10(Ver tabla N°07). Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos⁹⁹, para asegurar la densidad correcta se puede controlar usando espectrofotómetros¹⁰⁰.

Los estándares pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias en salina estéril o en caldos. Si la suspensión es demasiado turbia, puede añadirse diluyente, y si no es lo suficiente turbia, se puede agregar más bacterias. La ventaja es que no es necesario incubar ni usar equipo especial para estimar el número de bacterias¹⁰¹. La desventaja de este método es que no discrimina a las bacterias vivas de las muertas en la solución, por lo que se puede sobreestimar la población de bacterias.

Casos específicos en los que se usa es en el de antibiogramas o pruebas de sensibilidad, donde es necesario para estandarizar el método y se eviten falsos positivos o negativos.

Tabla N°07: Escala de McFarland de 0.5 a 10

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

1.4 Staphylococcus

1.4.1.- INTRODUCCION

Staphylococcus es un colonizador de la piel y mucosas de prácticamente todos los animales. En los seres humanos tiene especial predilección por las fosas nasales, especialmente en adultos, pudiendo demostrarse hasta en el 40%, tanto en población comunitaria como hospitalaria. Otra característica es su facilidad para producir infección intracelular lo que explicaría su tendencia a producir infecciones tardías, por lo que siempre deben considerarse en los casos de infección tardía de material de osteosíntesis o en las osteomielitis crónicas, obligando, por su difícil erradicación, a tratamientos más prolongados que generalmente precisan de la adición de rifampicina ¹⁰².

Las especies del genero *Staphylococcus* son cocos gram positivos que miden Entre 0,5 y 1,5 μm de diámetro y que pueden aparecer formando racimos Irregulares o aparecer de manera única, en parejas, tetradas o cadenas cortas. El nombre actual data de 1883 cuando Ogston utilizo por primera vez el nombre de *Staphylococcus*, que deriva del griego staphylé que significa racimo de uvas. Son microorganismos no móviles, no formadores de esporas y generalmente sin capsula con reacción catalasa positiva. Muchas especies son anaerobios facultativos. ^{103, 104, 105}.

1.4.2.- ESPECIES DE STAPHYLOCOCCUS

Existen 33 especies de *Staphylococcus* diferentes. De las 33 especies sólo tres de ellas se reconocen como productoras de enfermedades en los seres humanos ^{URL-3}:

- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Staphylococcus epidermidis*
- ✓ *Staphylococcus saprophyticus*

1.4.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos más importantes que causa desde infecciones superficiales de la piel hasta severas infecciones asociadas con una alta mortalidad ¹⁰⁶. El nicho ecológico principal del *S. aureus* en humanos lo constituyen las fosas nasales anteriores, seguido de la orofaringe y la región perineal, inguinal, axilar y rectal; reconocida como una fuente potencial de infección y factor de riesgo elevado para subsecuentes infecciones invasivas ¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Pocos años después de la introducción de la penicilina en 1942, aparecieron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la misma ¹⁰⁶. En 1960 se introduce la meticilina, antibiótico semisintético resistente a penicilinasas, y luego de solo dos años fue descrito el primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes (SARM) ¹¹¹.

En la década del noventa las infecciones por SARM se extienden a todos los hospitales del mundo ¹¹².

1.4.2.2 DEFINICIÓN TAXONÓMICA.

Taxonomía

Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>aureus</i> ¹¹³

1.4.2.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Es Gram positivo, aunque las cepas viejas o los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativo. Tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, en cadenas o en racimos. Su tamaño oscila entre 0,8 a 1,5 micras de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección.

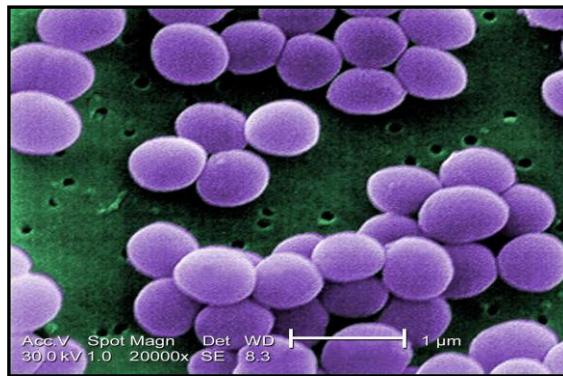


Figura N° 15. Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*, Fuente; CDC Public Health Library (PHIL) ¹¹⁴.

1.4.2.4 METABOLISMO

En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo ¹¹⁴.

Staphylococcus aureus, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial. Abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos. Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La principal función de estas

proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano^{115, 116}.

1.4.2.5 CARACTERISTICA GENETICAS

El genoma de *S. aureus* es circular, compuesto de aproximadamente 2.8 kb, con un contenido bajo de G-C (33%), además su genoma contiene 2,600 marcos de lectura abierta representando un 84.5% de su genoma¹¹⁷.

La comparación del genoma indica que 50% de las proteínas codificadas en el cromosoma de *S. aureus* presentan gran homología con *B. subtilis*, lo que sugiere que ambos organismos tuvieron un ancestro común y divergieron más tarde. La mayoría de los genes homólogos son un grupo de genes conocidos como *housekeeping* que son necesarios para el crecimiento y división de la bacteria. Una característica sobresaliente del genoma de *S. aureus* es la presencia de gran número de elementos móviles (plásmidos, secuencias de inserción y transposones), que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antimicrobianos. El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de conjugación, transformación y transducción del material genético a través de plásmidos móviles¹¹⁸.

Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica. Se conocen varios tipos de transposones como el de la resistencia a eritromicina Tn551 codificado por el gen *ermB*. El transposón Tn 4001 codifica para la resistencia a kanamicina, tobromicina y gentamicina. El transposón Tn 4003 codifica para la resistencia a trimetoprim. El transposón Tn 552 contiene el operon *bla* que le confiere resistencia a la penicilina, a través de la producción de penicilinasas. El transposón Tn 554 se encuentra en el cromosoma de *S. aureus* resistente a meticilina

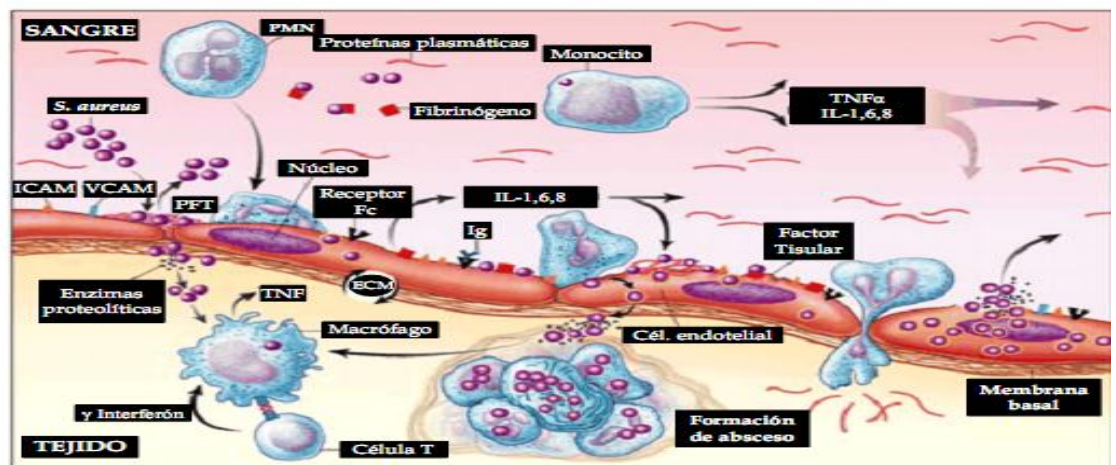
(MRSA), el cual se ha utilizado para el seguimiento de clonas epidémicas de MRSA¹¹⁹⁻¹²².

El análisis del genoma de *S. aureus* confirmó que contiene varias islas de patogenicidad (SaPIs), las cuales varían en tamaño; además, reveló características adicionales como es el contenido de genes de virulencia y de resistencia^{123,124}.

1.4.2.6 FISIOPATOLOGÍA

Bajo condiciones normales, *Staphylococcus aureus* no produce infecciones, esto sólo ocurre en pacientes, inmunocomprometidos, es decir, la persistencia de la bacteria en el huésped con lleva a riesgos de enfermedad¹²⁵.

El mecanismo de defensa fundamental del huésped es el leucocito. La Expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales facilita la llegada de leucocitos al lugar de la infección, con liberación de diferentes citoquinas en el torrente sanguíneo que posteriormente migran a los tejidos inflamados.



Tomado de Lowy FD (52). ICAM: intercellular adhesion molecules; VCAM: vascular-cell adhesion molecules; PMN: polimorfonuclear; TNF: Factor de necrosis tisular; IL: Interleukinas; Ig: Inmunoglobulinas; Cél: célula; PTF: trombo de plaquetas y fibrina; ECM: matriz extracelular.

Figura N° 16. Mecanismo de defensa del huésped frente a *Staphylococcus aureus*.

Las células endoteliales infectadas producen, además, moléculas de adhesión tipo 1 (CD54), moléculas de adhesión vascular tipo 1 (CD106) y moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)¹²⁶.

La sintomatología durante la infección por *Staphylococcus aureus* es ocasionada por las toxinas pirógenas consideradas como super antígenos, que se unen a regiones invariables del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, moléculas presentadoras del antígeno y a los receptores de las células de linfocitos T. Esto conduce a la liberación de citocinas por ambas células causando daño en los tejidos y liberación de la toxina del síndrome de choque tóxico, dando como resultado hipotensión y liberación de gran cantidad de citocinas¹²⁵.

Aunque in vitro los anticuerpos han demostrado facilitar la fagocitosis su papel in vivo es más dudoso. De hecho los títulos de anticuerpos frente a *Staphylococcus aureus* no se correlacionan con protección frente a la infección excepto en el caso del síndrome del shock tóxico estafilocócico^{103, 104}.

Entre las enzimas encargadas de proteger a *S. aureus* destaca la catalasa que se encarga de desdoblar el peróxido de hidrogeno, toxico para el microorganismo, en agua y oxigeno, la coagulasa convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que produciría una capa de fibrina en el absceso estafilocócico protegiendo de la fagocitosis. La hialuronidasa hidroliza el ácido hialuronico de la matriz del tejido conectivo y la penicilinas hidroliza el anillo β -lactamico, inactivando la penicilina. La toxina mejor caracterizada es la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) descrita en 1932 por Pantón y Valentine se englobaría dentro de los homólogos de las Γ - hemolisinas. Sintetizada por un 2-3% de las cepas, induce la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares y la liberación de mediadores de la inflamación¹⁰⁴.

Staphylococcus aureus tiene en su superficie proteínas conocidas por inhibir la fagocitosis y la opsonización por el sistema del complemento del humano. El reconocimiento del complemento y las inmunoglobulinas por los receptores son bloqueados por la proteína A de la pared celular que se une a la porción Fc de la inmunoglobulina IgG. *Staphylococcus aureus* produce moléculas que pueden inhibir el reclutamiento de neutrófilos, la fagocitosis y el reconocimiento de la bacteria, a pesar de que un número significativo de factores de evasión son empleados por *Staphylococcus aureus*¹²⁵.

Durante el desarrollo de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, los neutrófilos participan reclutando leucocitos en el sitio de la infección, así como el complemento que tiene un papel central en nuestro sistema inmune innato, involucrado en la quimiotaxis, opsonización y destrucción de la membrana celular de los patógenos^{127,128}.

El sistema de complemento puede activarse por tres vías: la clásica, la alterna y la de la lectina. *Staphylococcus aureus* puede activar estas tres vías, sin embargo, se ha observado que el sistema del complemento no es tan eficiente contra la bacteria, por lo que necesitan de otro tipo de células como los neutrófilos, los cuales reconocen a los patógenos a través de los receptores tipo *Toll*. Los neutrófilos expresan receptores tipo *Toll-2*, los cuales reconocen los ácidos tipo teicoicos y el peptidoglicano de las bacterias Gram positivas. Se ha observado que el *Staphylococcus aureus* causa un cambio en los neutrófilos durante la adhesión, alterando la expresión de las proteínas e induciendo un estallamiento oxidativo, así como la degradación de especies y compuestos antimicrobianos, con lo que facilita su supervivencia intracelular. Aunque, se ha reconocido por largo tiempo que *Staphylococcus aureus* puede sobrevivir a un ataque por los neutrófilos¹²³.

Además *Staphylococcus aureus* produce un gran número de factores que promueven su supervivencia en el huésped al mismo tiempo favorece a su patogénesis. Varios de estos factores están involucrados en la inhibición del sistema fagocítico del huésped, habilitando a *Staphylococcus aureus* a resistir a su destrucción por las células del sistema inmune innato del individuo. Quizás una de las características más sobresalientes de *Staphylococcus aureus* es su habilidad para producir una diversidad de toxinas cuyo blanco son las células de la sangre humana. Estas toxinas incluyen la hemolisina- β (Hla), hemolisina- β y hemolisina-y, la leucocidina de Pantón Valentine, y recientemente se descubrió la β -modulina soluble al fenol (PSM- α) tipo péptido^{129,130}.

Otro de los mecanismos que presentan algunas cepas de *Staphylococcus aureus* es la producción de una cápsula polisacárida, especialmente los tipos 5 y 8 con características antifagocíticas. Otras cepas tienen diferentes mecanismos que le permiten evadir los sistemas de defensa del huésped, desarrollando abscesos. Otro factor es una proteína de superficie A (MSCRAMM) que tiene la capacidad de unirse a la fracción Fc de la inmunoglobulina IgG, inactivando la actividad opsonizante de la inmunoglobulina, también puede producir una proteína inhibidora de la quimiotaxis (Chip), o la proteína de adherencia extracelular (Eap) que impiden la quimiotaxis y la extravasación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Dentro de éstas, se encuentran las hemolisinas, especialmente la hemolisina-alfa, toxinas y la leucocidina Pantón-Valentine, las cuales tienen relevancia en las infecciones adquiridas en la comunidad^{125,131}.

Las cepas CA-MRSA han intensificado sustancialmente su habilidad para evadir la respuesta inmune matando los neutrófilos humanos y lisándolos, lo cual ocurre más rápido seguido de una fagocitosis por cepas CA-MRSA comparadas con las cepas HA-MRSA¹²⁵.

1.4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

La identificación de *Staphylococcus aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa. Sin duda, la prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada. Se basa en la capacidad de *Staphylococcus aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo de las demás especies de estafilococos coagulasa negativos. Con la prueba de la ADNsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene ADN y verde de malaquita. Otras pruebas son específicas de especie como la fermentación del manitol y la producción de la fosfatasa alcalina¹³².

Staphylococcus aureus también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas. En ocasiones, se requiere identificar cepas o grupos de cepas con fines epidemiológicos para lo cual se pueden emplear técnicas fenotípicas y genotípicas¹³².

1.4.2.8 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Staphylococcus aureus*

Las infecciones causadas por *S. aureus* se producen por lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos. Las infecciones por *S. aureus* son supurativas y tienden a producir abscesos^{118, 133, 134}. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como

infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales.

Infecciones de la piel y tejidos blandos:

Se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas, las cuales comienzan en los folículos pilosos propagándose a tejidos vecinos. La foliculitis es una infección piógena superficial. Su extensión al tejido perifolicular da lugar al forúnculo. El ántrax es la infección de varios forúnculos con extensión a la capa más profunda del tejido subcutáneo, que puede producir bacteriemia en un tercio de los casos. Otras infecciones cutáneas ocasionadas por *S. aureus* son el impétigo (infección superficial que afecta sobre todo a niños en áreas tropicales), mastitis, hidrosadenitis supurada, celulitis fascitis y paroniquia.

S. aureus es uno de los patógenos que se observa con mayor frecuencia en infecciones de heridas quirúrgicas, tanto superficiales como profundas, así como también está implicado en las infecciones de úlceras crónicas como el pie diabético. *S. aureus* es causa común de bacteriemia, el foco inicial se desconoce.

Bacteriemias:

Las bacteriemias por *S. aureus* que se presentan en los hospitales se relacionan con el uso de catéteres y otros procedimientos invasivos, mientras que las bacteriemias de la comunidad, el foco que las origina suele ser extravascular (infecciones de piel, ocasionalmente el aparato respiratorio y neumonías). Las infecciones metastásicas y la endocarditis son complicaciones

importantes de la bacteriemia. La frecuencia de endocarditis en pacientes con bacteriemia por *S. aureus* oscila en 5 a 20%, según sean los pacientes con bacteriemia hospitalaria o adquirida en la comunidad. *S. aureus* es la causa más frecuente de endocarditis infecciosa aguda, afecta sobre todo a la válvula mitral y aórtica, ya sea nativas o protésicas, entre las complicaciones por endocarditis por este patógeno están la insuficiencia cardiaca por diseminación valvular, embolismo séptico, abscesos hematógenos cerebrales o viscerales, abscesos miocárdicos y pericarditis purulenta. *S. aureus* también se encuentra en pericarditis; generalmente es de origen hematógeno, aunque también puede ocurrir tras cirugía en cuyo caso es de pronóstico grave, también puede deberse a un traumatismo penetrante.

Infecciones músculo-esqueléticas:

S. aureus es una de las bacterias que con mayor frecuencia origina infecciones óseas por diseminación hematógena y por contigüidad. En niños la osteomielitis hematógena suele afectar la metáfisis de los huesos largos, mientras que en los adultos, *S. aureus* afecta el tejido esponjoso vertebral dando lugar a osteomielitis vertebral. La osteomielitis crónica por contigüidad es más frecuente y se produce como complicación de cirugía ortopédica y traumatismos.

También puede ocasionar infecciones de prótesis articulares. *S. aureus* es el principal agente etiológico causante de artritis séptica y de bursitis. Las articulaciones afectadas con mayor frecuencia son las rodillas, tobillos, caderas, hombros y las interfalángicas.

La piomiositis es una infección poco común de los músculos de fibra estriada que afecta a personas con enfermedad de base. La forma más frecuente es el absceso del psoas de origen hematógeno o como consecuencia de una infección vertebral.

Infecciones del tracto Respiratorio

Las neumonías por *S. aureus* son poco frecuentes pero graves, se puede producir por aspiración de secreciones orales o por diseminación hematógica. La neumonía por aspiración de adquisición comunitaria se produce por complicación de cuadros virales, mientras que la nosocomial es más frecuente en pacientes con ventilación mecánica. La complicación más frecuente de la neumonía es el empiema.

Infecciones del sistema Nervioso Central:

S. aureus puede ser la causa de infecciones del sistema nervioso central. La meningitis piógena estafilocócica puede ser de origen hematógico o como una complicación de un absceso. Los abscesos cerebrales pueden ser de origen hematógico a partir de una endocarditis o por contigüidad a partir de una sinusitis, traumatismos o cirugías. *S. aureus* también se considera como causa frecuente de empiema subdural y absceso epidural medular o intracraneal.

Infecciones del Tracto Urinario:

La presencia de *S. aureus* en infecciones de vías urinarias es rara. Su presencia en la orina sugiere origen hematógico. Las infecciones ascendentes son debidas a la manipulación instrumental. Asimismo, en infecciones por toxinas estafilocócicas, principalmente en el síndrome de la piel escaldada; es una dermatitis exfoliativa ampollar que no afecta mucosas y es más frecuente en neonatos y niños en zonas tropicales, suele aparecer como una complicación de piodermal localizado, debido a que *S. aureus* produce una toxina exfoliativa o epidermolítica. La producción de estas toxinas tiene lugar especialmente durante la fase de latencia de crecimiento de la bacteria, lo que favorece su diseminación.

Choque Tóxico

S. aureus puede producir choque séptico mediante la activación del sistema inmunológico y del sistema de coagulación mediado por el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la toxina-alfa. El síndrome de choque tóxico (SST-1) es un cuadro grave debido a la producción de la toxina TSS-1, inicialmente se describió en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones. En la actualidad, la mayor parte de los casos son secundarios a infecciones estafilocócicas diversas. También puede producir superantígenos, tales como las enterotoxinas que causan toxiinfecciones alimentarias o gastroenteritis estafilocócica y la toxina TSST-1, causante del síndrome del choque tóxico. Estos superantígenos pueden generar cuadros similares al choque séptico por la producción incontrolada de citocinas. La toxiinfección alimentaria se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxinas del microorganismo; es un cuadro autolimitado que cursa con vómitos, dolores abdominales, cólicos y diarrea¹³³⁻¹³⁶.

1.4.2.9 TRATAMIENTO

TABLA N°08 Antimicrobianos Recomendados Para El Tratamiento De La Infección Estafilocócica Según Localización Del Foco Y Sensibilidad De La Cepa A Meticilina ¹³⁷ .			
LOCALIZACIÓN	TRATAMIENTO		COMENTARIOS ²
	SASM ¹	SARM	
Infección de piel y partes blandas Infección leve ³	Amoxicilina/clavulánico Cefalexina Clindamicina Minociclina o doxiciclina	Cotrimoxazol Clindamicina Linezolid Minociclina o doxiciclina	- El drenaje de un forúnculo o absceso cutáneo puede ser suficiente si es completo y no hay celulitis, flebitis, afección sistémica (fiebre), comorbilidad significativa, inmunodepresión o presencia de un dispositivo o material protésico endovascular. - Por tratarse de una infección leve no se destaca ningún antibiótico como primera elección.
Infección de gravedad moderada o alta ⁴	Cloxacilina ± clindamicina o linezolid Linezolid Daptomicina	Linezolid Daptomicina Vancomicina Teicoplanina	-El tratamiento de la infección por cepas productoras de LPV o de superantígenos, debe incluir linezolid o clindamicina. - Considerar el empleo de tigeciclina, a dosis altas, en casos de infección polimicrobiana de gravedad moderada, con participación de SARM.
Osteomielitis aguda Artritis	Cloxacilina Clindamicina	Linezolid Daptomicina Clindamicina Vancomicina Teicoplanina	- En caso de infección por SASM el tratamiento de la fase aguda con cloxacilina iv puede seguirse, por vía oral, con la asociación de levofloxacin y rifampicina o con monoterapia con clindamicina, linezolid o cotrimoxazol. - En caso de infección por SARM, tras el tratamiento de la fase aguda por vía iv puede seguirse, por vía oral, con linezolid, cotrimoxazol o clindamicina (según la sensibilidad de la cepa).
Infección del material protésico osteoarticular	Cloxacilina iv (5-7 días) seguida de: Levofloxacin +/- rifampicina Linezolid ± rifampicina Cotrimoxazol o clindamicina + rifampicina	Daptomicina + rifampicina (5-7 días) seguido de: Linezolid ± rifampicina Cotrimoxazol o clindamicina + rifampicina	- El tratamiento antibiótico inicial de la infección de gravedad moderada o alta debe administrarse por vía iv durante los primeros 5-7 días.
Bacteriemia primaria o asociada a infección del catéter vascular	Cloxacilina	Daptomicina Vancomicina Linezolid Teicoplanina	- Si los hemocultivos se negativizan en las primeras 24-48 horas de tratamiento, después de la fase inicial de terapia por vía iv, el paciente afebril, estable y sin evidencia clínica de metástasis puede completar el tratamiento por vía oral. En caso de infección producida por SASM puede emplearse amoxicilina-clavulánico, clindamicina, o minociclina en monoterapia o una fluorquinolona (levofloxacin o moxifloxacin) asociada a rifampicina. En caso de infección por SARM puede emplearse linezolid, cotrimoxazol o minociclina. - En la bacteriemia persistente (>5-7 días) o recidivante, sin foco endovascular aparente ⁵ , asociar un segundo antibiótico anti-estafilocócico con o sin rifampicina. Si el paciente estaba recibiendo tratamiento con cloxacilina añadir daptomicina ± rifampicina. Si recibía daptomicina añadir linezolid, fosfomicina o cloxacilina ± rifampicina. Si recibía vancomicina sustituirla por daptomicina + cloxacilina ± rifampicina.

LOCALIZACIÓN	TRATAMIENTO		COMENTARIOS ²
	SASM ¹	SARM	
Endocarditis ⁶ Válvula nativa	Cloxacilina ± gentamicina ⁷ (3-5 días)	Daptomicina + fosfomicina y/o gentamicina (3-5 días) Vancomicina	<ul style="list-style-type: none"> - En caso de infección por SASM, si el filtrado glomerular es menor de 40 mL/min o el paciente recibe otra medicación potencialmente nefrotóxica evitar el empleo de gentamicina o sustituirla por daptomicina⁷. - En la infección por SASM con CMI de vancomicina >1 mg/L, criterios de sepsis grave o bacteriemia >5-7 días, considerar la adición de daptomicina. - En caso de infección por SARM la adición a daptomicina de fosfomicina y/o gentamicina depende de la sensibilidad de la cepa y del riesgo de toxicidad renal. Si la cepa es resistente a fosfomicina (CMI>32 mg/L) considerar la sustitución por cloxacilina o cotrimoxazol. - La pauta con vancomicina solo debe considerarse si la CMI es <1 mg/L. En caso de que la CMI sea ≥1 mg/L, antes de utilizar vancomicina es necesario descartar la existencia de heteroresistencia, tolerancia o efecto inóculo.
Válvula protésica	Cloxacilina + gentamicina ⁷ (15d) + rifampicina	Daptomicina + rifampicina + fosfomicina y/o gentamicina Vancomicina + gentamicina (15d) + rifampicina	<p>El tratamiento de la infección por cepas productoras de LPV o de superantígeno</p> <ul style="list-style-type: none"> - En caso de infección por SASM, si el filtrado glomerular es menor de 40 mL/min o el paciente recibe otra medicación potencialmente nefrotóxica considerar la sustitución de gentamicina por daptomicina⁷ o por una quinolona (si la cepa es sensible). Iniciar el tratamiento con rifampicina a partir del 3°-5° día. - En la infección por SASM con CIM de vancomicina > 1 mg/L, criterios de sepsis grave o bacteriemia > 5-7 días, considerar la adición de daptomicina. - En la infección por SARM asociar fosfomicina y/o gentamicina según la sensibilidad de la cepa y el riesgo de toxicidad renal. Si la cepa es resistente a fosfomicina (CMI>32 mg/L) considerar la sustitución por cloxacilina o cotrimoxazol. - La pauta que contiene vancomicina solo debe considerarse si la CMI de ésta es <1 mg/L. En caso de que la CMI sea ≥1 mg/L antes de utilizar vancomicina es necesario descartar la existencia de heteroresistencia, tolerancia o efecto inóculo.
Neumonía	Cloxacilina	Linezolid Vancomicina ± rifampicina	<ul style="list-style-type: none"> - En caso de infección por una cepa productora de PVL, el tratamiento debe incluir linezolid o clindamicina. - Si la infección por SARM cursa con bacteriemia considerar la asociación de linezolid con daptomicina.

LOCALIZACIÓN	TRATAMIENTO		COMENTARIOS ²
	SASM ¹	SARM	
Infección del sistema nervioso central Meningitis Absceso cerebral o epidural Empiema subdural Trombosis séptica de los senos venosos	Cloxacilina	Linezolid Vancomicina ± rifampicina, fosfomicina o cotrimoxazol	- En caso de infección por SASM con CMI de vancomicina >1 mg/L o criterios de sepsis grave, considerar la adición a cloxacilina de linezolid o fosfomicina (si CMI ≤ 2). - En caso de infección por SARM que curse con bacteriemia considerar la adición de daptomicina a linezolid. - Vancomicina puede administrarse por vía intratecal en dosis de 10 mg.
Endoftalmitis	Cloxacilina sistémica ± intravítrea Linezolid	Linezolid Vancomicina sistémica + intravítrea	- En fase avanzada es necesario practicar una vitrectomía.

En negrita se resaltan los antibióticos considerados de elección. El resto de antibióticos se mencionan por orden de preferencia.

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. LPV: leucocidina de Panton Valentine

¹En pacientes alérgicos a la penicilina puede emplearse cualquiera de las pautas recomendadas para tratamiento de la infección por SARM

²En cada una de las posibles localizaciones de la infección debe considerarse siempre, en primer lugar, el drenaje (absceso, artritis, empiema), desbridamiento (celulitis, fascitis) o retirada del material extraño (catéter, derivación ventricular, neuroestimulador, material de osteosíntesis) con objeto de reducir la carga bacteriana, disminuir el riesgo de desarrollo de resistencia y poder acortar la duración del tratamiento antibiótico

³En la infección de piel y partes blandas leve se incluye la mayoría de infecciones supuradas (quiste sebáceo o pilonidal infectados, hidrosadenitis, forúnculos, abscesos cutáneos, bursitis) y la celulitis no complicada

⁴En la infección de piel y partes blandas de gravedad moderada o alta se incluyen la celulitis complicada, la fascitis necrosante y la piomiositis

⁵El catéter venoso se ha retirado y se ha descartado razonablemente la existencia de una infección endovascular con la práctica de un ecocardiograma trans esofágico, un eco-doppler y, en casos seleccionados, se ha descartado la existencia de focos metastásicos mediante la práctica de una PET u otra prueba de imagen

⁶Endocarditis mitral o aórtica

⁷Varios autores del consenso consideraron a la asociación de cloxacilina con daptomicina (en lugar de gentamicina) como la primera alternativa terapéutica de la endocarditis por SASM, tanto sobre válvula nativa como protésica.

1.4.2.10 MECANISMO DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO

La penicilina es hidrolizada por la 3-lactamasa, una proteasa que hidroliza este anillo lactámico. Actualmente, menos del 5% de las cepas de *Staphylococcus aureus* se mantienen sensibles a la penicilina. La resistencia a la meticilina confiere resistencia a todas las cefalosporinas y a todas las penicilinas penicilinasas (oxacilina), este alto nivel de resistencia requiere la presencia del gen meca, que codifica para una proteína fijadora anómala de baja afinidad, la PBP-2a. Los genes meca se originaron, probablemente, de diferentes especies de estafilococos aunque la mayoría de las cepas meticilino-resistentes derivan de un limitado número de clones, algunas han podido tener un origen policlonal, que sugeriría una transferencia horizontal de ADN del gen meca. El gen meca, responsable de la resistencia a la meticilina, se encuentra localizado en una estructura genética móvil llamada, en inglés, staphylococcal cassette chromosome (scmec). Se considera que una cepa de *Staphylococcus aureus* es resistente a la meticilina cuando su concentración mínima inhibitoria (CMI) es igual o superior a 16 mg/L o cuando la CMI para oxacilina es igual o superior a 4 mg/L.

El primer paciente con *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia para vancomicina (VISA en inglés) o a glucopeptidos (GISA) fue descrito en Japón en 1997 desde entonces han aparecido varios casos más, generalmente en pacientes sometidos a hemodiálisis con infecciones profundas o asociadas a material protésico con cursos prolongados de tratamiento con vancomicina. El mecanismo de resistencia es debido al incremento de la síntesis de la pared celular y a alteraciones estructurales de la pared que limitan la llegada de vancomicina a los lugares responsables de la síntesis de la pared celular. En estas cepas no se han detectado los genes de resistencia vana, vanb o vanc, responsables de la resistencia a los glucopeptidos de alto nivel observadas con los enterococos ^{102, 138}.

1.5 ANTIBIOTICOS:

1.5.1 HISTORIA ^{URL-4}.

Sir Alexander Fleming (1881-1955), bacteriólogo y premio Nobel británico, se hizo famoso por el descubrimiento de la penicilina. Nacido en Escocia, se formó en la Facultad de Medicina del St. Mary's Hospital de la Universidad de Londres, donde trabajó como catedrático de bacteriología desde 1928 hasta 1948, año en que fue nombrado profesor emérito.

Fleming desarrolló importantes investigaciones en los campos de la bacteriología, la quimioterapia y la inmunología. En 1922 descubrió la lisozima, un antiséptico natural presente en las lágrimas, las secreciones corporales, la albúmina y ciertas plantas. El descubrimiento de la penicilina tuvo lugar accidentalmente en 1928 en el curso de sus investigaciones. Al observar que un moho que contaminaba una de sus placas de cultivo había destruido la bacteria cultivada en ella, sentó las bases para el desarrollo de la terapia con penicilina.

Fleming fue nombrado sir en 1944. En 1945 compartió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina con los científicos británicos Howard Walter Florey y Ernst Boris Chain por sus contribuciones al desarrollo de la penicilina.

1.5.2 DEFINICIÓN:

Derivado del griego, anti, "contra"; bio "vida". Los antibióticos son un amplio grupo de sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos), que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antimicrobiana ^{139, 140, 141}.

1.5.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS^{139, 142}.

Actualmente disponemos de una amplia gama de agentes antimicrobianos sistémicos.

Se clasifican en los siguientes grupos:

1.5.3.1 Según la acción del antibiótico sobre la bacteria

a) Bacteriostáticos:

Inhiben la multiplicación bacteriana

- ✓ Anfenicoles
- ✓ Lincosaminas
- ✓ Macrólidos
- ✓ Sulfamidas
- ✓ Tetraciclinas

b) Bactericidas:

Poseen la propiedad de destruir la bacteria.

- ✓ Betalactámicos
- ✓ Aminoglucósidos
- ✓ Glicopéptidos
- ✓ Quinolonas
- ✓ Rifampicinas.

1.5.3.2 Según el mecanismo de acción sobre la bacteria.

a) Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.

Afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana

- ✓ Penicilinas
- ✓ Monobactámicos: aztreonam, carumonam,
- ✓ tigemonam
- ✓ Carbapenem: Imipenem, meropenem

- ✓ Cefalosporinas
 - ✓ Vancomicina
 - ✓ Fosfomicina
 - ✓ Bacitracina
 - ✓ Teicoplanina
- b) Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad:
- ✓ Polimixinas
 - ✓ Colistinas
 - ✓ Anfotericina B
- c) Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas a nivel ribosomal:
- ✓ Los que actúan sobre la subunidad 30s
 - Aminoglucósidos
 - Aminociclitoídes
 - Tetraciclinas
 - ✓ Los que actúan sobre la subunidad 50s
 - Macrólidos
 - Lincosamidas
 - Anfénicoles
- d) Antibióticos que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos
- ✓ Quinolonas
 - ✓ Rifampicinas
- e) Antibióticos antimetabolitos:
- Antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis del ácido fólico.

- ✓ Trimetroprima
- ✓ Sulfonamidas

1.5.3.3 Clasificación según su estructura química

- a) Betalactámicos
 - ✓ Penicilinas
 - ✓ Cefalosporinas
 - ✓ Monobactámicos
- b) Carbapenems
- c) Aminoglucósidos
- d) Macrólidos
- e) Tetraciclinas
- f) Lincosaminas
- g) Quinolonas
- h) Sulfonamidas
- i) Rifamicinas
- j) Cloranfenicoles
- k) Antibióticos péptidos

- l) Otros: Metronidazol, Acido Fusídico, Nitrofuranos

AMINOGLUCÓSIDOS

Los aminoglucósidos son un grupo importante de antibióticos que se caracterizan por tener aminoazúcares con uniones glucosídicas, obtenidas generalmente del *Streptomyces*. Fueron dados a conocer en clínica en 1944 con la introducción de la estreptomicina. Estos antibióticos tienen un espectro de acción limitado, pero complementario al de las penicilinas. Están principalmente dirigidas sobre gérmenes gram negativos con poca acción sobre los anaerobios y limitada sobre los gram positivos. No han evolucionado en forma sustancial en los últimos años

143-145

✓ **Mecanismos de acción**

Son bactericidas, deben alcanzar el citoplasma bacteriano para poder ejercer su acción a nivel ribosomal. A través de difusión, atraviesan la membrana externa por poros formados por proteínas porinas, luego realizan el pasaje de la membrana celular por un mecanismo activo oxígeno dependiente, ingresando al citoplasma bacteriano provocando alteraciones de su funcionamiento, se unen a polisomas e inhiben la síntesis bacteriana. El sitio de acción es la subunidad ribosómica 30s, éstas constituyen el sitio de unión del ARNt al ribosoma donde el aminoglucósido provoca una alteración en la unión codón-anticodón y lectura errónea del código genético, con producción de una proteína anómala, la cual unida a las alteraciones de la membrana producen la muerte bacteriana¹⁴³⁻¹⁴⁴.

✓ **Mecanismos de resistencia**

Su nivel de resistencia es bajo. Existen tres mecanismos de resistencia:

1. Inactivación enzimática, la más frecuente
2. alteración del ingreso: falla de penetración de la membrana citoplasmática
3. Alteración del sitio de unión al ribosoma: mutación de la proteína S12¹⁴⁵.

✓ **Farmacocinética**

La biodisponibilidad oral es muy baja y errática. Se administra por vía IM donde se absorbe completa y rápidamente. La unión a proteínas es muy baja. No pasa la barrera hematoencefálica, sí la placenta y la endolinfa. Se excreta por filtración glomerular¹⁴⁶.

✓ **Espectro antibacteriano**

Todos los aminoglucósidos son antibióticos de espectro reducido. Actúan sobre bacterias aerobias gram negativas. Sobre las gram

positivas sólo ejercen un efecto potenciador de los betalactámicos.

¹⁴⁶.

✓ **Clasificación de los aminoglucósidos**¹⁴⁶.

- Estreptomina
- Neomicina
- Kanamicina
- Gentamicina
- Tobramicina
- Amikacina
- Netilmicina
- Espectinomicina
- Paromicina

✓ **Reacciones adversas**

Se observa nefrotoxicidad, ototoxicidad dependiente de la concentración de aminoglucósidos en la endolinfa, bloqueo muscular por inhibición de la liberación de acetilcolina por el terminal colinérgico que se pone de manifiesto en miastenia gravis, insuficiencia renal sin corrección de dosis, inyección en bolo IV e interacción con drogas curarizantes. Se describe síndrome de malabsorción con neomicina. Otros efectos adversos son náuseas, vómitos, anorexia leve (neomicina, y paramomicina), neuropatías periféricas y neuritis óptica. No deben ser usadas en embarazadas (Sordera congénita)¹⁴³.

1.5.4 MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS¹⁴¹:

Los antibióticos realizan por regla general los siguientes mecanismos de acción:

1.5.4.1 Agente que inhiben la síntesis de la pared celular.

La pared celular es una estructura exclusiva de la bacteria; por lo tanto el uso de sustancias que actúan a este nivel aseguran una

acción antibacteriana selectiva en este grupo se incluye a los betalactámicos.

1.5.4.2 Agentes que modifican la permeabilidad de la membrana celular.

El empleo de agentes que actúan a este nivel se basa en que las membranas celulares de algunas bacterias se alteran con más facilidad que las membranas de células animales, lo cual permite una actividad relativamente selectiva como por ejemplos:

Detergentes tipo polimixina B

Antifúngicos polienicos tipo Nistatina y Anfotericina B

1.5.4.3 Agentes que inhiben la síntesis proteica.

La unidad funcional de la síntesis proteica en las bacterias son los ribosomas 70-S, constituidos por dos subunidades, 50-S y 30-S los cuales al ser inhibidas por sustancias que actúan a este nivel interrumpen la síntesis proteica necesaria para las funciones vitales de las bacterias; los agentes son:

Sobre la subunidad 30-S: aminoglucósidos, tetraciclinas.

Las subunidades 50-S: macrolidos (eritromicina), cloranfenicol, lincosamidas (lincosamina, clindamicinas)

1.5.4.4 Agentes que inhiben la síntesis o función de los ácidos nucleicos.

Los agentes o sustancias que actúan a este nivel, inhiben funciones vitales en el sistema nuclear bacteriano por lo tanto se produce la extinción de la bacteria; las siguientes acciones son:

Inhibiendo la replicación del ADN: quinolonas

Impidiendo la transcripción rifampicina y actinomicina.

Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales (bloqueo de la formación de bases purinas y pirimidinas: sulfonamidas, diaminopirimidinas (trimetoprim, perimetamida, metotrexato)

II. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.1 VARIABLES

2.1.1 Variable Independiente

- Extracto alcohólico de hojas del *Anacardium occidentale* Linn “Casho”

2.1.2 Variables Dependientes

- Actividad anti- *Staphylococcus aureus*

2.2 INDICADORES

2.2.1 Indicador Independiente

Extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn.

- Concentración 1 (C1) : 75 mg/ml
- Concentración 2 (C2) : 150 mg/ml
- Concentración 3 (C3) : 300 mg/ml

2.2.2 Indicador Dependiente

Diámetros de los halos de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* L. frente a *Staphylococcus aureus*, el cual se cuantifico realizando el cálculo del Porcentaje del Efecto Inhibitorio Relativo (PIR) respecto al control positivo , se aplicó la siguiente expresión (Martínez, 1996)^{147,148}.

$$\% \text{ Efecto Inhibitorio} = \frac{(\text{Media diámetro halo de inhibición})}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

2.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Tipo de variable
<p>Extracto Alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. recolectadas en el Centro Poblado Cruz del Sur</p>	<p>Material vegetal, que mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente y mediante rota-vapor se obtuvo el extracto alcohólico.</p>	<p>Las concentraciones del extracto Alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. (cacho):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 75 mg/ml ▪ 150 mg/ml ▪ 300 mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especie recolectada ▪ Cantidad usada ▪ Hora de la colecta ▪ Parte utilizada ▪ Solvente utilizado 	<p>La especie vegetal limpia y pesada puesto en maceración alcohólica a temperatura ambiente para la extracción del extracto</p>	<p>Escala nominal Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

Variable Dependiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Escala y tipo de variable
Actividad Antibacteriana del Extracto Alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. (casho) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	Actividad que inhibe el crecimiento de microorganismos causado por los metabolitos secundarios presentes en el extracto Alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. (casho)	Según halos de la zona de inhibición del extracto alcohólico obtenido, comparado con el control positivo según CLSI para los métodos kirby - Bauer	Según escala de medición Duraffourd ²² : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Resistente : R ▪ Intermedio : I ▪ Sensible : S 	Respuesta del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a las diferentes concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de <i>Anacardium occidentale</i> L. (casho).	Escala nominal. Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa

III. HIPOTESIS

El extracto alcohólico de las hojas del *Anacardium occidentale* Linn. (Casho), en distintas concentraciones presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*

CAPITULO III

I. METODOLOGÍA

1.1 METODO DE INVESTIGACIÓN

1.1.1 Tipo de Estudio:

Se empleó un diseño experimental, descriptivo, prospectivo y longitudinal.

- **Experimental:** porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que modifica el comportamiento de las variables en estudio (extracto alcohólico de las hojas y microorganismo), las mismas que fueron medidos en determinados momentos.
- **Descriptivo:** porque el estudio describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- **Prospectivo:** porque se desarrolló hacia delante del tiempo.
- **Longitudinal:** porque permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

En la presente investigación se empleó el estudio experimental, descriptivo, prospectivo y longitudinal, cuyo objetivo principal estuvo basado en encontrar la actividad anti *Staphylococcus aureus*, utilizando el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), representada en halos de inhibición que tuviera el extracto alcohólico obtenido de las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho) a las concentraciones de 75 mg/ml, 150 mg/ml, 300 mg/ml

1.3 POBLACION Y MUESTRA

1.3.1 POBLACION VEGETAL

Estuvo constituida por el conjunto de hojas secas de *Anacardium occidentale* Linn.

1.3.2 MUESTRA VEGETAL

Estuvo constituido por 100 gr de hojas secas de *Anacardium occidentale* L.

1.3.2.1 Criterios de Inclusión de la Muestra Vegetal:

- Árbol de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) sin fruto.
- Árbol de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) con menos de tres metros de altura.
- Hojas verdes de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho).
- Hojas sanas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho). recolectados durante las primeras horas de la mañana (8 a 10 a.m.).
- Hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) sin presencia de hongos.
- Hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) sin inflorescencias
- Especie vegetal identificada por el botánico.

1.3.2.2 Criterios de Exclusión de la Muestra Vegetal:

- Arbol de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) con fruto.
- Árbol de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) con más de tres metros de altura.
- Hojas amarillas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho).
- Hojas sanas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho). recolectados en las horas de la tarde.
- Hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) con presencia de hongos.

- Hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) con inflorescencias.
- Especie vegetal no identificada por el botánico.

1.3.3 CEPA BACTERIANA

Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus*

1.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.4.1 RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL

1.4.1.1 RECOLECCION DE LAS MUESTRAS VEGETALES

La muestra vegetal se recolectó del Centro Poblado Cruz del Sur (km. 8 Carretera Iquitos - Nauta), ubicada en el Departamento de Loreto (selva baja), Provincia de Maynas, Distrito de San Juan Bautista entre el río Nanay y la carretera Iquitos - Nauta, y tiene una latitud de - 3.84333 y longitud -73.3342 (**ver Anexo N°04,07**)

Para la recolección del material vegetal se siguieron los siguientes pasos:

- Selección de las especies de *Anacardium occidentale* L. :

Para la selección de las muestras vegetales se tuvo en

Consideración los siguientes factores:

- Edad de la planta.
- Estado vegetativo.

- Selección de materia prima:

Se seleccionó las hojas verdes, frescas, en buen estado de *Anacardium occidentale* Linn. cuyo certificado fue otorgado por el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. (**ANEXO N° 03**). En donde, el botánico determino la categoría taxonómica, empleando descriptores

morfológicos, claves de identificación, bibliografía especializada y estereoscopio (**ver Anexo N°02**).

1.4.2 LAVADO DE LA MATERIA PRIMA:

Las hojas se sometieron a la acción de hipoclorito de sodio al 3% por espacio de 3 minutos. Luego se enjuagó con agua a chorro continuo para despojarlos de contaminantes.

1.4.3 SECADO DE LA MATERIA PRIMA:

Las hojas fueron sometidas a calentamiento; ubicadas en el área de desecador de muestras vegetales del IMET-Es Salud (ubicada en Pasaje San Lorenzo N°205, Distrito de San Juan Bautista, Loreto-Perú.) , a 37° C por 8 días. (**ver Anexo N°08**).

1.4.4 TRITURADO Y PESADA DE LA MATERIA PRIMA:

Seguidamente se procedió a triturar las hojas secas, con la ayuda de una licuadora. Se llevó a una balanza analítica para saber el peso final. (**ver Anexo N°09,10**).

1.4.5 MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

1.4.5.1 Obtención del Extracto Alcohólico de Las Hojas de *Anacardium occidentale* L. (casho) :

El extracto se obtuvo empleando el método de maceración, con etanol al 70% a temperatura ambiente, con renovación del solvente cada 7 días, hasta agotamiento. El solvente se eliminó mediante presión reducida (690 mmHg) a 55°C. La concentración del extracto se realizó en las instalaciones del laboratorio de Fitoquímica del LIPNA, ubicada en Psje Los Paujiles S/N AA.HH. Nuevo San Lorenzo, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas. El extracto obtenido se pesó y

conservo en frasco de vidrio hasta el momento de utilizarlos a 4°C ¹⁴⁹.
(ver Anexo N°05,11-15).

Porcentaje de rendimiento ¹⁵⁰.

El porcentaje de rendimiento de cada extracto seco fue calculado usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto seco}}{\text{Peso de la droga seca}} \times 100$$

1.4.6 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD Anti *Staphylococcus aureus*

1.4.6.1 Obtención de la cepa de *Staphylococcus aureus*

La cepa fue proporcionada por el Área de microbiología de la Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental, ubicada en la Calle Alzamora N°410 (ver Anexo N°22).

1.4.7 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN DE DISCO. (ESTA PRUEBA SE REALIZÓ POR TRIPLICADO).

Se utilizó la técnica de difusión de disco en Agar de Kirby-Bauer (ver Anexo N°06), prueba que permitió medir la susceptibilidad *in Vitro* de microorganismos patógenos y Fitopatógenos frente a una sustancia o la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano ¹⁵¹.

1.4.7.1 Esterilización de los materiales a utilizar ¹⁵².

La esterilización de los materiales se realizó mediante la acción de calor seco (en la estufa de esterilización), se aplicó temperatura de 150-170 °C durante 2 horas.

Preparación de material para su esterilización:

Se siguió las siguientes recomendaciones (**ver Anexo N°16**):

Preparación De Tubos Y Matraces

- Los tubos, matraces y frascos antes de esterilizar llevan sus tapones de algodón, en los cuales los tapones deben cerrar suavemente no muy flojos ni apretados, ni largos ni cortos.
- Tubos: formar un determinado número de tubos después de haber sido taponado, se le empaqueta con papel Kraft y se le amarra, en su defecto se le envuelve con papel solo las zonas de las bocas, rotular.
- Frascos y Matraces: ambos se taponan con algodón y se cubre con papel Kraft y se amarra con hilo pabilo, rotular.

Preparación Proteger Las Pipetas

- En el extremo de succión de cada pipeta introducir una porción de algodón con auxilio de una aguja o puntero delgado, evitando que quede muy ajustado.
- Cortar tiras de papel de unos 3 cm de ancho, en una de las puntas del papel envolver la punta de la pipeta en forma oblicua y envolver toda la longitud de la pipeta girándose en espiral en forma ajustada y en la parte terminal de la boquilla se remata con una torsión para protegerla y se rompe el resto del papel sobrante, rotular.

Preparación De Placas Petri

- Cortar el papel al tamaño adecuado de la placa.
- Con la parte brillante del papel hacia fuera se envuelve la placa poniéndose ésta en el centro, se envuelve la placa tomándose dos extremos opuestos al papel, dándose una vuelta alrededor de ella, los otros dos extremos del papel se doblan en triángulos, rematándose con fuertes doblez hacia el dorso de la placa, dándose una apariencia de paquete de regalo.

Procedimiento Para La Esterilización En Horno

- Lavar los materiales con detergente y enjuagar con abundante agua.
- Secar los materiales con una toalla.
- Coloque el material a esterilizar.
- Ponga el termostato en 150°C.
- Encienda el horno, y gradúe el reloj a 1 hora
- Si hay ventilador verifique que esté funcionando.
- Vigile el termómetro, cuando la temperatura llegue a 150°C siga calentando durante 1 hora más.
- Si el horno no es automático apáguelo. Espere que la temperatura descienda a 60°C. Abra la puerta del horno, y recién retire los materiales. Si lo desea espere a que se enfríe.
- El papel empleado abra tomada un color marrón oscuro. Si el papel es amarillo pálido indicara que el horno no ha calentado lo suficiente. Si el papel se ha ennegrecido indicara que el horno se ha calentado demasiado.

1.4.7.2 Preparación de los Medios de cultivo

Los Medios de cultivo; Agar Müeller-Hinton, Agar tripticasoya de soya y Caldo tripticasoya de soya, se prepararon teniendo en consideración las indicaciones del fabricante y fueron preparados 2 días antes de realizar la prueba (**ver anexo N°20**),

1.4.7.3 Preparación de los Discos

Se utilizó papel de filtro Whatman N° 02 (diámetro 6 mm) y un perforador convencional. Los discos fueron esterilizados en horno a 180°C por 1h y 30 m. (**ver Anexo N°17**).

1.4.7.4 Preparación de la Solución Stock¹⁵² y de la Macrodilución del extracto.

Se preparó la solución stock del extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho) a la concentración de 500mg/ml, el volumen de 10 ml; a partir de la cual se realizó diluciones sucesivas

para obtener las concentraciones de 75mg/ml, 150mg/ml, 300mg/ml las cuales fueron usadas en la prueba. (Ver Anexo N°18,19).

1.4.7.5 Preparación de los Discos Impregnados con el extracto¹⁵².

Para preparar los discos de los extractos se trabajaron con tres concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml del extracto obtenido de las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho). Los extractos fueron disueltos en agua destilada estéril. Posteriormente se le agregó a cada uno de ellos 15 µl de las diferentes concentraciones de los extractos y se le dejó secar a temperatura ambiente por un periodo 30 minutos, para su uso. (Ver Anexo N°27).

1.4.7.6 Purificación de la Cepa¹⁵³.

Para la activación de la bacteria, la cepa se replicó en agar tripticasa de soya por el método de inoculación por estrías, luego se incubó en estufa a 37°C por 24 Horas. (Ver Anexo N°23,24).

1.4.7.7 Preparación del Inóculo¹⁵³.

De las placas de cultivo de agar específico se seleccionó 5 colonias aisladas de apariencia similar.

Se tocó la superficie de la colonia con asa de siembra y transfirió a un tubo de 5 ml de caldo de tripticasa de soya.

Se incubó a una temperatura de 35 °C de 2 a 6 horas (ver Anexo N°25), hasta alcanzar la densidad bacteriana equivalente al tubo N° 1 (1,5x10⁸ UFC/ml) del patrón de turbidez equivalente a 0.5 de Mac Farland¹²⁰ (ver Anexo N°26) por comparación visual con el estándar (ver anexo N°28), para realizar este paso correctamente se usó una luz apropiada y se observó los tubos contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes.

1.4.7.8 Inoculación en las placas ¹⁵³ (ver Anexo N°29).

- Después de los 15 minutos de ajustada la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se romo el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo.
- Antes de realizar la siembra, se atemperó las placas de agar Mueller Hinton, preparado mínimamente 2 días antes de la prueba.
- Se inoculo la superficie seca de la placa de Muller- Hinton (pH 7.2 a 7.4) estriando con el hisopo en tres direcciones con ángulo de 65° para garantizar la distribución homogénea del cultivo.
- Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 – 5 minutos para que se absorba el exceso de humedad.
- La prueba se realizó por triplicado.

1.4.7.9 Aplicación de los discos ¹⁵³. (ver Anexo N°30).

- Después de 5 minutos de realizada la siembra, se aplicó los discos con el extracto de *Anacardium occidentale L* (Casho) a las concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml, antibiótico (Gentamicina 10 µg) y control negativo (empapado con 10 µl de agua destilada estéril) sobre la superficie del agar de forma manual con la ayuda de una pinza estéril. Se presionó ligeramente para asegurar el contacto uniforme, sin introducir el disco en el agar.
- Los discos fueron colocados a 2,5 cm de distancia entre ellos y a 1.5. cm del borde de la placa Petri (máximo seis por caja).
- No se recolocó los discos una vez que tomaron contacto con el agar; porque la difusión comienza instantáneamente y se alteraría los resultados.

1.4.7.10 Incubación de las Placas ¹⁵³.

Las placas se incubaron después de 15 minutos de aplicados los discos por 18 horas a 37°C. Y se realizaron las pruebas por triplicado. (Ver Anexo N°31).

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

1.4.7.11 Lectura de las placas e interpretación de los resultados ¹⁵³. (ver Anexo N°32).

- Para la lectura de las placas se tuvo en cuenta que el crecimiento de la bacteria sea confluyente en toda la placa, se trabajó en una superficie adecuada para poder observar adecuadamente los halos. Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) usando una regla.
- Se mantuvo iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
- Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.
- El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio visible, que podrá ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que podrán ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.
- Luego se procedió a la toma de datos.

- De acuerdo con los tamaños de la zona de inhibición que presentó la muestra frente a los microorganismos se consideró como indicador lo siguiente:

Tabla N°09: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	< 40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	>76%

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007¹⁵⁴.

1.5 MATERIALES

1.5.1 MATERIAL VEGETAL

- Extracto Alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* L. (casho).

1.5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Ceba *Staphylococcus aureus*

1.5.3 MATERIALES DE LABORATORIO:

- Soporte Universal.
- Embudos.
- Maceradores
- Balones de destilación
- Frascos de vidrio con tapa rosca color ambar.

- Mecheros de alcohol.
- Placas Petri.
- Asas bacteriológicas en argolla de nicromo
- Espátulas
- Micro pipetas
- Puntas amarillas 10 a 100 μ L estériles
- Puntas azules de 100 a 1000 μ L estériles
- Erlenmeyers de 250 y 500 ml, 100, 25
- Matraz 1000 ml.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 5, 100, 250 y 1000 ml.
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Vasos precipitados de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- Tubos de ensayo con tapón rosca
- Mortero y pilon.
- Bagueta.
- Goteros.
- Pinzas estériles.
- Picetas
- Regla graduada en mm.
- Hisopos estériles.
- Papel parafilm
- Papel filtro.
- Encendedor.
- Maskintape
- Escobillas.
- Perforador convencional
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Papel toalla.
- papel filtro Wattman N°2.

- Algodón
- Bolsas Ziploc.
- Marcadores indelebles
- Tijeras.
- Hilo pabilo.
- Gorros
- Mascarilla
- Guantes
- Mandil de laboratorio
- Toallitas.
- Termos.
- Gel refrigerante.

1.5.4 DROGAS E INSUMOS QUÍMICOS:

- Agua desmineralizada no estéril y estéril.
- Etanol 70%
- Etanol 96%
- Estándar de McFarland 0.5
- BaCl₂ a 0.048 M
- H₂SO₄ a 0.18 M
- Disco de sensibilidad de Gentamicina 10 µg

1.5.5 EQUIPOS E INSTRUMENTOS:

- Balanza analítica.
- Refrigeradora.
- Cocina Eléctrica.
- Licuadora
Marca IMACCO
Modelo BL999
220V-60M_z 350 v

- Rota vapor:
Serie 040303205-030300681
Marca HEIDOLPH
Modelo LABORATA 4001
- Bomba de Vacío:
Serie 34813-004/348178
Marca VACUUBRAND
Modelo PC 3001
- Baño Termostático:
Serie LCE 0226-11-0391
Marca LAUDA
Modelo ALPHARA 24
Rango de T°-25 A 85°C,230 V 50/60 Hz
- Baño María
Serie 129308301
Marca HEIDOLPH
Modelo OB 2001
T° 240°C
- Autoclave
Marca Sturdy SA-232.
- Esterilizador JSB
- Incubadora JSB
Modelo ST 220 V.

1.5.6 MEDIOS DE CULTIVO PARA *Staphylococcus aureus*

- Agar Müeller-Hinton.
- Agar tripticasoya de soya.
- Caldo tripticasoya de soya.

1.6 TÉCNICAS USADAS EN LA RECOLECCIÓN DE DATOS

La colección de las muestras vegetales se realizó en el campo manualmente, se colectaron en sacos aproximadamente 3Kg. de la especie de *Anacardium occidentale L.*, las cuales fueron codificadas, y llevadas al laboratorio para ser lavadas, el procesamiento de las mismas se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNAP, el IMET- Es Salud y LIPNA.

1.7 ANÁLISIS DE DATOS

El procesamiento de datos con respecto a las variables de estudio se realizó mediante el software estadístico SPSS 21.0 para Windows y Minitab versión en español, los cuales nos permitió elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

1.7.1 Técnicas de Análisis e Interpretación de la Información.

El análisis e interpretación de la información se realizó empleando las técnicas:

- Estadística descriptiva para el análisis univariado calculando las medidas de resumen para luego describir lo que expresa la información.
- La estadística inferencial para el análisis multivariado calculando los estadísticos a través del análisis de regresión múltiple, Análisis de varianza de un factor, para hallar el tipo de asociación entre las variables en estudio.

1.8 LIMITACIONES

- Hojas infectadas por hongos o parásitos.
- Hojas recolectadas en las horas de la tarde.
- Extracto alcohólico de otras especies.
- Cepa bacteria que no sea *Staphylococcus aureus*.

1.9 PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS Y BIOSEGURIDAD

El área de microbiología, donde se realizó los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que pueden presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ellos se contó con las estrictas medidas de bioseguridad ¹⁵⁵.

NORMAS GENERALES DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA ^{152, 156}.

Un laboratorio de Microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto se requiere un ambiente **limpio** y **ordenado** y trabajar **siempre en condiciones de esterilidad** (en campanas de esterilidad biológica o en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas). Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos, **todos** los cultivos de **todos** los microorganismos deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad.

Es necesario cumplir dos REQUISITOS BÁSICOS:

1. Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de contaminarse uno mismo o a un compañero.
2. Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en piel, pelo, aire, ropa, etc.) contaminen nuestras muestras.

Para mantener estas condiciones, es necesario respetar una serie de NORMAS DE SEGURIDAD:

1. Trabajar con calma y concentración.
2. Es imprescindible el uso de bata de laboratorio.
3. Lavarse las manos con agua y jabón al iniciar y finalizar el trabajo.
4. El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Antes de comenzar es conveniente desinfectar la superficie de trabajo. Los desinfectantes más habituales para esto son la lejía y el alcohol (etanol 96°).

5. Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que pueden crear corrientes que originen contaminaciones o producir accidentes.
6. Está prohibido comer, beber y fumar. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc.
7. Para deshacerse del material contaminado se utilizarán los recipientes adecuados, que serán esterilizados posteriormente. **Nunca se debe tirar nada contaminado por la fregadera o a la basura común.**
8. Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
9. No se debe pipetear nunca con la boca. Utilizar siempre pipeteadores manuales.
10. En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se debe avisar inmediatamente al responsable del laboratorio.

El presente trabajo se realizó bajo los principios de las 3 R (Reducción, Refinamiento, Reemplazo) creado por Russell y Bursh ¹⁵⁷ en la cual pudimos **Reducir** a cero el número de animales, reemplazándolo por microorganismos; **Refinamos** las pruebas experimentales por un método alternativo de mayor sensibilidad y **Reemplazamos** por un método alternativo *in vitro* ¹⁵⁸.

CAPITULO IV

I. RESULTADOS:

1.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE HOJAS.

TABLA N° 10: Rendimiento del Extracto Alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale L* (Casho), por maceración en frío y posterior concentración en rotavapor.

Nombre Científico	Tipo de Maceración	Rendimiento (%)
Hojas de <i>Anacardium occidentale Linn.</i> (casho)	Maceración en frío a temperatura ambiente	10.64%

1.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Anacardium occidentale* L. "CASHO"

1.2.1 Método de difusión de disco (Kirby - Bauer)

TABLA N° 11: Actividad antibacteriana obtenida del Extracto alcohólico de *Anacardium occidentale* (Casho) frente a *Staphylococcus aureus*

Según Diámetro de la zona de inhibición.

EXTRACTO ETANOLICO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	%	RESULTADO
	(mg/mL)				
HOJAS	75	6.0 ± 0.0	RESISTENTE	34.29	INACTIVO
	150	6.7 ± 0.6	RESISTENTE	38.29	INACTIVO
	300	8.0 ± 0.0	RESISTENTE	45.71	POCO ACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA	17.5 ± 0.4	SENSIBLE		

* Esquema DZI frente a Control positivo

Resistente : <12 mm

Intermedio : 13 - 14 mm

Sensible : > 15 mm

Fuente: MPPSAMDD¹⁵³.

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

Inactivo : < 40%

Poco activo : 40 – 50%

Moderadamente activo: 51 – 75%

Buena actividad :> 76 %

Fuente: IMET-ESSALUD 2007¹⁵⁴.

En la **tabla N°11**, se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale L.* (Casho) frente a *Staphylococcus aureus*.

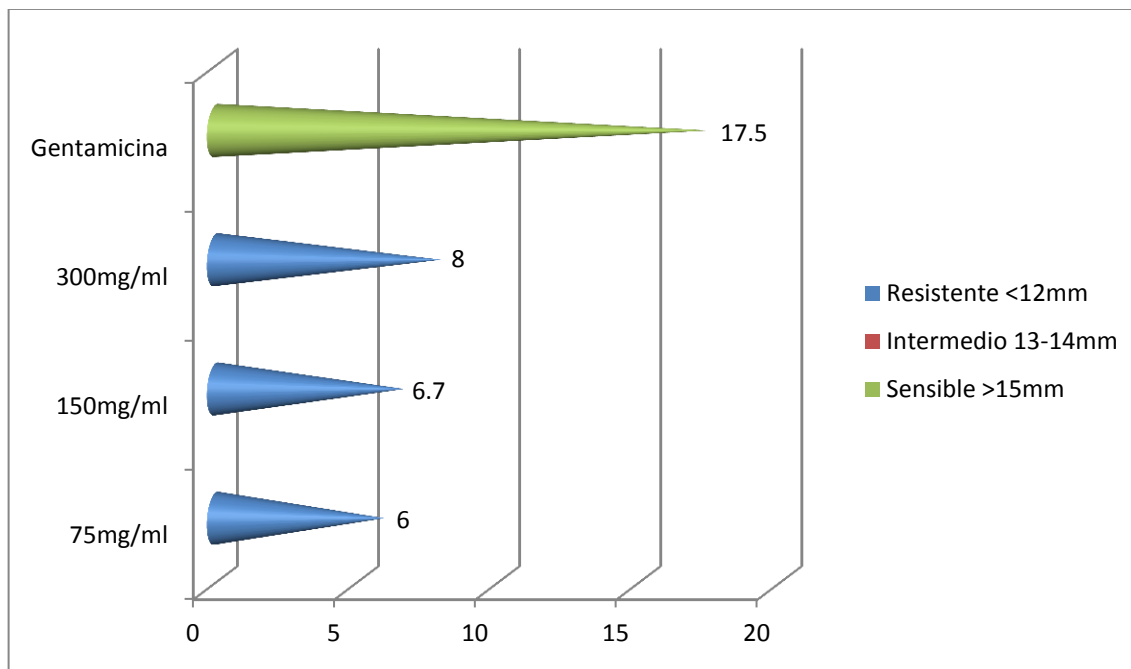
El control Positivo (Gentamicina 10 ug), obtuvo un promedio de 17.5 mm. en el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (>15 mm = Sensible).

El extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale L.* (Casho), se evaluaron a concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml. encontrándose diámetros en la zona de inhibición de 6.0mm., 6.7mm., 8.0 mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados RESISTENTE, por encontrarse por debajo del parámetro de comparación según control positivo (<12 mm = Resistente).

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestra el extracto alcohólico a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose 34.29% y 38.29% en las concentraciones de 75mg/ml y 150 mg/ml respectivamente; lo cual demuestra ser Inactivo frente a *Staphylococcus aureus*.

En la concentración de 300 mg/ml, se obtuvo un porcentaje de inhibición de 45.71%, considerándolo como Poco Activo.

Grafico N°01: Categorización del Extracto alcohólico de *Anacardium occidentale L.* (Casho) frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.

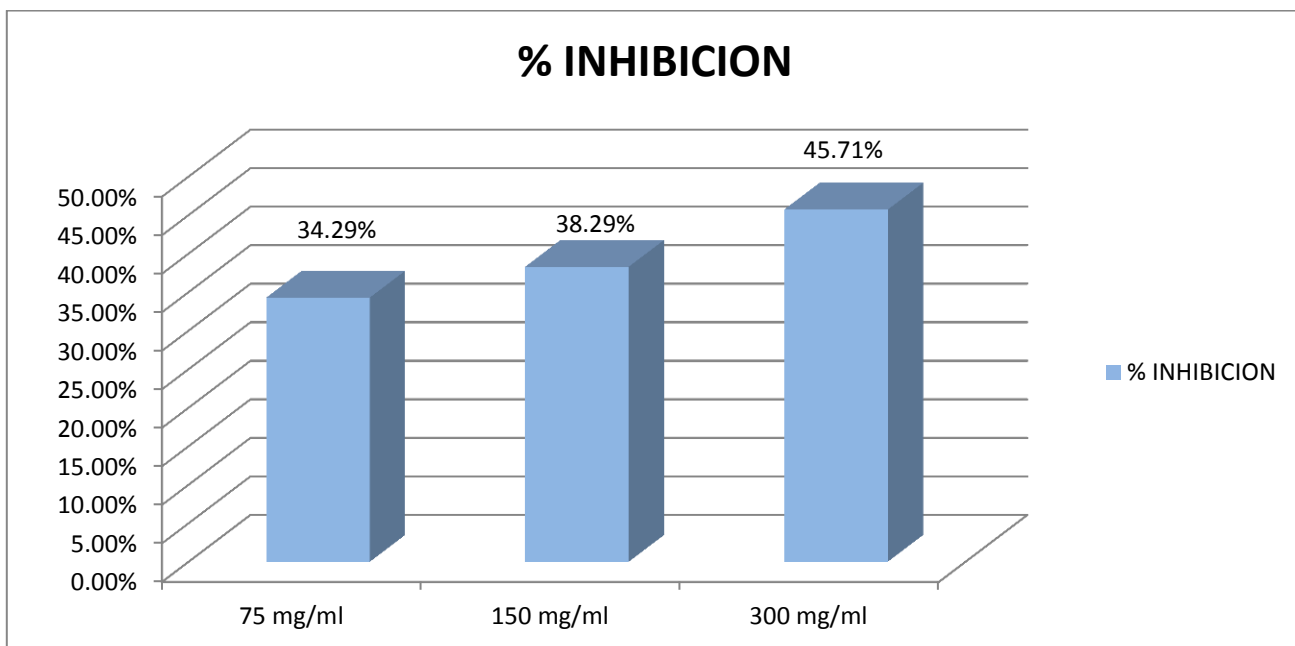


En el **grafico N°01** , se muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Anacardium occidentale L.* y del control positivo (Gentamicina 10ug), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 17.5mm, lo cual lo categoriza como Sensible según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Anacardium occidentale L.*, obtuvieron valores de DZI menores a 12mm, por lo cual se categoriza como Resistente.

GRAFICO N°02: Actividad antibacteriana de *Anacardium occidentale L.* "Casho" frente a *Staphylococcus aureus* según Porcentaje de inhibición.



En el **gráfico N°02**, se muestra los porcentajes de inhibición del extracto alcohólico de *Anacardium occidentale L.* en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*.

Los resultados encontrados con las diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Anacardium occidentale L.* fueron 34.29% (conc. 75mg/ml), 38.29% (conc. 150mg/ml) y 45.71% (conc. 300mg/ml); dentro de los cuales solo el grupo de mayor concentración encontró una clasificación de POCO ACTIVO.

II. DISCUSIÓN

La utilización de sustancias naturales extraídas de plantas en el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado¹⁵⁹, o cuando la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la profesional para amplios sectores de la sociedad sobre todo para los sectores menos favorecidos y los indígenas que no llegan a tener acceso a la medicina clínica¹⁶⁰.

La especie vegetal *Anacardium occidentale L.*, conocido vulgarmente como Casho, Marañón; crece y se desarrolla en la diversidad de la Amazonia. Se extiende por todos los trópicos del Nuevo y del Viejo Mundo. Desde el sur de México hasta Perú y Brasil, de Cuba a Trinidad. Se le cultiva en la India y Malasia. Su límite geográfico (zonas cultivadas) va de los 27° N a los 28° Sur^{21,23-27, 78, 87}.

En el Perú, *A. occidentale L.* (Casho) es empleado como medicina popular antidiarreico, antiverrugoso, antidiabético y tratamiento de enfermedades renales entre otras^{78, 81}.

En el presente estudio se evaluó, la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale L.* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, mediante el método de Difusión en disco (Kirby – Bauer).

Se utilizaron las hojas con superficie amplia y de color verde, en las cuales se concentra la mayor parte de los metabolitos secundarios solubles en alcohol (sustancias polares), las cuales fueron lavadas y depositadas en el cuarto de desecación de plantas medicinales del IMET-ESSalud.

Las hojas secas de *Anacardium occidental L.* (casho) presentaron poca humedad e higroscopicidad, dando la certeza y confiabilidad a que la droga vegetal en estudio no presentó crecimiento de bacterias, de hongos ni la hidrólisis de sus

constituyentes (metabolitos secundarios). En algunas farmacopeas, las literaturas mencionan un limitado contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en las drogas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Para el caso de *Anacardium occidentale L.* (casho) el tiempo requerido para el secado de las hojas fueron de 8 días.

El método escogido para la extracción del extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho) fue mediante la técnica de maceración en frío, a temperatura ambiente (37°C) ^{21, 25-27, 161}. Después de la maceración en frío, se filtró (utilizando papel filtro) para posteriormente concentrarlo en rotavapor a una temperatura de 55° C y a una presión de 690 mm Hg, obteniendo el extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale L.* (casho).

Los resultados obtenidos en el presente estudio referente al Rendimiento del extracto fue de 10.64%

Los métodos más usados en la actualidad para evaluar actividad antimicrobiana de sustancias extraídas de plantas medicinales son: el método de Kirby –Bauer o disco difusión y el método de pocillos o excavación que también sirven para hallar no sólo la potencia de los antibacterianos, sino también, la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos o sustancias usadas como posibles antibióticos ¹⁶².

En nuestro estudio utilizamos el método de difusión en disco “Kirby-Bauer”, y se utilizó como Control positivo (Gentamicina 10 ug), además del extracto alcohólico de *A. occidentale* en 3 niveles de concentraciones.

Los diámetros de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina 10 ug) fue de 17.5 ± 0.4 mm, frente a *S. aureus*. Lo cual, según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del Instituto Nacional de Salud, lo califica como SENSIBLE (Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada

apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones).

En estudios similares realizados por Rodríguez M, Zevallos F ¹⁶³. Desarrollados en el Instituto de Medicina Tradicional – Es salud; utilizaron como control positivo al antibiótico Gentamicina 10 ug y obtuvieron un diámetro de inhibición de 20.4 mm y 19.9 mm.; asimismo Ríos N, Dávila R. ¹⁶⁴. Rojas, Ochoa, Ocampo y Muñoz ¹⁶⁵. En una evaluación de actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria de distintos extractos de plantas medicinales; donde utilizaron como controles positivos Sulfato de Gentamicina 1.0 ug/ml, clindamicina 0.3 ug/ml y nistatina 1.0 ug/ml.

Según los resultados obtenidos, respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale L.* frente a *Staphylococcus aureus*, se obtuvo desde 6.0 mm hasta 8.0 mm de diámetro de zona de inhibición (DZI), el cual nos indicó como resultado **RESISTENTE** en comparación con los criterios de categorización del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, frente a su control positivo; donde indica que cuando se utiliza como antibiótico de control positivo sulfato de Gentamicina 10 ug; se categoriza como **Resistente** cuando el halo de inhibición se encuentra <12mm; **Intermedio** cuando el halo de inhibición es de 13 – 14 mm y **Sensible** si es >15mm.

Con estos resultados encontrados se calculó el porcentaje de inhibición para determinar la actividad antibacteriana, obteniéndose en las concentraciones de 75mg/ml, 150mg/ml y 300mg/ml. unos porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano de 34.29%, 38.29% y 45.71% respectivamente. Según la clasificación de la actividad antibacteriana por porcentaje de inhibición, se considera Inactivo si el porcentaje de inhibición es <40%, Poco activo (40 – 50%), Moderadamente activo (51 – 75%) y con Buena actividad >76%; lo cual solo al grupo tratado con concentración de 300mg/ml obtuvo POCA ACTIVIDAD antibacteriana (<76%).

Al respecto, **Bhandari y otros** ¹⁶⁶. indicaron resultados positivos en la actividad anti estafilocócica del extracto seco de *Berberis asiática*. **Martínez y otros** ¹⁶⁷. encontraron actividad bactericida frente a *Echerichia coli* con una concentración de 0,40 mg/mL de la fracción "Y" del producto liofilizado de *A. occidentale*, lo cual demuestra que los extractos acuosos y alcohólicos de *A. occidentale* poseen actividad antibacteriana.

Tello J. ¹⁶⁸ realizo una tesis de pregrado donde utilizó el aceite de la cascara de la nuez de *A. occidentale* frente a *S. aureus* y encontró actividad antimicrobiana mayor que su control positivo (clorhexidina) y manifiesta que presenta en su composición un alto contenido de ácido anacardico tales como cardol y cardinol que son sustancias que presentan actividad antibacterianas, y que las hojas carecen de dichos compuestos en su estructura.

Resultados similares fueron los encontrados por Omojasola P, Awe S. ¹⁶⁹ quienes evaluaron la actividad antibacteriana de extractos acuosos y etanólicos de hojas de *A. occidentale*, revelando la presencia de saponinas, taninos y compuestos fenólicos, además de la presencia de alcaloides y glicosidos; y respecto a la actividad antibacteriana fue considerada con poco actividad.

Quizás la compleja estructura de la pared celular de las bacterias gram positivas, constituida por 5 a 10 % de muranilpéptidos que actúa como barrera, influyó en una menor sensibilidad del producto para estas concentraciones. Asimismo, la obtención y purificación de los principios pudiera incrementar su potencial antibacteriano.

III. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- Se obtuvo el extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* Linn. (Casho) empleando el método de maceración en frío a temperatura ambiente.
- El rendimiento del extracto alcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* L. (casho) fue de 10.64 %.
- Los diámetros de la zona de inhibición del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* L. (Casho), fue de 6.0mm., 6.7mm., 8.0 mm a las concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml., respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados RESISTENTE, por encontrarse por debajo del parámetro de comparación según control positivo (<12 mm = Resistente).
- No se evidenció concentración mínima inhibitoria a las dosis probadas.

IV. RECOMENDACIONES

- Realizar fraccionamiento, aislamiento y purificación de los componentes más abundantes que se encuentre en la especie botánica de las hojas de *Anacardium occidentale* L. (cacho) como alcaloides, flavonoides y triterpenos-esteroides para probar cuál de las fracciones tiene un mejor efecto antibacteriano o determinar un sinergismo entre sus componentes ya mencionados.
- Realizar diseños de ensayos antibacterianos con diferentes controles positivos como oxacilina, penicilina y eritromicina, con el objetivo de profundizar su estudio.
- Determinar qué factores como concentración, temperatura y tiempo de incubación durante el desarrollo de la evaluación puedan interferir en el ensayo realizado.
- Desarrollar otros ensayos para corroborar la sensibilidad antimicrobiana de esta especie (cacho) y así validar los resultados obtenidos en este estudio.

V.- BIBLIOGRAFIA

5.1.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Font P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Barcelona, España: Editorial Península; 1999. p. 821.
2. Soto F. Caracterización química, fitoquímica y antibacteriana in vitro de las hojas del *Anacardium occidentale* L. (Marañón). Bayamo, Granma, Cuba; 2011
3. Martínez Y, Martínez O, Escalona A, Soto F, Valdivié M. Composición química y tamizaje fitoquímico del polvo de hojas y retoños del *Anacardium occidentale* L. (marañón). Rev Cubana Plant Med. 2012; 17(1):1-9.
Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol17_1_12/pla01112.htm
4. Akinpelu DA. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. Fitoterapia. 2001; 72:286-7.
5. Sokeng DS, Kamtchouing P, Watcho P, Jatsa BH, Moundipa FP, Lontsi D. Hypoglycemic activity of *Anacardium occidentale* L. Aqueous extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Res. 2001; 36(2):1-9.
6. Kaplan SL, Hulten KG, González BE, et al. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1785-1791.
7. Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, et al. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for healthcare-associated infection: 2001-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:343-348.

8. Purcell K, Fergie J. Epidemic of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a 14-year study at Driscoll Children's Hospital. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159:980-985.
9. Broseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:31-5.
10. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3364-72.
11. Vourli S, Perimeni D, Makri A, Polemis M, Voyiatzi A, Vatopoulos A. Community acquired MRSA infections in a paediatric population in Greece. *Euro Surveill*. 2005;10:78-9.
12. Wylie JL, Nowicki DL. Molecular epidemiology of community and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2830-6.
13. Aramburu C, Harbarth S, Liassine N, Girard M, Gervaix A, Scherenzei J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Switzerland: first surveillance report. *Euro Surveill*. 2006;11:42-3.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *Morb Mortl Wkly Rep*. 1999; 48:707-10.
15. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Soares Santos RN, et al. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1985-8.

16. Echevarria J, Ore L, Zerpa R, Campac C, Quispe V, Tamaris J, Prada A, Guerra H, Casas J. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus* strains, in hospitalized patients and susceptibility to teicoplanin in Lima Perú. 20 th International Congress of chemotherapy. Sidney Australia. Junio 1997. International Society of Chemotherapy.
17. Echevarria J, Iglesias D. *Staphylococcus* metilino resistente, un problema actual en la emergencia de Resistencia entre los gram positivos, Rev. Med. Hered 2003;14(4):195-203.
18. Mamani Edgardo, Luján Daniel, Pajuelo Giovani. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. An Fac Med. Lima 2006; 67(2)
19. Lehoux, Daryn (2003). «Tropes, Facts, and Empiricism» Perspectives on Science. Vol. 11. pp. 326–345. DOI 10.1162/106361403773062678.
20. Sacsquispe Contreras, Rosa Elena; Velásquez Pomar, Jorge. 2002. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud. Pág. 67
21. Brack, E. A. (2000). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú.
22. Duraffourd C, D.hervocourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1ª edición. Barcelona, España:Edit. Masson S.A. 1986.
23. Organización Panamericana de Salud (1998). Situación de la Medicina Tradicional en America. Bol. Org. Panam. Salud.

24. Tillan Capo, J. (2002). Plantas medicinales. Revista cubana N° 2. Volumen 7. Pág. 37-44. Cuba.
25. Brack A, Heinz P. (2002). Perú Maravilloso. Edit. Epenza. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima – Perú.
26. Brako L, Zarucchi J. (1993) Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 45
27. Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. 1100 Págs., ISBN: 84-200-0956-3
28. Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., y Dehesa, M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. Food Chem. 85:415–421.
29. Critchley, I. A., Blosser-Middleton R. S., Jones, M. E., Thornsberry, C., Sahn, D. F., y Karlowsky, J. A. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. Antimicrob Agents chemother. 47:1689-1693.
30. Dartois, V., Sanchez-Quezada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Reza-Ghadiri, M., y Parr, T. R. Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. Antimicrob Agents Chemother. 49:3302-3310.
31. Dryla, A., Prustomersky, S., Gelbmann, D., Hanner, M., Bettinger, E., Kocsis, B., Kustos, T., Henics, T., Meinke, A., y Nagy, E. 2005. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. Clin Diagn Lab Immunol. 12:387-398.

32. Cooper, B.S., Medley, G. F., Stone, S. P., Kibbler, C. C., Cookson, B. D., Roberts, J. A., Duckworth, G., Lai, R., y Ebrahim, S. 2004. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. Proc Natl Acad Sci USA. 101:10223-10228.
33. Lima, C., Pastore, G. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos cones de cajueiro-anão-precoce CCP-76 e CCP-79 em cinco estágios de maturação sobre microorganismos da cavidade bucal. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2000; 3:1-6
34. Ferreira, C., Vieria, M. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occidentale* Linn. sobre leveduras do género *Candida*. Arquivos em odontologia, Belo Horizonte 2005; 3: 193-212
35. Fenner, R., Hemann, B., Auler, L., Kuze, S. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2006; 42 (03): 369-394.
36. Brasil, E., Abib, P., Kozlowski, V., Schwartz, J. Eficácia antimicrobiana do produtos naturais frente a microrganismos causadores da endocardite. Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa 2007; 13: 67-72.
37. Rajesh V., Elementary Chemical Profiling and Antifungal Properties of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts. Botany Research International 2009. 2(4): 253-257.
38. Pino, N., Stashenko, E. Validación antibiótica de plantas medicinales del noreste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 2009; 8(2): 145-150.
39. Sistema de clasificación de Englen & Prantl, modificado por Melchor en 1964. Engler y Karl Prantl, Die Natürlichen Pflanzenfamilien (1887-1915).

40. Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University, Press, New York, USA. 1262pp.
41. Medina-Lemos, R.; Fonseca, R. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 71. Anacardiaceae.
42. Tratado de Cooperación Amazónica. *Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas* (on-line). Secretaría Pro Tempore Lima (PERÚ)
43. Cabrera, I. Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina. Colombia: Programa Editorial Universidad del Valle, 2005:22-42
44. *Anacardium occidentale*. Species Plantarum 1: 17-20.(en línea).(Perú)
45. Vanaclocha, B. Fitoterapia. Vademecum de prescripción. Barcelona: Masson 4^a edi. 2003.
46. Murillo, L. Ficha técnica: industrialización del marañón (en línea). Dirección de Mercadeo y agroindustria. Área de Desarrollo de Productividad.
47. Martínez, Y., Soto, F., Almeida, M., Hermosilla, R. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012; 17(4): 320-329
48. Tyman, J.H.P. *Synthetic and Natural Phenol*, Elsevier, Amsterdam, 1996), (Tyman, J.H.P. *Chem. Soc.REv.*, 1979, 8, 499.
49. Attanasi, O.A.*Chimica Oggi*, 1983, 11(8)
50. Craveiro, A.A.; Santiago, G.P.M. y Machado, M.I.L. Lactona macrocíclica a partir do Acido Anacárdico. *Universidade Federal do Ceará-Brasil. Química Nova* 12 (1)(1989)

51. Deborah S Garruti, Maria Regina B Franco, Maria Aparecida A P da Silva, Natália S Janzantti and Gisele L Alves. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by the Osme gas chromatography/olfactometry technique. *J Sci Food Agric* 83:1455–1462 (2003).
52. Maciel MI, Hansen TJ, Aldinger SB and Labows JN, Flavor chemistry of cashew apple juice. *J Agric Food Chem* 34:923–927 (1986)
53. Bicalho B, Pereira AS, Aquino Neto FR, Pinto AC and Rezende CM, Application of high-temperature gas chromatography–mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound components related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) volatiles. *J Agric Food Chem* 48:1167–1174 (2000).
54. Philip JY, Da Cruz Francisco J, Dey ES, Buchweishaija J, Mkyayula LL, Ye L (2008) Isolation of anacardic acid from natural cashew nut shell liquid (CNSL) using supercritical carbon dioxide. *J Agric Food Chem* 56:9350–935
55. Pereira JM, Severino RP, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MF, Zottis A, Andricopulo AD, Oliva G, Corrêa AG (2008) Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 16:8889–8895.
56. Assunção, R. B., & Mercadante, A. Z. (2003). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): Variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81, 495–502.

57. Ferreira, M. Cola-Miranda, V. Barbastefano, C. A. Hiruma-Lima, W. Vilegas, and A. R. M. Souza Brito, "Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge," *Fitoterapia*, vol. 79, no. 3, pp. 207–209, 2008.
58. Mota, G. Thomas, and J. M. Barbosa Filho, "Antiinflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L," *Journal of Ethnopharmacology*, vol.13, no. 3, pp. 289–300, 1985.
59. Kubo, M. Ochi, P. C. Vieira, and S. Komatsu, "Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 41, no. 6, pp. 1012–1015, 1993.)
60. Wasserman, D.; Dawson. C.R.; Cashew nut shell liquid, 3. The Cardol component of Indian cashew nut shell liquid with reference to the liquid's vesicant activity. *J. Am. Chem. Soc.* (1948). 70; 3675-3679.
61. Baker, J.T.; Wells, R.J.; in *Natural Products as Medicinal Agents*, Hippokrates Verlag, Stuttgart, (1981)
62. Sharkwr, SE.; Hajj, J.A.; 27^o Anual Meeting of the Americam Society of Pharmacognosy (1986) 25.
63. Oyama, T.Sassa, M. Ikeda, Structures of new plant growth inhibitors, trans- and cis- resorcylide. *Agric. Biol. Chem.*42, 2407-2409 (1978)
64. Aldrigde, D.C.; Gralt, S.; Giles, D.; Turner, W.B.; *J. Chem. Soc. C* (1971) 1623.
65. Lee KH, Hayashi N, Okano M, Hall IH, Wu RY, Mcphail A 1982. Lasiodiplodin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. *Phytochemistry* 21: 1119-1121.

66. Himejima, M., Kubo, I. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 418
67. Kubo, I., Komatsu, S., Ochi, M. J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 970.
68. Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M. J. Agric. Food Chem. 1993, 41, 1016;
69. Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A. Biorganic and Medicinal Chemistry 1999, 3, 873.
70. Attanasi, O.A., Filippine, P. Chim. Ind. (Milano), 2003, 85, 11.
71. Gabriele Meli., Graziella Tocco., Gianni Podda. Síntesis, Estudio y Aplicación de nuevos derivados cumarínicos. Departamento de Química y Tecnología del Fármaco. 2009
72. Laurens A, Fourneau C, Hoequemiller R, Cave A, Bories C, Loiseau Phillippe M. Antivectorial activities of cashew nut shell extract from *Anacardium occidentale* L. *Phytotherapy Res* 1997; 11: 145–6.
73. Farias DF, Cavalheiro M, Viana SM, De Lima GPG, Da Rocha-Bezerra LCB, Carvalho AFU. Insecticidal action of sodium anacardate from Brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 2009; 25(3): 386–9.
74. Mukhopadhyay, A.K. Hati, W. Tamizharasu & P. Satya Babu. Larvicidal properties of cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale* L) on immature stages of two mosquito species. *J Vector Borne Dis* 47, December 2010, pp. 257–260
75. De Paula, R.C.M.; Healthy, F.; Budd, P.M. Characterisation of *Anacardium occidentale*: Exudate polysaccharide. *Polym. Int.* 1998, 45, 27–35.)

76. Muroi H, Kubo I (1993) Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J Agric Food Chem* 41:1780–1783
77. Arce, G., Sánchez, L.A., Slaa, J., Sánchez-Vindas, P.E., Ortiz, A., van Veen, J., Sommeijer, M.J. 2001. *Árboles Melíferos Nativos de Mesoamérica*. Herbario JuvenalValerio Rodríguez; Heredia, Costa Rica; 208 p.
78. Hoyos, J. 1985. Flora de la isla de Margarita, Venezuela. Sociedad y Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Monografía No. 34; Caracas, Venezuela; 927 p.
79. Lima, R.D.N., Lima, J. R., de Salis, C.R., Moreira, R.D. 2002. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35:45-53.
80. Kadiri, S., Arije, A., Salako, B.L. 1999. Traditional herbal preparations and acute renal failure in South West Nigeria. *Tropical Doctor* 29 (4): 244-246.
81. Ikeda, R., Tanka, H., Uyama, H., Kobayashi, S. 2002. Synthesis and curing behaviors of a crosslinkable polymer from cashew nut shell liquid. *Polymer* 43:3475-3481.
82. Prabha, S.P.S., Rajamohan, T. 1998. Effect of inclusion of cashew globulin (*Anacardium occidentale*) to a casein diet on lipid parameters in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 53 (1): 83-92.
83. Leszczynska, J., Kucharska, U., Zegota, H. 2000. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. *European Food Research and Technology* 210 (3): 213-215.
84. Wang, F., Robotham, J.M., Teuber, S.S., Tawde, P., Sathe, S.K., Roux, K.H. 2002. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidental*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *Journal of Allergy and Clinical* 110 (1): 160-166.

85. Menezes, E.A., Tome, E.R., Nunes, R.N., Nunes, A.P., Freire, C.C.F., Torres, J.C.N., Castro, F.M., Croce, J. 2002. Extracts of *Anacardium occidentale* (cashew) pollen in patients with allergic bronchial asthma. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 12 (1): 25-28.
86. Folster-Holst, R., Hausen, B.M., Brasch, J., Christophers, E. 2001. Allergic contact dermatitis caused by poison ivy (*Toxicodendron* spp.). *Hautarzt* 52 (2): 136-142.
87. López-Palacios, S .1986. Catálogo para una Flora Apícola Venezolana. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela; 211 p.
88. Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M. y Tantaoui- Elaraki, A. 1993a. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in the agar medium. *J Ess Oil Res* 5:179–184.
89. Carson, C.F., Hammer, K.A. y Riley, T.V. 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82, 181–185.
90. Smith, M. D. y Navilliat, P. L. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *J Microbial Methods*. 28:21–24.
91. Mann, C.M. y Markham, J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J App Microbiol* 84:538–544.
92. Hammer, K. A., Carson, C.F. y T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils another plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 86:985–990.

- 93.** NCCLS. Evaluating Production Lots of dehydrated Mueller-Hinton Agar, approved standard. NCCLS document M6-A. NCCLS: Wayne, Pennsylvania; 1996.
- 94.** NCCLS, 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Fifth edition. NCCLS document M7-A5. [ISBN 1-56238-394- 9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898. USA
- 95.** Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disks Susceptibility Tests. Approved Standard-Seventh Edition. Vol 20,.N° 1 M2-A7 NCCLS.
- 96.** Lorian,V. (ed). 1986. Antibiotics in laboratory medicine, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 97.** Mc Farland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J. Am. Med. Assoc. 49: 1176 – 1178.
- 98.** Forbes, B. D. F. Sahm, and A.S. Weissfeld.1998. Bailey & Scott’s diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc.,St. Louis.
- 99.** Kimberley A. Whitman et al “Finfish and Shellfish bacteriology manual: techniques and procedures” First Edition. United States. Wiley-Blackwell,2004.
- 100.** Elmer W, Koneman et al “Koneman’s color atlas and textbook of diagnostic microbiology” 6^o Edition.Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- 101.** Peter Doolin “Medical Assisting Made Incredibly Easy: Lab Competencies” First Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

- 102.** Cristhian Alberto Rojas Herrera. Epidemiología de las infecciones osteoarticulares por estafilococo aureus meticilino resistente en los últimos 5 años en el Hospital de la Misericordia; Universidad Nacional De Colombia Facultad De Medicina Departamento de Ortopedia y Traumatología 2012.
- 103.** M. Nixon, MRCS, Clinical Research Fellow in orthopaedicsb. Jackson, mbchb, Foundation Year 2G. Taylor, FRCS(Orth), Consultant Orthopaedic and Trauma surgeondepartment of Orthopaedics Glenfield Hospital, Leicester, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus on orthopaedic wards NCIDENCE, SPREAD, MORTALITY, COST AND CONTROLJ Bone Joint Surg [Br] 2006;88-B:812-17.
- 104.** A. Patel, MD, Fellow in Orthopaedic Trauma M. Plante, MD, Fellow in Orthopaedic Trauma N. Arcand, MD, Fellow in Orthopaedic traumac. Born, MD, Professor of Orthopaedic Surgery Department of Orthopaedic REVIEW ARTICLE Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in orthopaedic surgery , J Bone Joint Surg [Br] 2008;90-B:1401-6.
- 105.** Clinical Microbiology Reviews, vol 13; 16-34.
- 106.** Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. Ann Intern Med 2001;134:298-314.
- 107.** Camarena J, Sánchez R. Infección por Staphylococcus aureus resistente a meticilina. Programa de Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Revisiones Temáticas. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/sarm.htm.

- 108.** Minnesota Department of Health. Recommendations for prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in acute care settings, January 2008. Available at:
<http://www.health.state.mn.us/divs/idepc/diseases/mrsa/rec/rec.pdf>. Accessed May 5 2008.
- 109.** Kluytmans J, van Belkum A and Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol. Rev 1997; 10: 505-20.
- 110.** Sopena N, Sabriá M. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Med Clin (Barc)2002;118(17):671-6).
- 111.** Velásquez J, Lizaraso F, Wong W, et al. Vigilancia de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a la oxacilina-vancomicina y patrones de correspondencia. Rev Per Soc Med Intern. 2002;15(4): 184-9. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/v15n4/vigilancia_resistencia_staphylococcus.htm.
- 112.** Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, et al. Mortality risk factors with nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in intensive care units: results from the German Nosocomial Infection Surveillance System (KISS). Infection. 2005;33(2):50-5.
- 113.** Hurtado, MP; de la Parte, MA; Brito A (Julio 2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Venezuela: 22 (2): pp. 112-118.
- 114.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health-care Settings. 2007.
- 115.** Manual of Clinical Microbiology. Murray, P. 1995 6th edition.

116. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.
117. Washington Winn, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Sixth Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
118. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 357: 1225-1240.
119. Novick RP. Movil genetic elements and bacterial toxinoses: The superantigens encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Olasmid*. 2003; 49: 93-105.
120. Lyon BR, May JW, Skurray RA. Tn 4001 a gentamicin and kanamycin resistant transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Genet*. 1984; 193: 554-556.
121. Murphy EL, Huwyler L, Bastos MC. Transposon Tn554: Complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutans. *EMBO J*. 1985; 4: 3357-3365.
122. Khan SA, Novick RP. Terminal nucleotide sequences of Tn551 a transposon specific erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with Tn3. *Plasmid*. 1980; 4: 148-154.
123. Novick RP, Schlievert P, Rauzin S. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes Infect*. 2001; 13: 585-594.
124. Fitzgerald JR, Reid SD, Ruotsalainen E. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin in like family of protein. *Infect Immun*. 2003; 71: 2827-2838.
125. De Leo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23: 17-34.

126. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002;35(7):819-24.
127. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3: 948-958.
128. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol*. 2005; 175: 3907-3919.
129. Kraus D, Peschel A. *Staphylococcus aureus* and innate antimicrobial defense. *Future Microbiol*. 2008; 3: 437-451.
130. Wardenburg JB, Bae T, Otto M, De Leo FR. Poring over pores: alpha-hemolysin and Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat Med*. 2007; 13: 1405-1406.
131. Moran GJ, Krishanadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim D, McDougal LK. Methicillin *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006; 355: 666-674.
132. Marcos Vivoni A, Meurer MB. Application of molecular techniques in the study of *Staphylococcus aureus* clonal evolution-A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 693-98.
133. Moreillon P, Que Y, Glauser M. *Staphylococcus aureus*. In Mandell GL, Bennett JE, Olin R. Principles and practice of infectious diseases. 6a ed. Philadelphia, Churchill Livingstone; 2005.
134. Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Foulger VG. *Staphylococci in human disease*. 2nd Edition. Wiley-Blackwell; 2009.

135. Jevons MP. Celebin resistant staphylococci. Br Med J. 1961; 1: 124-125.
136. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998; 339: 520-532.
137. Mensa J, Soriano A, Linares P, Barberán J, Montejo M, Sulavert M, et al. Guía de Tratamiento antimicrobiano de la Infección por *Staphylococcus aureus*. Rev. Esp. Quimioter. 2013;26(Suppl.1):1-84.
138. Calfee DP, Durbin LJ, Germanson TP, Toney DM, Smith EB, Farr BM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24(6):422-6.
139. Cué M, Morejón M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. Rev Cubana Med Gen Integr 1998;14:347-361.
140. Sande MA, Kapusnik-Uner JE, Mandell DI. Agentes antimicrobianos. Consideraciones generales. En: Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª ed. México DF: El Manual Moderno. 1988:110-135.
141. Alvarado Alva J.C. Antibióticos. Apuntes Médicos del Perú. AMP Ediciones, 2006. Lima – Perú. Pág. 12-15.
142. Cordiés L, Machado LA, Hamilton ML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Med 1998; 1:13-27
143. Barranco E. Aminoglucósidos. Acta Med 1998; 8:48-53
144. Delgado A. Los aminoglucósidos. Acta Med 1990; 4:238-46

145. Begg EJ, Baregat ML. Aminoglycosides. 50 years on. Br J Clin Pharmacol 1995; 39:597-603.
146. Sanchez Saldaña J, Sáenz Anduaga E, Pancorbo Mendoza J, Lanchipa Yokota P, Zegarra del Carpio R. Antibióticos Sistemicos en Dermatología. Primera parte: Betalactamicos-Carbapenems-Aminoglucósidos-Macrólidos. Dermatología Peruana.2004.vol.14N°1;7-20
147. Martínez, M. 1996. Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera (sábila). Rev. Cubana Plant Med. 1(3):18-20.
148. Ramirez , L.; DÍAZ, M. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia et Technica. 13(33):397-400.
149. Torres, C.M.2004. Investigación en la Transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica. Bogotá D. C. Pág. 2-14.
150. Comas Noya R.E . 2014. Contribución a la Estandarización del Proceso de Obtención a Escala de Laboratorio de Un Extracto de las hojas de *Psidium Guajaval*. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.
151. Torres, C. M. 2007. Investigación en procesos de transformación de sustancias de interés presentes en hojas, tubérculos, semillas y frutos de especies andinas, para generar productos agroindustriales que pueden ser destinados a nivel industrial, medicinal o alimenticio. Segundo Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis - Sud Dirección Científica. Bogotá D.C

152. Prácticas de Microbiología General. 1° Ingenieros Agrónomos .Curso 2005-2006.
153. **Instituto Nacional de Salud (INS)**. Manual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Por El Método De Disco Difusión. Ministerio de Salud. LIMA -2002. Pág.: 13-19; 20-22.
154. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.
155. Hajar. G,. Bioseguridad En El Laboratorio. Bioseguridad. Ministerio de Salud del Peru, Instituto Nacional de Salud-INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud.
156. Gamazo de la Rasilla C, Lopez-Goñi I, Díaz García R. Manual Práctico de Microbiología. Barcelona (España). 3ª Edicion.2005.
157. Betancourt Badell. J. (1999). Cuestiones éticas en la experimentación animal. DOC.
158. Evaluación Fitoquímica Del Extracto De Hojas De *Genipa Americana L.* “Huito” Y Su Actividad Antifúngica *In Vitro* Frente A Los Dermatofitos De Importancia Médica. Espinoza Manchego, Miriam Luisa, Herrera Lengua, Luis Felipe. Instituto Nacional De Salud. 2005. Perú.
159. Domingo D. y López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Revisión. Rev. Esp. Quimioterapia. 2003 Diciembre; 16 (4): 385-393.
160. Cabieses F. Plantas medicinales y su legislación. Seminario Taller “Control de calidad de medicamentos herbales y similares” Serie de documentos N°4. Instituto Nacional de Salud, Lima 12-14 agosto. 1996; p. 17-23.
161. Lahlou M. (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.*; 18(6): 435-48.

- 162.** Toribio MS, Oriani DS y Skliar MI. Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars. Pharm.* 2004; 45(4): 335-341.
- 163.** Rodríguez M, Zevallos F. Actividad antibacteriana *in vitro* del fruto de *Morinda citrifolia l.* y planta entera de *Notholaena nivea* (poiret) desv, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, Imet-Essalud 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
- 164.** Ríos N, Dávila R. “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013”. *Essalud 2013*, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
- 165.** Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J. Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6: 2-2.
- 166.** Bhandari DK, Nath G, Ray AB, Tewari PV. Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark. *Pharmaceutical Biology.* 2000;38 (4):254-7.
- 167.** Martínez O, Montejo CE, Duverger RJ, Berlanga AJ. Tratamiento de la diarrea de los terneros con Polvo AO. *Rev Inf Vet.* 2001; 6:7-16.
- 168.** Tello J. Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio *in vitro*. [Tesis de pregrado] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2011.
- 169.** Omojasola P, Awe S. The antibacterial activity of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* and *Gossypium hirsutum* against some selected microorganisms. *Bioscience Research Communications*, 2004; 16(1):25-28

5.2. - URL`s

1.- *Anacardium occidentale*.

Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Anacardium_occidentale

2.- Marañón (*Anacardium occidentale*). Perú Ecológico

Disponible en: http://www.peruecologico.com.pe/flo_maranon_1.htm

3.- Gonzalo O, Boehme C. Infecciones Staphylocócicas. Universidad la Frontera.
Unidad de Infectología. Pág.1

Disponible en: <http://www.med.ufro.cl/.../infecciones-...>

4.- La penicilina el hallazgo que cambio la historia de la medicina

Disponible en: <http://www.educastur.princast.es/.../>

ANEXOS

ANEXO Nº 01

**DATOS DE PASAPORTE DE COLECCIÓN DE ESPECIES DE LAS
PLANTAS MEDICINALES EN ESTUDIO**

Nº de Ficha:

FICHA DE CAMPO

DATOS GENERALES:

Lugar de colección:.....Distrito:.....Provincia:.....
Fecha:.....Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X).....(Y).....
Tipo de Suelo:.....Otras características:.....
Nombre del Colector:.....Nº Colección:.....

TAXONOMÍA:

Familia Vegetal:.....Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....

CARACTERÍSTICAS VEGETALES:

Habitad:.....Estadio Productivo.....
Posición de Hojas:.....Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:.....Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:.....Látex:.....Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:.....Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:.....Nº de Pétalos:.....Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:.....Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:.....Nº de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:.....Consistencia:.....Dehiscencia:.....

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:.....

COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Peso:.....
Parte Colectada:.....
Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO Nº 02

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE Adolf Engler, MODIFICADO POR H. Melchior (1964), DE *Anacardium occidentale* L.



ANEXO Nº 03

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Anacardium occidentale* L.



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 24

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por los Bachilleres: **SILVIA MARGARITA GÓMEZ SEOPA** y **JOHN EDWARD PEREIRA SANDOVAL**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *Anti-Staphylococcus aureus* DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Anacardium occidentale* Linn. "casho" MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO KIRBY-BAUER". La cual fue verificado e identificado en este Herbarium Amazonense - AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Cod. Amaz N°	Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
25350	ANACARDIACEAE	<i>Anacardium occidentale</i> L.	"casho"

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

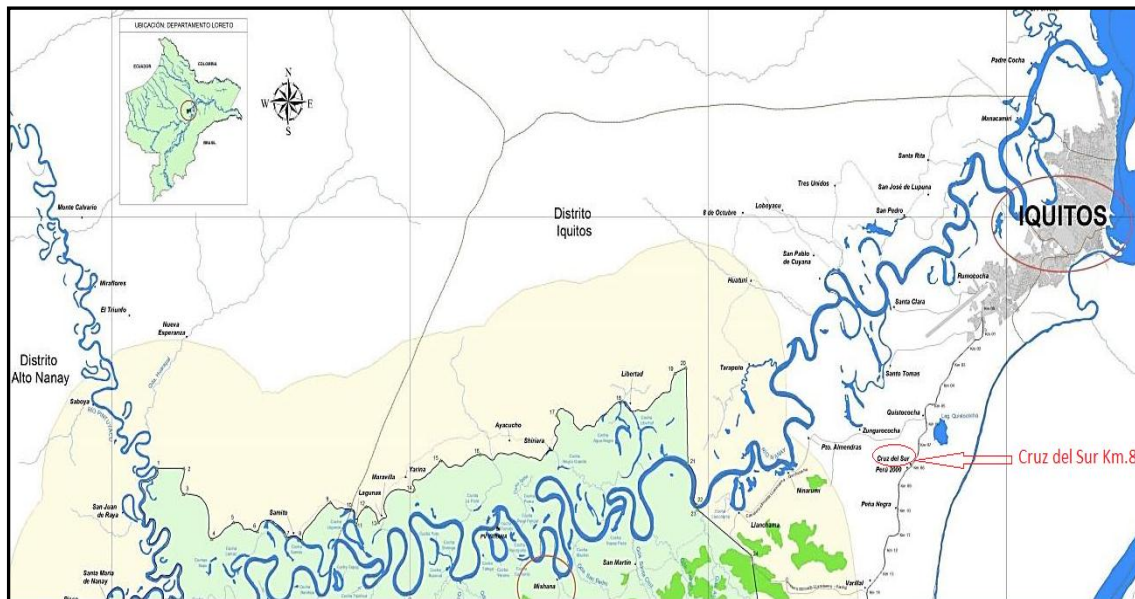
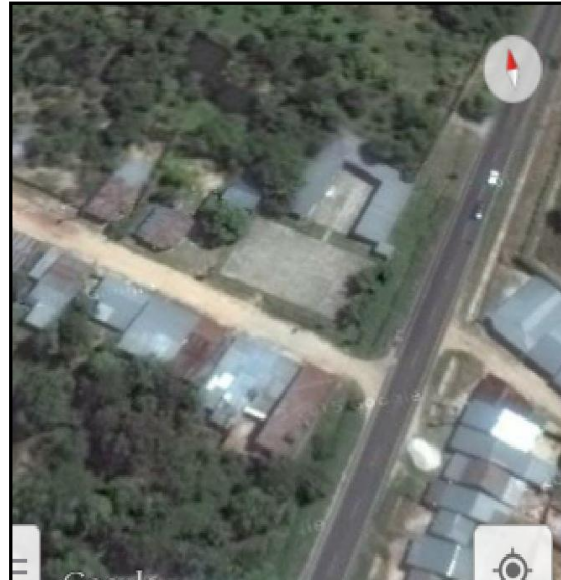
Iquitos, 13 de Abril del 2015

Bigo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.S.C.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP



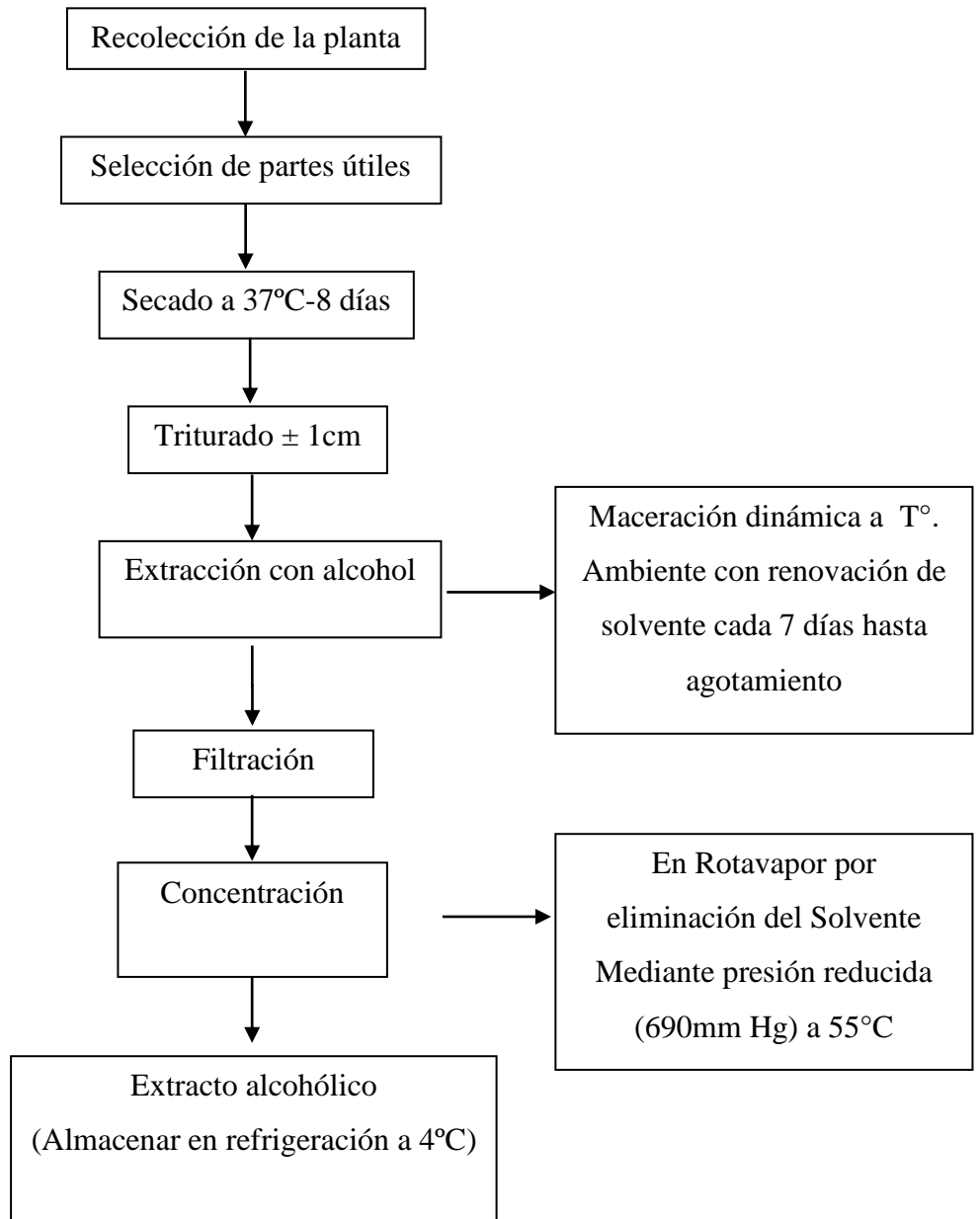
ANEXO Nº 04

UBICACIÓN GEOGRAFÍA DEL CENTRO POBLADO CRUZ DEL SUR



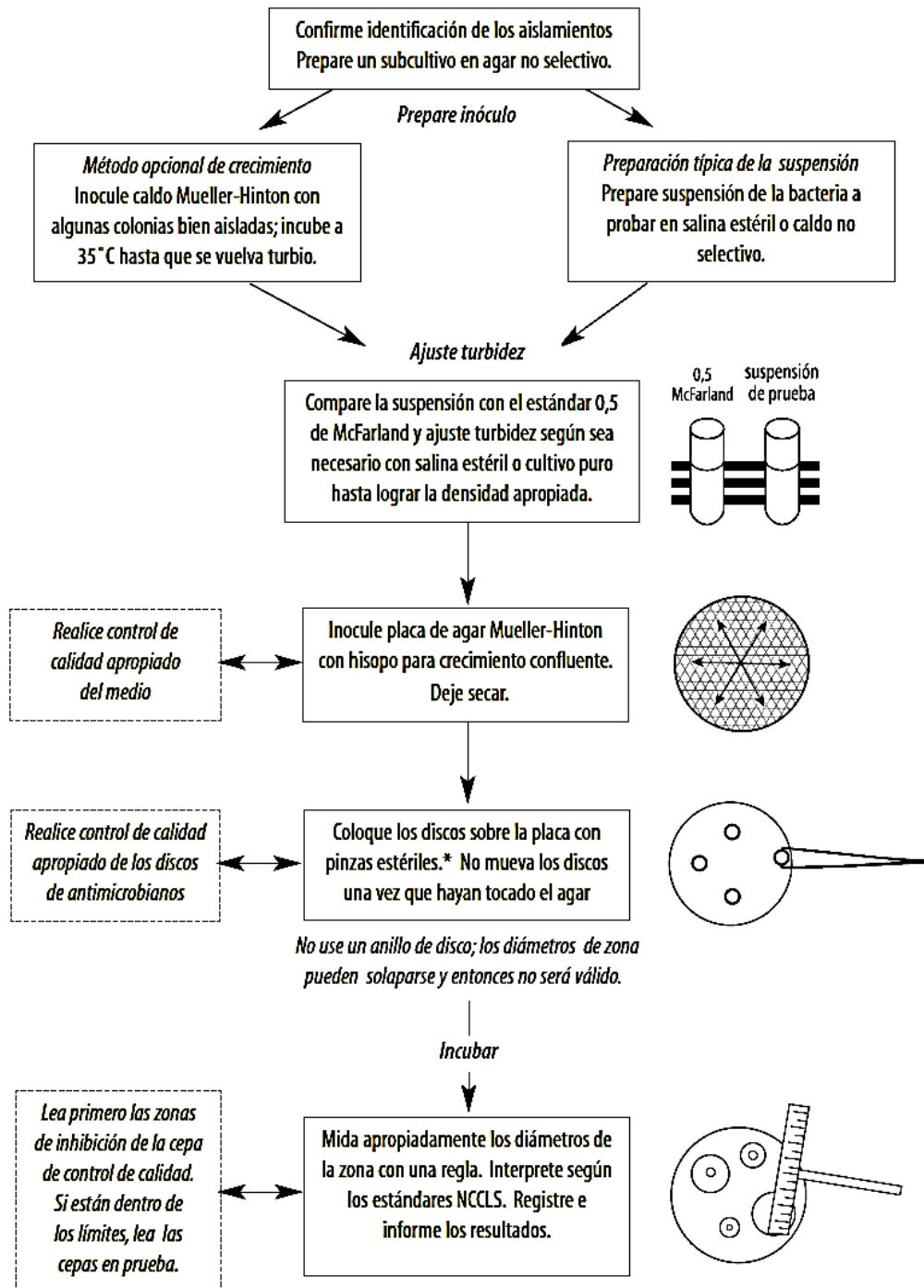
ANEXO Nº 05

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* Linn. (CASHO)



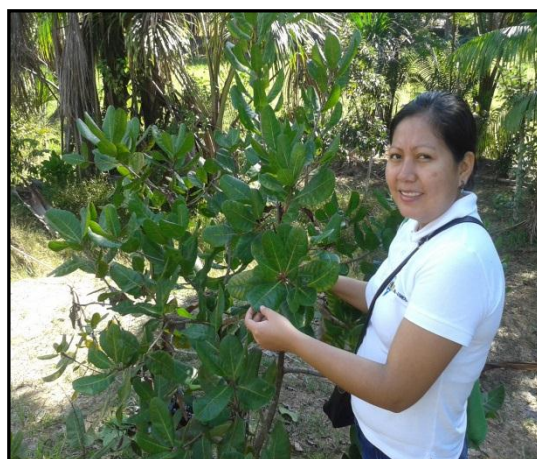
ANEXO Nº 06

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
(Difusión en disco Kirby – Bauer)



ANEXO N°07

RECOLECCION DE LAS HOJAS, DE *Anacardium occidentale* L. (cacho)



ANEXO N° 08

SECADO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)



ANEXO Nº 09

**TRITURADO DE LAS HOJAS SECAS DEL *Anacardium occidentale* L.
(casho)**



ANEXO Nº 10

**PESADA DE LAS HOJAS (TRITURADAS) DE *Anacardium occidentale* L.
(casho)**



ANEXO Nº 11

MACERADO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)



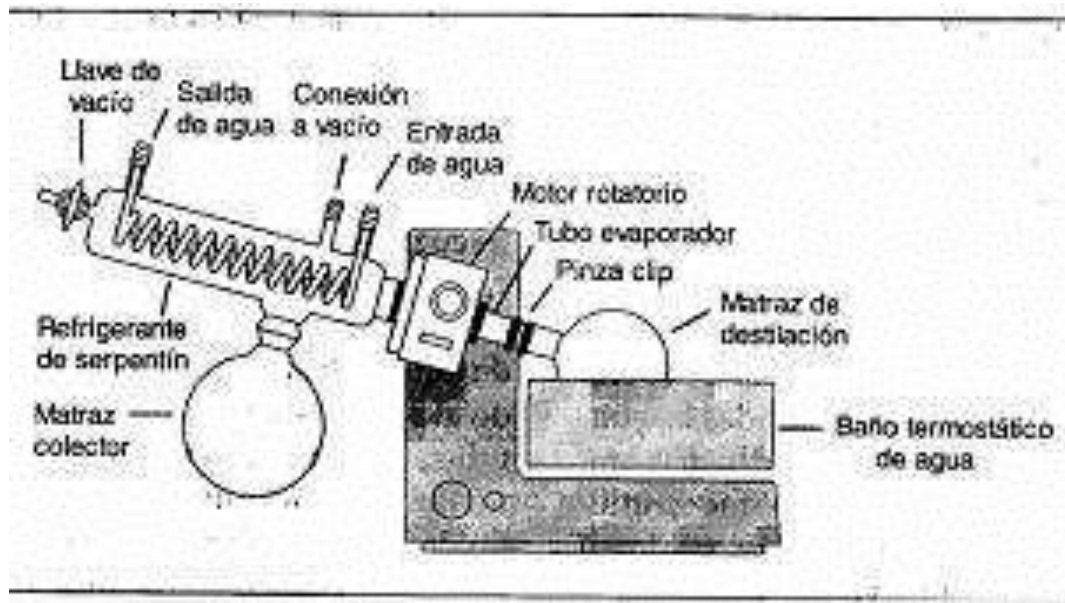
ANEXO Nº 12

FILTRADO DE LA MACERACION DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)



ANEXO Nº 13

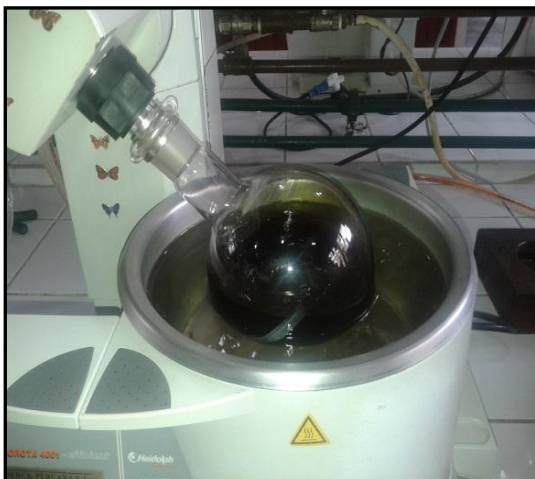
**ELIMINACIÓN DE UN DISOLVENTE A PRESIÓN REDUCIDA
(ROTAVAPOR)**



Fuente: http://rodas.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357ffa2b34/2/modulo_general_SCORM.zip/pagina_19.htm

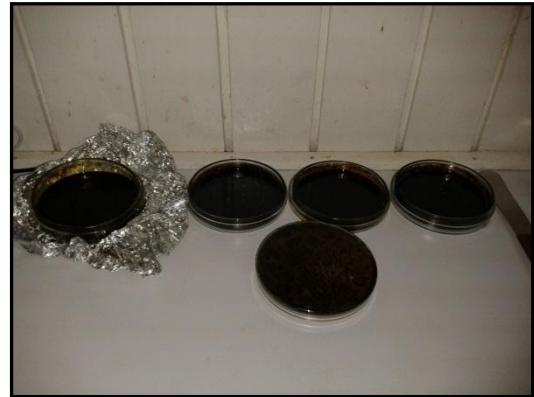
ANEXO Nº 14

**CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE
Anacardium occidentale L. (cacho) EN ROTAVAPOR**



ANEXO Nº 15

SECADO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)



ANEXO Nº 16

ESTERILIZACION DE LOS MATERIALES





ANEXO Nº 17

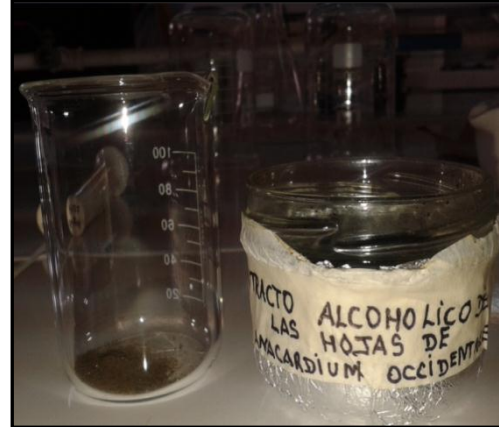
ESTERILIZACION DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD

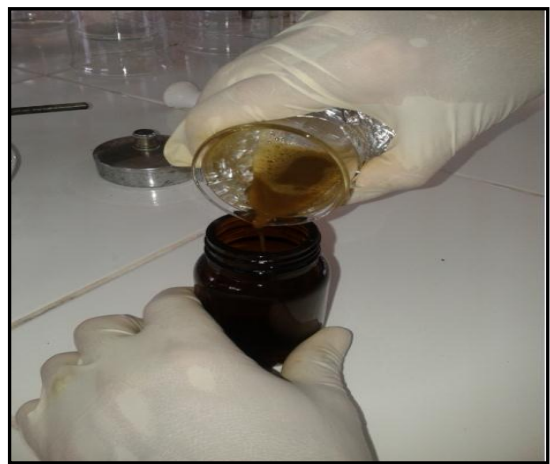


ANEXO Nº 18

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)







ANEXO N°19

**OBTENCION DE LA MACRODILUCION DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO
DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)**



ANEXO N° 20

PREPARACION DEL AGAR MUELLER HINTON, AGAR TRIPTICASA DE SOYA Y CALDO TRIPTICASA DE SOYA

a. PREPARACION DEL AGAR MUELLER HINTON

Composición	g/L
Infusión de carne	2.0
Hidrolizado de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar-Agar	17.0

Preparación:

Disolver 38g del polvo en un litro de agua purificada. Mezcle bien. Caliente agitando frecuentemente y hiérvala durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. Evite calentar demasiado la solución.

Este lote de agar Mueller Hinton ha sido probado y cumple los límites de aceptación del protocolo M6 actual publicado por el National Committee for clinical Laboratory Standards de Estados Unidos. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento. Para uso en laboratorio

*pH final: 7.3±0.1 Higroscópico

* Mantener el envase bien cerrado.

b. PREPARACION DEL AGAR TRIPTICASA DE SOYA

Composición	g/L
Peptona de caseína	15.0
Peptona de harina de soya	5.0
Cloruro sódico	5.0
Agar-Agar	15.0

Preparación:

Disolver 40 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezcle bien. Caliente ligeramente para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121°C durante 15 minutos. Evite calentar demasiado la solución.

*pH final: 7.3±0.2 Higroscópico a 25 °C

**c. PREPARACION DEL CALDO TRIPTICASA DE SOYA
MEDIO DIGERIDO DE SOYA- CASEINA**

Base para medio universal. Cumple con las especificaciones USP/EP/JP, si procede.

Composición	g/L
Digerido pancreático de caseína	17.0
Digerido papaínico de soya	3.0
Dextrosa	2.5
Cloruro sódico	5.0
Fosfato Dipotásico	2.5

Preparación:

Suspenda 30g del polvo en un litro de agua purificada. Mezcle bien. Caliente ligeramente para disolver completamente el polvo. Autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Formula aproximada * por litro

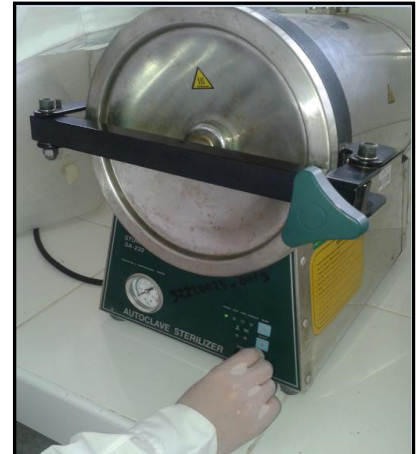
*Ajustada y/o suplementada en la medida necesaria para cumplir los criterio de rendimiento.

Para uso en laboratorio

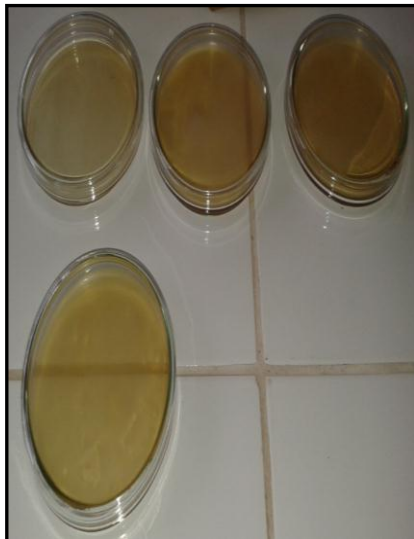
*pH final: 7.3±0.2 Higroscópico

Higroscópico * Manténgase el envase bien cerrado.









ANEXO Nº 21

TRANSPORTE DE LA MUESTRA Y MEDIOS DE CULTIVO



ANEXO Nº 22

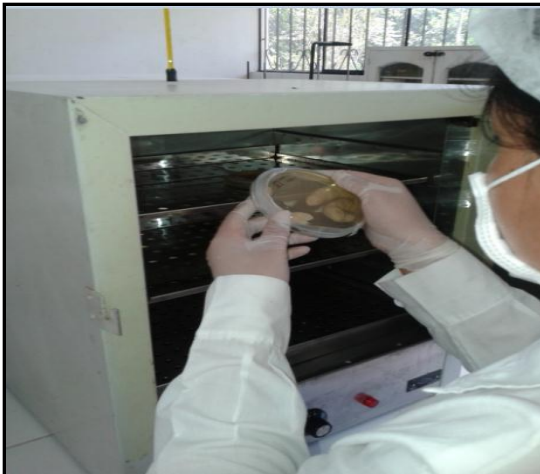
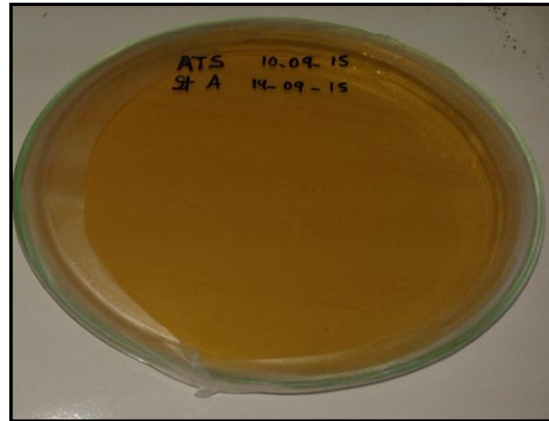
Cepa *Staphylococcus aureus*



ANEXO Nº 23

ACTIVACION DE *Staphylococcus aureus*

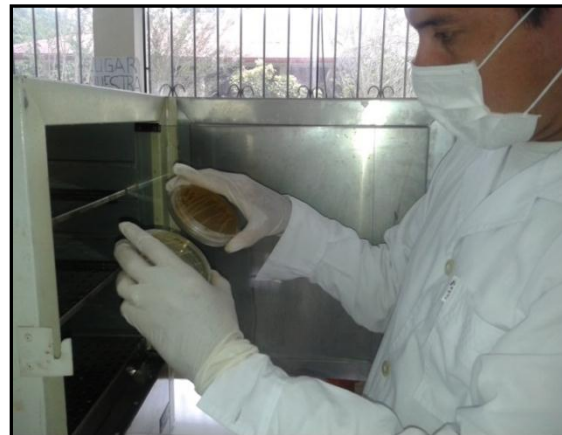






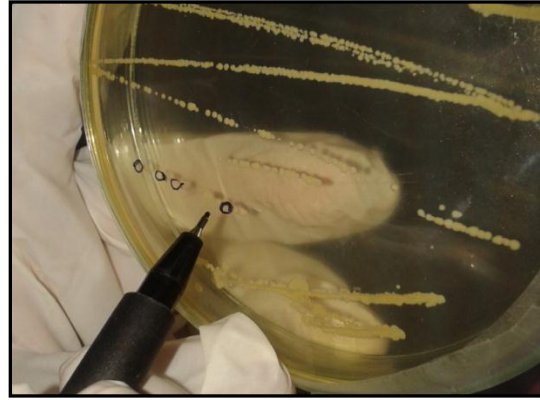
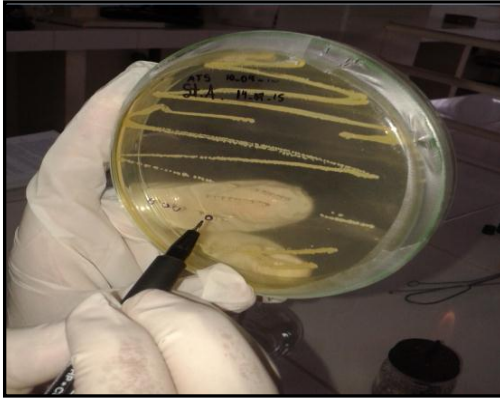
ANEXO Nº 24

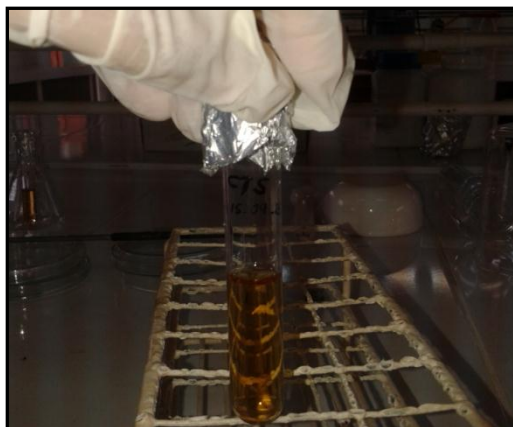
CEPAS ACTIVADAS DE *Staphylococcus aureus*



ANEXO Nº 25

PREPARACION DEL INOCULO DE *Staphylococcus aureus*





ANEXO Nº 26

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR 0.5 ESCALA DE MAC FARLAND

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como Estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland).

Para prepararlo proceda de la siguiente manera:

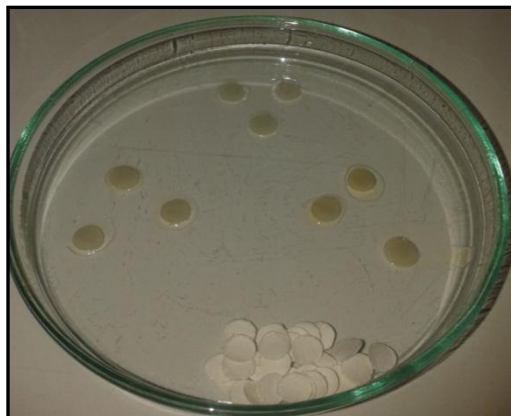
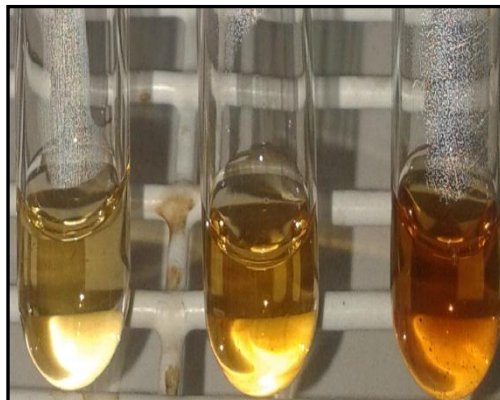
- Prepare dicho estándar agregando 0,5 ml de BaCl_2 0,048M (1,175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V).
- Verifique la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland.
- Distribuya 4 - 6 ml dentro de tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos.
- Mantenga los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
- Agite vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.
- Reemplace o verifique la confiabilidad de los estándares mensualmente.

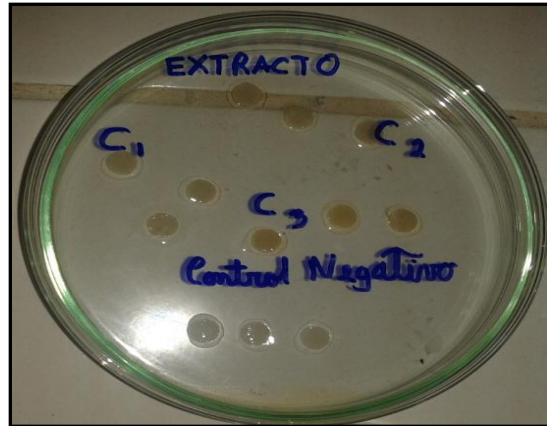




ANEXO Nº 27

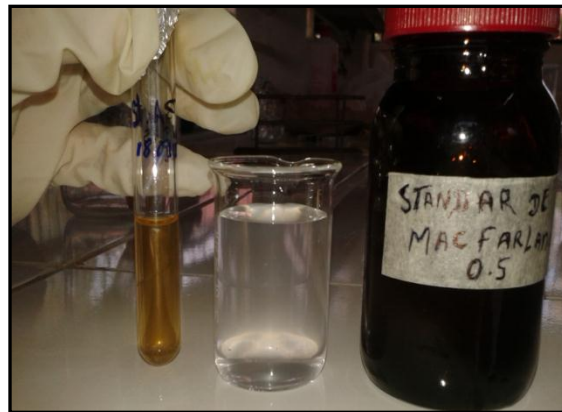
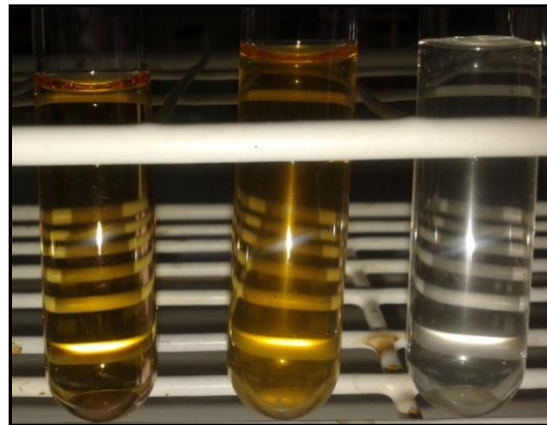
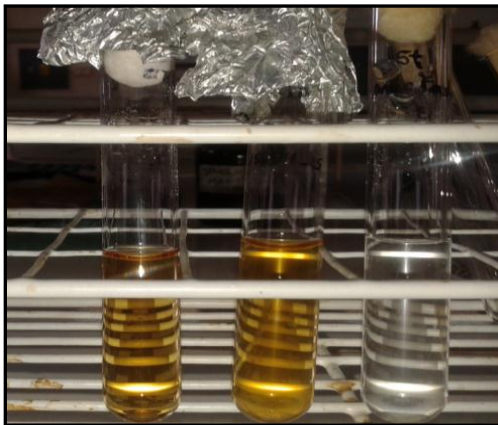
PREPARACION DE LOS DISCOS INPREGNADOS CON EL EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE *Anacardium occidentale* L. (casho)





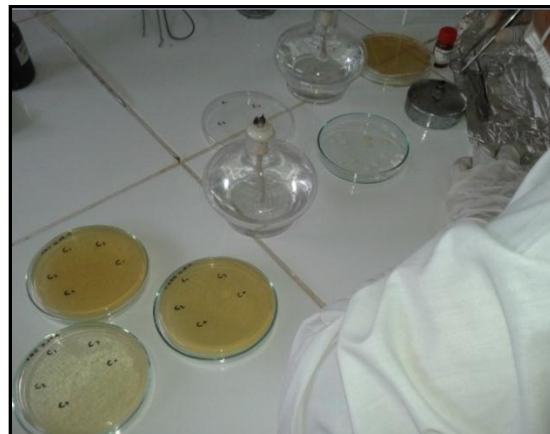
ANEXO Nº 28

AJUSTANDO LA TURBIDEZ DEL INOCULO CON EL ESTANDAR 0.5 DE MAC FARLAND



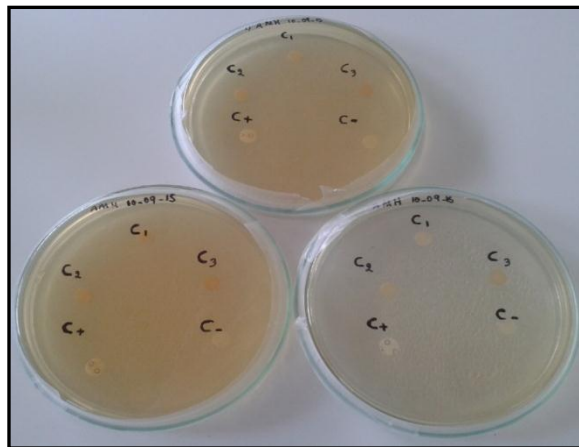
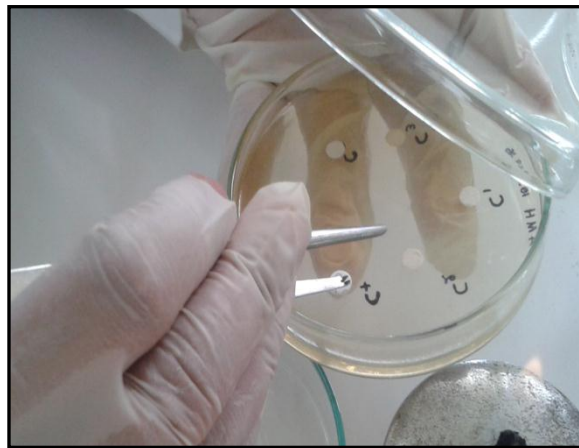
ANEXO Nº 29

INOCULACION DE LAS PLACAS



ANEXO Nº 30

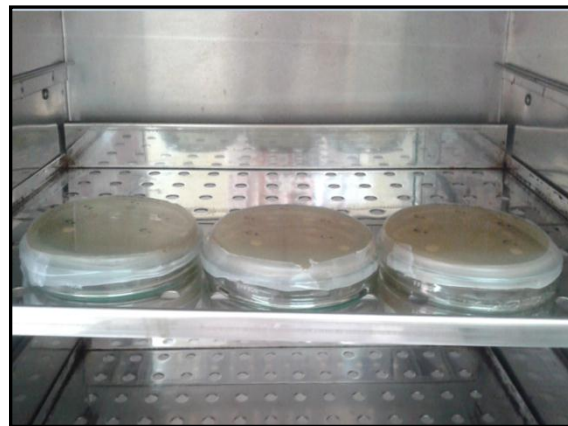
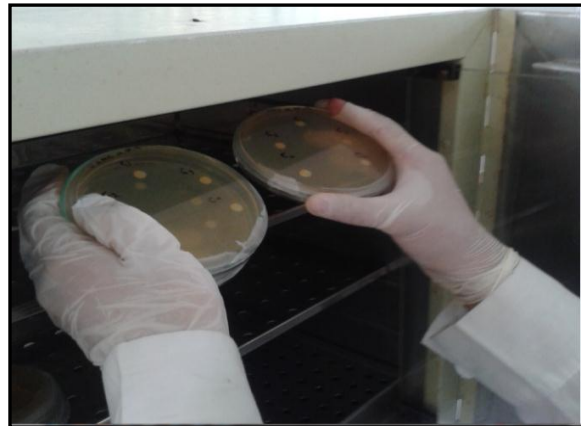
APLICACIÓN DE LOS DISCOS





ANEXO Nº 31

INCUBACION DE LAS PLACAS



ANEXO Nº 32

LECTURA DE LAS PLACAS

