

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA
PERUANA**



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**PROYECTO DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
*QUÍMICO FARMACÉUTICO***

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO
LIOFILIZADO DE HOJAS DE LA ESPECIE *Persea americana* (PALTO)
SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS, IMET- EsSALUD 2013”.**

AUTOR : BACH. FERREYRA SHUPINGAHUA, STEPHANI.

**ASESORES : Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG.
ING JORGE YSAAC VILLACRÉS VALLEJO MGR.**

IQUITOS - PERÚ

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE HOJAS DE LA ESPECIE *Persea americana* (PALTO) SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS, IMET- EsSALUD 2013”.

Bach. Stephani Ferreyra Shupingahua

RESUMEN

El hombre desde la antigüedad ha buscado en las plantas la curación para sus diversas enfermedades. Por eso la presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto) sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las hojas fueron recolectadas del Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) de EsSALUD, del cual se obtuvo el extracto acuoso liofilizado, preparándose concentraciones de 200mg/ml, 300mg/ml y 400mg/ml. Obtenidos los extractos se determinó la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de disco difusión en agar, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos, utilizando como control positivo la gentamicina 10µg y agua estéril como control negativo. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó por macrodilución, que es la concentración más baja de la sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. Al analizar los resultados de los ensayos se observó que el extracto acuoso de las hojas de *Persea americana* (palto) a concentraciones de 200mg/ml, 300mg/ml y 400mg/ml, tuvo 59.61%, 61.51% y 65.37% respectivamente de actividad frente a *Enterococcus faecalis*; frente a *Escherichia coli* a 200 y 300 mg/ml tuvo 56.35%, y a 400 mg/ml tuvo 63.61% de actividad; y en cuanto a *Staphylococcus aureus* se obtuvo un 49.18% a 200 y 300 mg/ml y 52.43% de actividad a una concentración de 400 mg/ml. En la determinación de la CMI, el extracto tuvo 64mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*, 32mg/ml frente a *Escherichia coli* y 64mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, extracto, liofilizado.

“IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LYOPHILIZED AQUEOUS EXTRACT OF LEAVES OF THE SPECIES *Persea americana* (AVOCADO) ON PATHOGENIC MICROORGANISMS, IMET- EsSALUD 2013”

Bach. Stephani Ferreyra Shupingahua

SUMMARY

The man from antiquity has searched in the plants, the healing for their various illnesses. Therefore, the objective of this research is to determine the in vitro antibacterial activity of lyophilized aqueous extract of leaves of the species *Persea americana* (avocado) on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The leaves were collected from Botanical Garden of the Institute of Traditional Medicine (ITME) of EsSALUD, of which was obtained the lyophilized aqueous extract, preparing concentrations of 200 mg/ml, 300 mg/ml and 400 mg /ml, obtained the extracts was determined the antibacterial activity using the technique of disk agar diffusion , test that let to measure the *IN VITRO* susceptibility of pathogenic microorganisms, using the same way as a positive control gentamicin 10µg, and steril water as a negative control. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by macrodilution, which is the lowest concentration of the substance that can inhibit the visible growth of a microorganism after incubation for 18 hours. At the end the results of the tests , it was observed that the aqueous extract from the leaves of *Persea Americana* (avocado) at concentrations of 200 mg/ml, 300 mg/ml and 400 mg /ml had 59.61 % , 61.51% and 65.37% respectively against to *Enterococcus faecalis*, against *Escherichia coli* 200 mg/ml and 300mg/ml had 56.35% and 400 mg/ml had 63.61% of activity , was obtained a *Staphylococcus aureus* 49.18% to 200 mg/ml and 300 mg/ml and 52.43% of activity at a concentration of 400 mg/ml. In the determination of the CMI, the extract had 64mg/ml against *Enterococcus faecalis*, 32 mg/ml against *Escherichia coli* and 64 mg/ml against *Staphylococcus aureus*.

Key words: Antibacterial activity, extract, lyophilized

DEDICATORIA

A MIS PADRES: Dioclicio Ferreyra Lavy y Marcia Shupingahua Tangoa por brindarme su amor, apoyo incondicional y la oportunidad de formarme como profesional y ser ejemplo; los amo mucho.

A MIS HERMANOS: Alain y Andrés por sus apoyo y cariño, los quiero mucho.

A MIS ABUELITOS: Julia, Tomasa, Alonso y en especial a mi abuelito Nemesio que está en el cielo e influyo mucho en mi formación personal.

A MI TIAS Y TIOS: Silvia, Carmen, Zoila, Evita, Tania, Made, Juan, José, Amarildo, Manuel, Javier, Oscar.

A MIS AMIGOS: Tito, Franck, Robín, Claudio, Junior, Raúl, Jim Parra, Glendy, Mónica, Cecilia, Nelly, Cristian, Alex, Norma, Luis por su amistad y compañerismo; y en especial a Eveling Vanessa por su gran apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

A DIOS por permitirme cumplir una de mis metas y darme fortaleza para seguir adelante. Gracias Padre por estar siempre conmigo, ser mi ayuda y por todas las bendiciones que me has dado a lo largo de mi camino.

Al Instituto de Medicina Tradicional por facilitarnos con los materiales y equipos para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Ing. Jorge Ysaac Villacrés Vallejo y QF Henry Delgado Wong por su participación y asesoramiento en la revisión de la tesis y en la evaluación durante las diferentes etapas del trabajo.

A mis asesores QF Daniel Torres Tejada, QF Brenda Urday Ruiz y QF Luis Vílchez Alcalá por sus apoyo, paciencia en la revisión de este proyecto.

A mis compañeros del área de Microbiología Neiser Ríos Gómez y Norita Danae Gaviria Tananta, por su colaboración, paciencia y dedicación durante el desarrollo de este trabajo

Y a todas las personas que no mencioné y que apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 2 |
| DEDICATORIA | 4 |
| AGRADECIMIENTO | 5 |
| LISTA DE CUADROS | 9 |
| LISTA DE TABLAS | 10 |
| LISTA DE GRÁFICOS | 11 |
| LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS | 12 |
| CAPÍTULO I | |
| 1.1. Introducción | 14 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 16 |
| 1.3. Objetivo | 18 |
| CAPÍTULO II. | |
| 2.1. Marco teórico | 20 |
| 2.1.1- <i>Persea americana</i> (Palto) | 20 |
| 2.1.1.1. Antecedentes. | 20 |
| 2.1.1.2. Clasificación Taxonómica | 22 |
| 2.1.1.3. Sinonimias | 22 |
| 2.1.1.4. Nombre Comunes. | 22 |
| 2.1.1.5. Descripción Botánica | 22 |
| 2.1.1.6. Estudio Fitoquímico. | 23 |
| 2.1.1.7. Habidad y Distribución. | 24 |
| 2.1.1.8. Ubicación en el Perú. | 25 |
| 2.1.1.9. Usos Tradicionales | 25 |
| 2.1.1.10. Estudios Farmacológicos | 26 |
| 2.1.2. Bacterias | 27 |
| 2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 2.1.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i> | 29 |
| 2.1.2.3. <i>Escherichia coli</i> | 31 |
| 2.1.3. Métodos para determinación de la Actividad Antimicrobiana <i>in vitro</i> . | 33 |
| Método de difusión | 33 |
| Métodos de dilución | 34 |
| 2.2. Definiciones operacionales. | 38 |
| 2.2.1. Variables. | 38 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1.1. Variable Independiente | 38 |
| 2.2.1.2. Variable Dependiente | 38 |
| 2.2.2. Indicadores | 38 |
| 2.2.2.1. Indicadores de la variable independiente | 38 |
| 2.2.2.2. Indicadores de la variable dependiente | 38 |
| 2.3. Hipótesis | 41 |
| CAPÍTULO III | |
| 3.1.- Metodología y diseño de la investigación. | 43 |
| 3.1.1.- Método de Investigación | 43 |
| 3.1.2.- Diseño del Estudio | 43 |
| 3.2.- Población y muestra | 43 |
| 3.3.- Materiales e instrumentos | 44 |
| 3.4.- Procedimiento de recolección de datos | |
| 3.4.1- Procedimiento para preparación de los extractos vegetales. | 48 |
| 3.4.1.1- Recolección de las muestras vegetales | 48 |
| 3.4.1.2- Preparación del pulverizado vegetal | 48 |
| 3.4.1.3- Preparación de extractos acuoso IMET (2007) | 49 |
| 3.4.1.4- Protocolo para la liofilización | 49 |
| 3.4.1.5- Preparación de las concentraciones | 49 |
| 3.4.1.6- Preparación de los discos de sensibilidad | 49 |
| 3.4.2- Prueba de Sensibilidad según protocolo del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) | 50 |
| 3.4.3- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria | 52 |
| 3.5- Análisis de datos | 53 |
| CAPÍTULO IV | |
| 4.1. Resultados | 55 |
| 4.2. Discusión | 65 |
| 4.3. Conclusión | 68 |
| 4.4. Recomendaciones | 69 |
| 4.5. Bibliografía | 70 |
| 4.6. Anexo | 80 |

LISTA DE CUADROS

| | | |
|--------------------|--|----|
| CUADRO 01 : | Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición | 48 |
| CUADRO 02 : | Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición | 48 |
| CUADRO 03 : | Actividad Antibacteriana de extractos acuosos liofilizados de hojas de <i>Persea americana</i> a partir del porcentaje de inhibición frente a los microorganismos en estudio | 59 |

LISTA DE TABLAS

TABLA 01: Promedios de los halos de inhibición (expresado en mm) de los diversos extractos acuosos liofilizados de *Persea americana* frente a los microorganismos en ensayo 53

TABLA 02: Porcentajes de inhibición (%) de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Persea americana* frente a los microorganismos en ensayo.....58

TABLA 03 : Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* frente a los microorganismos en estudio.....61

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| GRÁFICO 01A.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de <i>Persea americana</i> a 200, 300 y 400 mg/ml frente a <i>Enterococcus faecalis</i> | 54 |
| GRÁFICO 01 B.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de <i>Persea americana</i> a 200, 300 y 400mg/ml frente a <i>Escherichia coli</i> | 54 |
| GRÁFICO 01 C.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de <i>Persea americana</i> a 200, 300 y 400 mg/ml frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 55 |
| GRÁFICO 01 D.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de <i>Persea americana</i> a 200 mg/ml frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 55 |
| GRAFICO 01 E.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de <i>Persea americana</i> a 300 mg/ml frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 56 |
| GRÁFICO 01 F.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de <i>Persea americana</i> a 400 mg/ml frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 56 |
| GRÁFICO 02. Porcentajes de inhibición (expresado en porcentaje) de los extractos acuosos liofilizados de hojas de <i>Persea americana</i> a 200, 300 y 400 mg/ml frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> | 59 |
| GRÁFICO 03.- Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Persea americana</i> frente a los microorganismos en estudio..... | 61 |

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| °C | - grados Celsius |
| cm | - centímetro |
| mg | - miligramo |
| ml | - mililitros |
| mm | - milímetro |
| μl | - microlitro |
| ATCC | -American Type Culture Collection |
| CMI | - Concentración Mínima Inhibitoria |
| MHB | - Muller Hinton Broth o Caldo Mueller-Hinton |
| NCCLS | -National Committee for Clinical Laboratories Standards |
| OMS | -Organización Mundial de la Salud |
| UFC | - Unidad Formadora de Colonia |

CAPÍTULO I

1.1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una fuente importante de diversidad natural por la multitud de compuestos que ellas sintetizan.¹ Éstas son un valioso recurso para tratar enfermedades, por lo cual merecen un interés especial en la búsqueda de medicamentos, porque la medicina tradicional recoge el conocimiento transmitido a través del tiempo por generaciones; además, existe una probabilidad mucho más alta de encontrar compuestos activos contra determinadas enfermedades. Más del 25% de los medicamentos modernos proceden de plantas y menos del 2% de todas las especies de plantas han sido estudiadas con fines medicinales.²

Existen innumerables sustancias químicas de origen vegetal que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74% fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional.³

Actualmente se encuentran serios problemas de resistencia a los medicamentos antimicrobianos. Esto se presenta con diversos microorganismos dentro de los cuales cabe destacar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, en especial en el ámbito hospitalario; las infecciones adquiridas en hospitales son, en su gran mayoría, resistentes a estos antibióticos como en el caso del *S. aureus* que para el 2004, llegó al 60.7% de resistencia, requiriendo tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad.

Por ello en el Perú se han desarrollado investigaciones sobre la composición química de diversas especies vegetales y algunos estudios de sensibilidad microbiana; pero existen todavía muchas especies de las cuales no se conocen sus propiedades farmacológicas, lo que permitiría el uso apropiado de estos productos⁴. La flora peruana ofrece grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Se calcula que el Perú posee unas 25 000 especies de plantas conocidas, con 17 144 especies de plantas con flores (Angiospermas y Gimnospermas), de las cuales 5 354 (31,3%) son especies nativas.⁵

Los extractos vegetales tienen mucha importancia para el desarrollo de nuevas drogas a partir de las estructuras químicas que se lleguen a elucidarse a partir de estos.

Por ello, la presente investigación, en aras de buscar alternativas de tratamientos contra las diversas enfermedades, tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto) frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, utilizando la técnica de susceptibilidad microbiana para determinar cuál de las concentraciones del extracto presenta mayor actividad antibacteriana frente a los microorganismos seleccionados.

1.2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas constituyen un importante problema para la salud y son la principal causa de muerte en todo el mundo. La resistencia de los microbios a los antibióticos y los efectos tóxicos derivados del uso continuado de compuestos antimicrobianos ha impulsado la búsqueda de antimicrobianos seguros.⁶

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes. Actualmente se reporta una resistencia a la penicilina del 80% al 93% o más en cepas de *S. aureus* aisladas de hospitales y de la comunidad.^{7,8}

El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS) de Estados Unidos, determinó que en pacientes hospitalizados la prevalencia de cepas *Staphylococcus aureus* meticilínico resistente se incrementó del 4% en 1980 al 31.9% en 1996. En 2001 se tenía un 55% de prevalencia y para el 2004, llegó al 60.7%.⁶ Debido a la resistencia del *S. aureus* a la meticilina, se introdujo la vancomicina; sin embargo en el 2002 se detectaron las primeras cepas resistentes a este antibiótico ("vancomycin resistant *S. aureus*", VRSA).^{9,10}

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gram-negativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocina, rifamicina, actinomicina D y ácido fusídico.¹¹ Tradicionalmente, las estrategias terapéuticas y preventivas dependen del uso de antimicrobianos con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano, pero urgen alternativas a estos compuestos debido al drástico aumento de resistencia múltiple a los antimicrobianos.¹² Además, recientemente se ha demostrado que concentraciones sub-inhedoras de antibióticos aminoglucósidos inducen a la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*.¹³

En el Perú, existen reportes locales sobre el avance de la resistencia a los antibacterianos en varios hospitales y clínicas de Lima^{14, 15} y Arequipa¹⁶; además, nuestro país ha participado en redes de vigilancia de la OPS junto a otros países de Latinoamérica¹⁷, pero no hay una adecuada difusión del problema al personal de los establecimientos de salud y a la comunidad en general.

La utilización irracional de los antimicrobianos es la causa principal de la resistencia. Paradójicamente, esa presión selectiva es resultado de una combinación del uso excesivo que se hace en muchas partes del mundo, en particular para combatir infecciones menores, con un uso inadecuado por falta de acceso a un tratamiento apropiado y de una sub-utilización debida a la falta de recursos financieros para cumplir los tratamientos.¹⁸

Ante esta resistencia se buscan nuevas alternativas como el uso de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente.¹⁹ La Organización Mundial de la Salud estima que en muchos países desarrollados el 70 al 80% de la población ha usado de alguna forma la medicina tradicional; además, en algunos países asiáticos y africanos, el 80% de la población depende de la medicina tradicional para la atención primaria de su salud.²⁰

Un ejemplo de este conocimiento sobre el uso de plantas para la cura de alguna enfermedad, es la variedad de palto (*Persea americana* Mill) que es utilizado para diversas afecciones en la salud del ser humano.²¹ Sus principales usos son para infecciones e inflamaciones de la piel (hojas), contra la diarrea y la disentería (semilla y cáscara), cicatrizante (pulpa de la fruta).²² La acción como antiséptico de extractos de hojas de esta planta, se basa en los compuestos terpénicos como el β -pineno, el cariofileno y el estragol.²³ El cariofileno no solo tiene propiedades antimicrobianas sino también antiinflamatorias; por ello su efectividad para curar heridas en la piel.²⁴

Por ello, la presente investigación busca estudiar las propiedades antimicrobianas de la especie vegetal *Persea americana* Mill., por lo cual se plantea la siguiente interrogante:

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto) sobre microorganismos patógenos, IMET- EsSALUD 2013?

1.3. OBJETIVOS

General:

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto) sobre microorganismos patógenos, IMET- EsSALUD 2013.

Específicos:

- Determinar la sensibilidad de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* frente a los extractos acuosos liofilizados de la especie *Persea americana* (palto)
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso liofilizado de las hojas de la especie *Persea americana* (palto).

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1- *Persea americana* (Palto)

2.1.1.1. Antecedentes.

CHACÓN A. L. (1998),²⁵ en el “Estudio *in vivo* del efecto de la infusión de semillas de aguacate (*Persea americana*) sobre microorganismos cariogénicos en alumnos mayores de 10 años de edad con dentición permanente, que asisten a la escuela nacional urbana mixta Ricardo Castañeda Paganini”, realizaron un estudio clínico por 15 días para determinar la influencia de un enjuague bucal, conteniendo una concentración al 2% de semilla de aguacate, comparado con una solución control (clorhexidina) y una solución placebo, en la disminución de microorganismos cariogénicos. Inicialmente recolectaron muestra de saliva y luego de los 15 días de uso de la solución tomaron nuevamente la muestra realizando un diagnóstico microbiológico, encontrando que la solución de infusión de semillas de aguacate reducía la cantidad de UFC de *Lactobacilos* y *Streptococcus mutans*.

MERCADO S. J. *et al* (2001),²⁶ en el estudio “Determinación de la actividad biológica de los flavonoides de la hoja de *Persea americana* e identificación por electroforesis capilar”, concentraron hojas de *Persea americana* con acetona al 70% y las cepas de trabajo fueron *B. subtilis* y *S. thypi*. Al analizar los resultados obtenidos de la actividad antibiótica del extracto cetónico de la hoja de aguacate encontraron actividad contra *B. subtilis*; en cambio no presentó actividad contra *S. thypi*.

ORTEGA, G.A. *et al* (2005),²⁷ en el estudio sobre “Residuos de Aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) con Actividad Antimicrobiana”, analizaron la actividad de los extractos de acetona y éter etílico de la semilla y cáscaras de *Persea americana* (palto). El mayor efecto antimicrobiano ocurrió con el extracto de acetona de semilla y cáscara frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp*. El extracto de éter etílico presentó efecto inhibitorio sólo cuando se utilizó la semilla de aguacate, mientras que con la cáscara no se observó ningún tipo de inhibición. Las pruebas de CMI se realizaron con los extractos de acetona. Los extractos obtenidos de semilla y cáscara lograron inhibir el crecimiento de *Staphylococcus* y *Streptococcus sp* después de 24 horas de incubación adicionando al medio 25% de extracto.

ENRÍQUEZ A.A. (2010),²⁸ en su “Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso”, evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos etanólicos del laurel mexicano (*Litsea glaucescens*), del aguacatillo (*Persea americana*), la hierba del monte (*Walteria indica*), tronadora (*Tecoma stans*), anís (*Pimpinella anisum*), hierba del borracho (*Clinopodium laevigatum*), enebro (*Janiperus communis*); sobre tres bacterias patógenas indicadoras de calidad en alimentos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Los extractos que presentaron mayor actividad antimicrobiana fueron los aceites esenciales de laurel (*Litsea glaucescens*) y aguacatillo (*Persea americana*), que mostraron inhibición media en concentración de 0.03 g/ml y alta en 0.9 g/ml.

ESCOBAR H.M et al (2010),²⁹ en el estudio “Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvilla (*Bougainvillea glabra*)”, determinaron la actividad de estos extractos. Las cepas utilizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* fueron *Escherichia coli* diarreogénica, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. Se realizó siguiendo la técnica descrita por Kirby Bauer, técnica que permite ensayar diferentes dosis de extractos sobre cepas bacterianas, en la que puede observarse la formación o no de halos de inhibición. Los resultados de la prueba cualitativa antibacteriana del extracto etanólico de buganvilla mostraron actividad frente a *Escherichia coli*, mientras que el extracto de semilla de palto presentó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*.

FULGENCIO N.R. (2011),³⁰ en su estudio sobre “Determinación del contenido de persina en diferentes accesiones de aguacate criollo mexicano y evaluación de la actividad antimicrobiana”, estudió las propiedades antimicrobianas de extractos y partes de la planta *Persea americana*, mediante bioensayos *in vitro* contra bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella typhimurium*) y hongos (*Candida albicans*). Los extractos fueron obtenidos mediante el método de maceración cloroformo-metanol para cada parte de planta (hoja, tallo y fruto). En general, los extractos del tallo fueron efectivos contra *S. aureus*; los de hoja fueron efectivos contra *S. typhimurium*.

2.1.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Persea americana* (palto), es la siguiente:

| | | |
|-------------|---|-------------------------------|
| Reino | : | Vegetal |
| División | : | Spermatophyta |
| Subdivisión | : | Angiosperma |
| Clase | : | Magnoliids [Dicotiledoneae] |
| Orden | : | Laurales [Ranales] |
| Familia | : | Lauraceae |
| Género | : | <i>Persea</i> |
| Especie | : | <i>Persea americana</i> Mill. |

➤ Bergh and Ellstrand, 1987; Ben-Ya'acov, 1995.

2.1.1.3. Sinonimias.

Laurus persea L.; *Persea gratissima* Gaertn.; *P. Persea* Cockerell.³¹

2.1.1.4. Nombre comunes.

Palta, huirapalta, acapa, abogado, abacate (Brasil), avocado (ingles), aguacate (mexico), aguacatillo (Guatemala), pero avvocato (Italia), avocatier (francés), paratais (v.amahuaca, shipibo conibo), palta v.amarakaeri), afkati (Surinam), parite (v.campa), palta y (quechua), parta (v. amuesha).^{32, 33.}

2.1.1.5. Descripción botánica

Es una especie polimorfa de crecimiento determinado, que puede alcanzar de 10 a 20 metros de altura, a veces notoriamente erecta, de tronco muy ramificado de manera monopodial.³⁴

Sistema radicular: Las raíces son generalmente superficiales. La raíz principal es corta y débil como la mayoría de las especies arbóreas originarias de ambientes ricos en agua durante el periodo vegetativo. Alcanza profundidades de 1.0 – 1.5 metros pero en terrenos más sueltos puede superar esta marca. El sistema radicular tiene un patrón de crecimiento horizontal que se concentra en los primeros 50 centímetros de profundidad del suelo. Como las raíces poseen 3 pocos pelos absorbentes, la absorción del agua y los nutrientes la realiza a través de los tejidos primarios de las puntas de las raíces. Esta

característica del aguacate provoca susceptibilidad al encharcamiento porque la planta se asfixia con facilidad y es vulnerable al ataque de hongos en el tejido radicular por ello debe cultivarse en suelos profundos y sin problemas de drenaje interno o texturas muy arcillosas.

Tallo: El aguacate tiene un tronco leñoso y recto que puede alcanzar hasta 12 metros Aunque hay reportes de árboles de 20 metros y troncos con diámetros mayores de 1.5 metros. La corteza es suberosa, de lisa a agrietada con 30 milímetros de espesor. El tejido leñoso es de color crema claro con vasos anchos. Los árboles con alturas menores a 5 metros facilitan las prácticas de control fitosanitario, cosecha, poda y fertilización foliar. Las ramas son abundantes, delgadas, sensibles a las quemaduras de sol y a las heladas, frágiles al viento o exceso de producción. Por esta razón se recomienda cultivar variedades enanas, compactas y establecer el cultivo en lugares protegidos del viento.

Hojas: Las hojas son simples, alternas, enteras, elípticas, alargadas y pedunculadas, con nervaduras pinnadas con inserción peciolada. La epidermis es pubescente y al llegar a la madurez se vuelve lisa coriácea con color verde intenso en el haz. En algunas variedades se da una defoliación de corto tiempo antes de la floración que indica su adaptación a lugares no apropiados para su cultivo.



Flores: La inflorescencia es una panícula axilar o terminal. Las flores son hermafroditas, simétricas y se agrupan en racimos verde amarillento. Las flores presentan dicogamia, es decir los órganos masculino y femenino de una misma flor se abre en dos momentos distintos y separados, es decir, los órganos femeninos y masculinos son



funcionales en diferentes tiempos, lo que evita la autofecundación. Las variedades se clasifican con base en el comportamiento de la inflorescencia en dos tipos. En ambos tipos, las flores abren primero como femeninas, cierran por un periodo fijo y luego abren como masculinas en su segunda apertura

Frutos: El fruto es una drupa carnosa de forma periforme, ovoide, globular o alargada de superficie lisa o rugosa. El color varía de verde claro a verde oscuro y de violeta a negro de acuerdo a la variedad y la maduración del fruto no tiene lugar hasta que éste se separa del árbol. El período entre la floración y la maduración fisiológica es característico de cada cultivar. Estas características y otras como la estructura, consistencia de la cáscara y pulpa, están determinadas por la raza y variedad cultivada. Los frutos con cáscara dura son resistentes al transporte y manipuleo.



Semilla: La semilla es ovalada, como la forma de un durazno. Las semillas del grupo racial Antillano poseen una cubierta de mediana a gruesa y membranosa. En otros grupos raciales es delgada. El endocarpio o semilla es importante en la relación fruto/semilla, siendo ideal una mayor porción de pulpa y una semilla de tamaño mediano a pequeña.³⁵

2.1.1.6. Estudio fitoquímico.

La hoja contiene, entre otros componentes, aceite esencial: estragol (80%), canfeno, eugenol, metiléter, limoneno, β -mirceno, β -cimeno, α y β -pineno, entre otros³⁶; flavonoides: afzelina, guaijaverina, hiperósido, juglanina, quercetina, quercitrina, isoquercitrina³⁷, apigenina, astragalina, derivados de procianidina; cumarinas: escopoletina; alcanos. La pulpa del fruto contiene sesquiterpenos: ácido dihidro-faseico y derivados; carbohidratos: glucosa, fructosa, perseitol y mannoheptulosa. La semilla contiene aceite fijo cuyos principales compuestos son: vitamina A, D-3, α -tocoferol, colesterol.³⁸

2.1.1.7. Hábitat y distribución.

Árbol nativo de América tropical posiblemente del sur de México y Centro América; introducido y cultivado en climas cálidos y templados de varias partes del mundo.³⁹

2.1.1.8. Ubicación en el Perú.

En el Perú, vegeta todo el año en zonas húmedas en los departamentos de Loreto, Junín, Ica, Moquegua, Piura, San Martín, Ucayali, Amazonas, Cajamarca, Lima, especialmente en los valles de la costa norte.⁴⁰

2.1.1.9. Usos tradicionales

Propiedades medicinales:

- Amenorrea (y/o como abortivo): hoja o fruto, decocción, vía oral.⁴¹
- Bronquitis: hoja, decocción, vía oral.⁴¹
- Flatulencias: hoja, decocción, vía oral.⁴²
- Infección urinaria: hoja, decocción, vía oral.⁴³

Forma de uso:

Para asma, bronquitis, flatulencias, infección urinaria y tos: Preparar una decocción.

Para amenorrea, 20 gramos (3 cucharadas) de hoja picada en 1 litro (4 tazas) de agua, hervir por un mínimo de 10 minutos en recipiente tapado. Filtrar, enfriar y beber ½ a 1 taza 3 a 4 veces al día.⁴³

2.1.1.10. Estudios farmacológicos

Algunos extractos de semillas del palto poseen actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *Mycrococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte los compuestos alifáticos de cadena larga, aislados de la cáscara del fruto, como el 1, 2,4 trihidroxi-n-hepadeca-16-eno, han demostrado actividad bactericida sobre microorganismos Gram-positivos, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.⁴⁴

Trabajos realizados *in vitro* con el cocimiento de semillas de *Persea americana* diluido al 10% en agua corriente, determinaron la acción bactericida sobre *Shigella flexneri*, *Aeromonas sp.*, *Vibrium cholerae*.⁴⁵ El aceite de *P. americana* ha demostrado efectividad contra *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.⁴⁶

2.1.2. Bacterias

2.1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Taxonomía y características.

- Dominio : Bacteria
- Filo : Firmicutes
- Clase : Cocci
- Orden : Bacillales
- Familia : Staphylococcaceae
- Género : *Staphylococcus* Rosenbach 1884
- Especie : *Staphylococcus aureus*.

Los estafilococos son cocos Gram-positivos que miden cerca de 1 μm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa.⁴⁷

Es un coco que crece agrupado en racimos, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10% de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo; es la única especie estafilocócica humana que produce coagulasa, enzima también producida por *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius*, cepas de animales que no están asociadas a infecciones humanas.

Más del 95% de los *Staphylococcus aureus* producen proteína A que puede estar asociada a la célula o al medio extracelular, con una importante afinidad a la fracción Fc de la Ig G. La presencia de la proteína A o coagulasa es de gran utilidad clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de estafilococos.

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede causar infecciones en todas las edades en forma tanto esporádica como epidémica y se ha identificado como una de las principales causas de infecciones de heridas quirúrgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto directo.⁴⁸

El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprofito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel decaen, pueden causar enfermedad.

Estas bacterias también viven sin causar daños en los pasajes nasales. Pueden causar desde infecciones leves y graves e incluyen abscesos, impétigo, forúnculos e infecciones sistémicas graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis. Este tipo de infección se ha denominado “síndrome de la piel escaldada” estafilocócica. Puede producir enfermedades que pueden poner en peligro la vida, como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico (SST) y sepsis ⁴⁹

2.1.2.2. *Enterococcus faecalis*

Taxonomía y características.

- Dominio : Bacteria
- Filo : Firmicutes
- Clase : Bacilli
- Orden : Lactobacillales
- Familia : Enterococcaceae
- Género : Enterococcus
(Ex Thiercelin & Jouhaud 1903)
Schleifer & Kilpper-Bälz 1984
- Especie : *Enterococcus faecalis*
(Orla-Jensen 1919)
Schleifer & Kilpper-Bälz 1984

E. faecalis es un coco Gram-positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano.⁵⁰

La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidroliza en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas. *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la bacteria y que contiene residuos de glicerol.⁵¹

Enterococcus faecalis es una bacteria comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. del género *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital, actúa como patógeno

oportunista en pacientes añosos con enfermedades subyacentes graves y en aquellos inmunocomprometidos que han estado hospitalizados por periodos prolongados, en los que se usaron dispositivos invasivos o que recibieron terapia antimicrobiana de amplio espectro. A pesar de su baja virulencia pueden ser causantes de infecciones del tracto urinario, sangre, abdomen y heridas. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a virtualmente todos los antibióticos de uso. Estos microorganismos se han convertido actualmente en notorios patógenos nosocomiales.⁴⁹

El Género *Enterococcus* engloba un conjunto de especies morfológicamente semejantes a los estreptococos. Las más frecuentemente aisladas en clínica son *Enterococcus faecalis* (80 a 90%) y *Enterococcus faecium* (5 a 10%).⁵²

Los enterococos presentan resistencia intrínseca a las cefalosporinas, la clindamicina y el cotrimoxazol.⁵⁰ La resistencia adquirida a los betalactámicos está causada por la modificación de las proteínas fijadoras de penicilina (especialmente la PBP-5) y por la producción de betalactamasas, siendo el primer mecanismo excepcional en *E. faecalis*. La resistencia intrínseca a los aminoglucósidos es de bajo grado, mientras que la adquirida se debe a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.⁵³

Actualmente, en EE.UU. el género *Enterococcus* constituye la cuarta causa más frecuente de infección nosocomiales y la tercera causa de bacteriemia, y suponen un 10,2% del total de las bacteriemias.⁵⁰ Estas cifras son algo menores en Europa, donde las bacteriemias por enterococos suponen un 7,2% del total, y en España, donde representan aproximadamente del 6% al 15%.⁵⁴

2.1.2.3 *Escherichia coli*

Taxonomía y características.

- Dominio : Bacteria
- Filo : Proteobacterias
- Clase : Gammaproteobacteria
- Orden : Enterobacteriales
- Familia : Enterobacteriaceae
- Género : *Escherichia*
- Especie : *Escherichia coli* (*E. freundii*)
Migula, 1895

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo de la familia enterobacteriaceae, tribu escherichia.⁵⁵

Mide de 1 a 3 μm , presentándose individualmente o en pares, en cadenas cortas o formando grupos. En general se moviliza por flagelos peritricos aunque existen variantes inmóviles no flagelados. No forma esporas y por lo general es no capsulado. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente; en los viejos, se presentan en formas de dimensión mayor.⁵⁶

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre a las pocas horas de su nacimiento y se la considera un microorganismo de la flora normal; sin embargo, hay cepas que pueden ser patógenas y pueden causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.⁵⁷

En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, se clasifican en seis grupos:

- *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ⁵⁸

La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos.⁵⁹

No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). En los seres humanos, *E. coli* provoca cerca de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos.⁵⁹

2.1.2.4. Problemática de la resistencia a los antimicrobianos.

Un antimicrobiano es una droga que actúa principalmente contra organismos infecciosos. Originalmente, la definición de antibiótico se refería a una sustancia química producida por diversas especies de microorganismos que, en pequeñas concentraciones, era capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. No obstante, el advenimiento de los métodos sintéticos ha introducido una modificación en esta definición. Hoy, el antibiótico se define como una sustancia de origen natural o sintética que es capaz de inhibir o matar a microorganismos.⁶⁰

Al momento de su introducción en el mercado, los primeros antibióticos fueron realmente “drogas maravillosas”. El optimismo inicial de que podían poner fin a las infecciones bacterianas, llevaron a la aceptación general de que estos recursos podían aplicarse ampliamente para el control de la enfermedad. Sin embargo, no pasó mucho tiempo para que comenzaran a emerger cepas resistentes y muy pocas bacterias, tales como *Streptococcus pyogenes*, han mantenido en el tiempo una predecible susceptibilidad a la penicilina.⁶⁰

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural que puede ser acelerado por una variedad de factores, incluyendo las prácticas humanas. El uso de un antimicrobiano para cualquier infección, real o temida, en cualquier dosis y durante cualquier período de tiempo, fuerza a los microbios a adaptarse o morir en un fenómeno conocido como "presión selectiva". Los microbios que se adaptan y sobreviven son portadores de genes para la resistencia, que pueden ser transmitidos.⁶¹

Existe evidencia que apoya la opinión de que el alto consumo de antibióticos es el factor crítico en la selección de resistencia. Paradójicamente, la falta de uso por problemas de acceso, la dosificación inadecuada, la falta de adherencia a los antimicrobianos puede desempeñar un papel tan importante como el uso excesivo. Por estas razones, la mejora en el uso de antimicrobianos es una prioridad y la aparición y propagación de la resistencia deben controlarse de manera eficiente.

En septiembre de 2001, la OMS lanzó la primera estrategia mundial para la lucha contra los graves problemas causados por la emergencia y propagación de la resistencia a los antimicrobianos conocida como la Estrategia Mundial OMS de contención de la

resistencia a los antimicrobianos. Las malas prácticas de prescripción en cualquier país ahora amenazan con minar la potencia de los antimicrobianos en todas partes.⁶¹

Los mecanismos de la resistencia bacteriana son complejos, variados y no están completamente estudiados, incluyen inactivación enzimática, alteración de receptores o sitios diana, “by pass” de las vías metabólicas, alteración de la permeabilidad y alteración del transporte de los antibióticos al interior de la bacteria.⁶²

Inmediatamente después de disponerse comercialmente de estos compuestos resultó evidente, la necesidad de estudiar la susceptibilidad antimicrobiana. Es así que se evalúan, mediante pruebas de susceptibilidad, las interacciones *in vitro* entre un germen aislado y los agentes antimicrobianos que podrían ser apropiados para el tratamiento de una infección.⁶⁰

Las pruebas de susceptibilidad contribuyen, así, a orientar el tratamiento quimioterápico de los procesos infecciosos, si la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano, no puede ser predicha a partir del conocimiento de su identidad. También se utilizan cuando, aún conociéndose la sensibilidad del germen a drogas altamente efectivas, el paciente por otros problemas (por ejemplo, alergias) no puede recibir dicha medicación. Además, pueden ser aplicadas con fines epidemiológicos y en el estudio de nuevos antibióticos.⁶²

Las dos pruebas de susceptibilidad de referencia son: la prueba por dilución, y la prueba por difusión. La más frecuentemente utilizada para guiar la terapéutica es la prueba por difusión con discos (Kirby-Bauer).⁶⁰ Las técnicas actualmente utilizadas son el producto de importantes esfuerzos internacionales enfocados, desde hace más de dos décadas, a normatizar el método.

El comité de expertos de la OMS y grupos colaborativos internacionales dirigidos por Ericsson y Sherris sugirieron recomendaciones que fueron adoptadas por la mayor parte de los países europeos.⁶² Sin embargo, la falta de acuerdo general sobre algunos aspectos técnicos (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 para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos: Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos, el Sistema DIN, el de los países bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de

Microbiología. También existe el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS). En mayoría de los países latinoamericanos se siguen las pautas del NCCLS, con algunas modificaciones.⁶²

El principio del método referido habitualmente como “Método de la OMS”, que no difiere sustancialmente del conocido “Kirby-Bauer”, involucra el uso de una cantidad constante de antibióticos en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se forma así por difusión, un gradiente de concentración de antibiótico y la sensibilidad de la bacteria estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio.

Para que los resultados sean confiables, los procedimientos deben ser controlados y estandarizados cuidadosamente.

Categoría de interpretación de los resultados del método de difusión con discos:

Sensible: Esta categoría clínica implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

Intermedio: Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas (por ejemplo, beta lactámicos) o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado (por ejemplo, beta lactámicos y quinolonas para infecciones del tracto urinario)

Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica no ha sido comprobada.⁶⁰

2.1.3.- Métodos para determinación de la Actividad Antimicrobiana *in vitro*.

➤ Método de difusión en agar

El método de difusión en agar está apoyado por datos clínicos y de laboratorio; presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles.⁶³ La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión, en disco o en pozo, fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos.

Esta determinación se fundamenta en establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos.⁶⁴ El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.⁶⁵

La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; entre ellas está la composición del papel filtro Whatman, compuesto de celulosa (uniones β -(1,4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica,⁶⁶ interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de éstos en el agar; los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar.⁶⁷

En el caso de evaluar varias sustancias, los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas⁶⁸, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo en estudio, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación.⁶⁹

➤ **Método de dilución**

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) ⁷⁰ y la concentración mínima inhibitoria (CMI) ⁷¹ la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas; la CMB, como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado. Estas variables constituyen una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos. ⁷²

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. ⁷³ En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas; luego se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas. La principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar.

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales; además permite diferenciar entre un efecto bactericida y un bacteriostático. ⁷⁴

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES.

2.2.1. Variables.

2.2.1.1. Variable Independiente:

- Extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* (palto).

2.2.1.2. Variable Dependiente:

- Actividad antibacteriana de hojas de *Persea americana* (palto).

2.2.2. Indicadores.

2.2.2.1. Indicadores de la variable independiente:

- Concentración del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* (palto).

2.2.2.2. Indicadores de la variable dependiente:

- Sensibilidad del *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

| Variable Independiente | Definición Conceptual | Definición operacional | Indicadores | Índice | Escala |
|---|--|---|---|--|--|
| Extracto acuoso liofilizado de hojas de <i>Persea americana</i> (palto). | Extracto acuoso liofilizado: Producto de la extracción de las hojas, obtenidos por cocción con agua y conservado en congelación para luego liofilizarlo. | Extracción por cocción de las hojas entre 70 a 80°C durante 1 hora. Posterior al filtrado, concentrado y medido el pH, congelar a -22°C para luego liofilizarlo (-40°C con una presión de 1.33×10^{-3} MBARR/72 horas) | Concentración del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie <i>Persea americana</i> (palto). | <u>Sensibilidad bacteriana:</u> 200, 300 y 400 mg/ml del extracto acuoso liofilizado <u>Concentración Mínima Inhibitoria:</u> 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 y 1 mg/ml del extracto acuoso liofilizado. | Intervalar -Tipo: Cuantitativo -Tipo: Cuantitativo |

| Variable dependiente | Definición conceptual | Definición operacional | Indicadores | Índices | Escala y tipo de variable |
|---------------------------------|--|--|---|---|--|
| Actividad Antibacteriana | <p><u>Por Método de difusión en disco:</u> Diámetro del medio de cultivo alrededor del disco con antimicrobianos, que presentan inhibición completa, inhibición parcial o sobrecrecimiento del microorganismo.</p> <p><u>Por Concentración Mínima Inhibitoria:</u> Concentración más baja del extracto de <i>Persea americana</i> (palto) capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos</p> | <p>Determinación del tipo de halo de inhibición, mediante la observación de ausencia de crecimiento, crecimiento parcial o sobrecrecimiento del microorganismo</p> <p>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante observación visual de no formación de turbidez</p> | <p>Tamaño del diámetro del halo de inhibición en los discos, expresado en porcentaje de inhibición</p> <p>Presencia y/o ausencia de turbidez en los tubos con diferentes concentraciones de extractos de <i>P. americana</i>.</p> | <p>1. Grado de sensibilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inactivo <40% • Poco activo 40 a 50% • Moderado activo 51 a 75% • Buena actividad >76% <p>2. Mínima concentración del extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias.</p> | <p>Tipo de variable : cuantitativa</p> |

2.3. HIPÓTESIS.

Existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto) sobre microorganismos patógenos, IMET- EsSALUD 2013.

CAPÍTULO III

3.1.- METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1.1.- Método de Investigación:

Tipo de estudio:

- **Cuantitativo:** Porque se realizó la recolección de los datos para probar la hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, mediante el cual se establecieron patrones de comportamiento y se probaron teorías

3.1.2.- Diseño del Estudio:

- **Experimental-Analítico:** porque se realizaron comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.
- **Prospectivo:** porque en el registro de información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.
- **Longitudinal:** porque se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación

3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA:

Población vegetal:

- Constituido por el conjunto de hojas de la especie *Persea americana* (palto) que se encuentran en el Jardín Botánico perteneciente al Instituto de Medicina Tradicional IMET-EsSALUD de la ciudad de Iquitos, Región Loreto, Perú.

Muestra vegetal:

- Las hojas de *Persea americana* (palto) recolectadas del Jardín Botánico perteneciente al Instituto de Medicina Tradicional IMET-ESSALUD de forma aleatoria y que cumplan con los criterios de inclusión y de exclusión.

Criterios de inclusión:

- Hojas sanas, sin muestra de contaminación con microorganismos.
- Hojas jóvenes

Criterios de exclusión:

- Hojas secas o en mal estado de conservación.
- Hojas con restos de excrementos de animales.
- Hojas infectadas por microorganismos.

Población bacteriana:

Las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923., *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

Muestra bacteriana:

El número de colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923., *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, que se emplearon para la preparación del inóculo bacteriano de tamaño similar.

Criterios de inclusión:

- Cepas que reunieron las características microscópicas y bioquímicas de los microorganismos en estudio.

Criterios de exclusión:

- Cepas que presentaron contaminantes.
- Cepas que no coincidieron con el fenotipo de los microorganismos en estudio.

3.3.- MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.3.1.- Equipos:

- Autoclave (Intermedical trade S.A./Model Mod. Vetical-V)
- Balanza analítica (Mettler Toledo AG 204)
- Cámara de reflujo laminar Magmehelic “forma científico/Model: 13089-79)
- Campana de Seguridad (Terra Universal)
- Calentador eléctrico (PRACTICA/Modelo: cocineta eléctrica HP1)
- Estufa de cultivo a 35°C (Merck/Model 1235-2)
- Horno para esterilización (MEMMERT/Typ: UM 500)
- Mechero de vidrio.
- Refrigerador de 2 a 8°C (MABE Colombia/Modelo: RML10WHPN50)

3.3.2.- Materiales:

3.3.2.1- Medios de cultivo y reactivos:

❖ Agar Tripticasa de Soya:

| | |
|--------------------|--------|
| Peptona de caseína | 15.0 g |
| Peptona de carne | 4.4 g |
| Peptona de soya | 4.0 g |
| Cloruro de sodio | 5.0g |
| Glucosa | 2.0 g |
| Agar | 14.3 g |

Pesar 44.3 g de este medio deshidratado en 1 litro de agua destilada, agitando frecuentemente hasta completa disolución y calentar unos minutos. Esterilizar por 15 minutos a 121°C, dejar enfriar entre 45° a 50° y distribuir en placas Petri.

❖ **Agar Mueller-Hinton:**

Infusión de carne 300.0 g

Hidrolizado de carne 17.5 g

Almidón 1.5 g

Agar 17.0 g

Suspender 38 g en 1 litro de agua destilada y llevar a calentar por unos minutos hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

❖ **Caldo Trypticasa de Soya:**

Peptona de caseína 17.0 g

Peptona de harina de soya 3.0 g

D(+) -Glucosa 2.5 g

Cloruro de Sodio 5.0 g

Hidrógenofosfato di-potásico 2.5 g

Disolver 30 g en 1 litro de agua destilada llevar a calentar por unos minutos hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

❖ **Caldo Mueller-Hinton.**

Infusión de carne 2.0 g

Hidrolizado de caseína 17.5 g

Almidón 1.5 g

Disolver 30 g en 1 litro de agua destilada llevar a calentar por unos minutos hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

❖ **Tubo de 0.5 de la Escala de McFarland**

Cloruro de Bario 0.048M 0.5 ml

Ácido Sulfúrico 1% 99.5 ml

Agregar 0.5 ml de una solución de BaCl₂ 0.048M (BaCl₂ 2H₂O al 1.157% P/V) a 99.5 ml de una solución de H₂SO₄ 0,18M (1%V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.

3.3.2.2- Materiales de vidrio:

- Asa de inoculación
- Disco de sensibilidad de Gentamicina
- Discos estériles de 6 mm de diámetro.
- Embudos de vidrio
- Espátula mediana.
- Guantes quirúrgicos N° 7.½
- Gradillas metálicas para tubos de ensayo.
- Hisopos estériles.
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc
- Marcador de vidrio
- Mascarillas descartables.
- Micropipetas automáticas de 250, 500 y 1000 uL.
- Papel toalla
- Papel filtro Whatman N° 3
- Papel kraft.
- Pipetas de 1 y 10 cc
- Placas Petri de 10 cm.
- Placas Petri de 4 cm.
- Tips descartables.
- Tijeras
- Tubos de ensayo estériles con tapa-rosca.
- Vernier o regla graduada en mm.

3.3.3- Muestra biológica:

- *Cepas de Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Cepas de Escherichia coli* ATCC 25922
- *Cepas de Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.4- PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

3.4.1- Procedimiento para preparación de los extractos vegetales.

2.1.4.1.Recolección de las muestras vegetales

Las hojas de la especie *Persea americana* (palto) fueron recolectadas en el Jardín Botánico del Instituto de Medicina Tradicional IMET - EsSALUD, ubicado en el pasaje San Lorenzo N° 205, con coordenadas (18 M 0691547 – 9583722) con una altura de 116 msnm, en la ciudad de Iquitos, capital de la Región Loreto; a orillas del Río Amazonas en la Selva Baja, en el mes de enero 2013. Es una zona considerada como bosque húmedo tropical, que presenta una temperatura media anual de 26°C.

La identificación de las muestras vegetales se realizó en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Además, en la recolección de las muestras vegetales se tuvo en consideración los siguientes factores:

- Edad de la planta (hojas).
- Estado vegetativo.
- Estación de recolección.

2.1.4.2. Preparación del pulverizado vegetal

- Se usaron las hojas jóvenes
- Se cortaron en pequeños fragmentos.
- Luego se secaron al medio ambiente x 5 días.
- Se volvió a pesar y luego se procedió a pulverizar, haciendo uso de una licuadora de cuchillas de acero inoxidable.
- El pulverizado se guardó en frascos oscuros para su utilización posterior.

2.1.4.3.Preparación de extractos acuoso según IMET (2007):

Para la preparación de los extractos acuosos se procedió de acuerdo al siguiente protocolo:

Se llevó a cabo mediante la cocción de las hojas frescas secas a una temperatura entre 65 a 70°C, durante dos horas, empleando el agua como líquido extractivo; luego se filtró con algodón y se dejó en refrigeración por tres días para que sedimente; luego se eliminó el sedimento, se filtró y se concentró a una temperatura determinada.

2.1.4.4.Protocolo para la liofilización:

- Se colocó la muestra en un frasco especial que soportó grandes presiones.
- Se congeló la muestra a una temperatura de -42°C.
- Luego se colocó en el equipo de liofilización por un tiempo de 72 horas.
- Se retiró para su conservación a temperatura ambiental.

2.1.4.5.Preparación de las concentraciones:

- Se procedió a hacer el cálculo de las concentraciones para cada extracto a utilizar.
- Se pesó 2.5 g de extracto liofilizado en 2.5 ml. de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/ml.
- A partir de esta solución stock se procedió a preparar las siguientes concentraciones: 200 mg/ml, 300 mg/ml y 400 mg/ml.

2.1.4.6.Preparación de los discos de sensibilidad:

- Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman N° 3 y se usó un perforador convencional. Estos discos se esterilizaron en autoclave a 121C° en 15 libras de presión por 15 minutos.
- Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 25 µl de las concentraciones de los extractos vegetales de 200mg, 300mg y 400mg, las que se dejaron secar por espacio de 24 horas.

3.4.2- Prueba de Sensibilidad según protocolo del Instituto de Medicina Tradicional (IMET):

- Se procedió a preparar el medio agar tripticasa de soya (TSA) en placas Petri para los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*, cepas puras obtenidas de Instituto Nacional de Salud (INS).
- En una estufa se incubaron los microorganismos a 37°C por 18 a 24 horas para obtener cultivos jóvenes.
- Obtenido las bacterias se cogieron de tres a cinco colonias aisladas y se suspendieron en 5 ml de suero fisiológico.
- Después de 15 minutos de haber preparado el inoculado bacteriano, y ajustada la turbidez del mismo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inoculó.
- Se inoculó la superficie seca de la placa Mueller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones. Antes de colocar los discos se deja secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se absorba el exceso de humedad.
- Se colocaron los discos de sensibilidad estándar con gentamicina 10µg como control positivo y la sustancia a diferentes concentraciones, sobre la superficie del agar en forma manual con la ayuda de una pinza estéril. Se presiono ligeramente para asegurar el contacto uniforme, sin introducir el disco en el agar.
- Los discos fueron colocados a una distancia de 2.5cm uno del otro y a 1.5cm del borde de la placa. Si las placas a utilizar son de 150 mm, no deben ir más de 11 discos; si es una de 10 mm, colocar 5 discos.
- Invertir las placas e incubar a 37°C durante 16 a 18 horas.
- La prueba se realizó por triplicado.
- Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro completo), usando una regla o calibrador.

CUADRO 1: Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición:

$$\%INHIBICIÓN: \frac{\text{Diámetro de la muestra X } 100}{\text{Diámetro del control Positivo}}$$

Los ensayos fueron realizados por triplicado y se realizaron cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad. El criterio que se utilizó para la clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados se detalla en el **cuadro 2**.

CUADRO 2: Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición:

| PORCENTAJE DE INHIBICIÓN | ACTIVIDAD ACTIBACTERIANA |
|--------------------------|--------------------------|
| <40% | Inactivo |
| 40 a 50% | Poco activo |
| 51 a 75% | Moderadamente activo |
| >76% | Buena actividad |

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – EsSALUD 2007.

3.4.3- **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria:**

- Se prepararon cultivos de 18 horas de las bacterias a estudiar, en agar tripticasa de soya.
- Se incubaron en una porción de una colonia aislada en 5 ml de Caldo de Tripticasa de soya y se incubó a 37°C hasta que la turbidez sea visible (entre 2 a 5 h.). Se Ajustó la turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril hasta una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland aproximadamente 10^6 UFC/ml.
- Se realizó el ensayo en tubos y se llevó a cabo una dilución al 1/100 de este inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.
- Se preparó 15 tubos con 1 ml de Caldo Mueller-Hinton y uno con 1.8 ml., luego se preparó una solución madre del extracto vegetal liofilizado a una concentración de 5120 mg/ml.
- Se añadió 0.2 ml de la solución madre del extracto vegetal al tubo que contenía 1.8 ml de caldo. A partir de este tubo se prepararon diluciones dobles seriadas tomando 1 ml del 1er. tubo (512 mg/ml) transfiriéndolo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfirió 1 ml al tercer tubo (128 mg/ml.), y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se tomará 1 ml. y se descartará.
- Se añadió a cada tubo con el extracto vegetal 1 ml del inóculo que contenía aproximadamente 10^6 UFC/ml.
- Se Incubó los tubos a 37°C durante 18 horas y luego se procedió a calcular la C.M.I. agitando los tubos donde no hubo desarrollo bacteriano.

3.5- ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en el ensayo, se expresaron en términos de valores resultantes y se expresaron de la siguiente manera.

- Se calculó la media y la desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, obtenido de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *Persea americana* (palto), que se presentarán mediante tablas y gráficos. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$; aplicando el programa SPSS versión 18.0 y las diferencias entre medidas de grupos que fueron analizadas mediante el test de comparación múltiples. El valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.
- Se calculó el porcentaje de inhibición del extracto, obtenido del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Persea americana* (palta), en la prueba de actividad antimicrobiana por el método de disco difusión. Estos valores son presentados en tablas, gráficos y clasificados de acuerdo a las especificaciones del **cuadro 2**.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias, obtenidas de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *Persea americana* (palto), son presentadas en tablas y gráficos para facilitar la visualización. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS v. 18.0 y las diferencias entre las medidas de grupos fueron analizadas mediante el test de comparaciones múltiples. El valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

CAPÍTULO IV

4.1- RESULTADOS

4.1.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE HOJAS DE LA ESPECIE *Persea americana* (PALTO) SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS A CONCENTRACIONES DE 200, 300 Y 400mg/ml POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN:

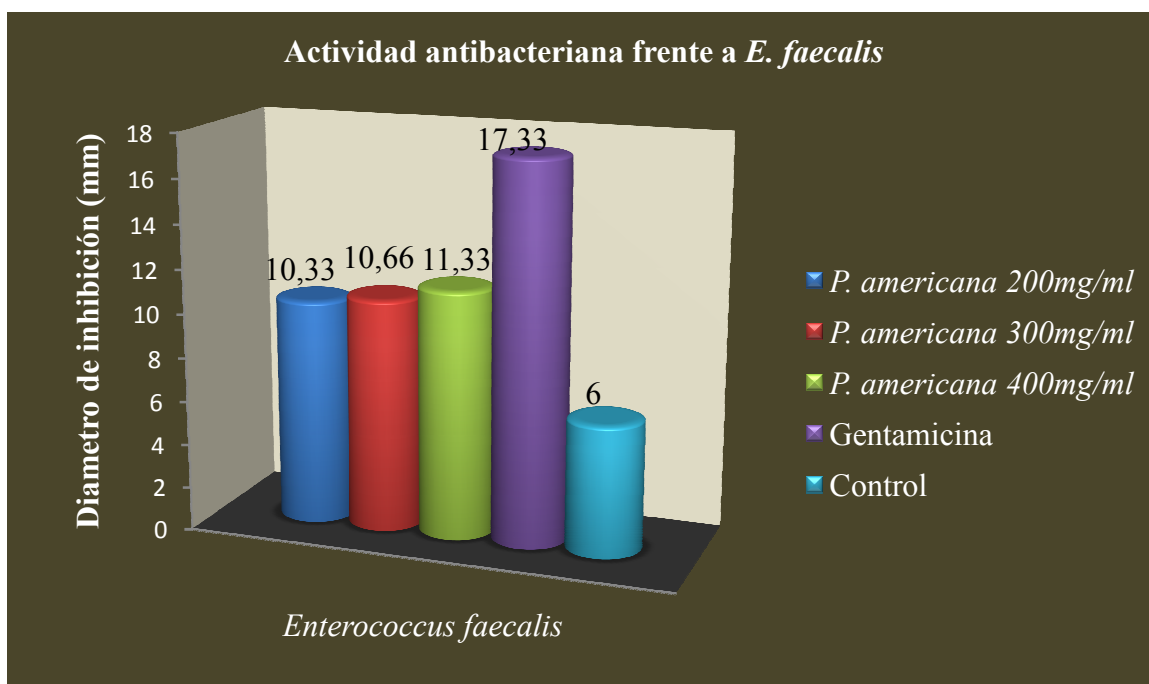
- a. Los diámetros promedios de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* por el método de disco difusión se detallan en la Tabla 1 y en el Gráfico 1 (A,B, C, D,E y F), en los que se aprecia lo siguiente:
- Los diámetros promedios de los halos de inhibición sobre *Enterococcus faecalis* del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* fue de 10.33 ± 0.57 mm a 200 mg/ml, de 10.66 ± 0.57 mm a 300 mg/ml y de 11.33 ± 0.57 mm a 400mg/ml. El agua destilada como control negativo fue constante (6.00 ± 0.0), mientras que el antibiótico Gentamicina como control positivo tuvo 17.33 ± 0.57 mm.
 - Los diámetros de los halos de inhibición promedio sobre *Escherichia coli* del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200 y 300 mg/ml fueron constantes (10.33 ± 0.57 mm) y a 400mg/ml fue 11.66 ± 0.57 mm; con el agua destilada el promedio fue 6.00 ± 0.0 mm. Por su parte el control positivo Gentamicina el diámetro fue 18.33 ± 0.57 mm
 - Los promedios de los diámetros de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200 y 300 mg/ml también fue constante (10.00 ± 0.0 mm) y a 400 mg/ml fue 10.66 ± 0.57 mm. Con agua destilada como control el promedio fue 6.00 ± 0.0 mm; mientras que la Gentamicina tuvo un diámetro promedio 20.33 ± 0.57 mm.

TABLA 01.- Promedios de los halos de inhibición (expresado en mm) de los diversos extractos acuosos liofilizados de *Persea americana* frente a los microorganismos en ensayo.

| EXTRACTOS | <i>Enterococcus faecalis</i> X ± SD | <i>Escherichia coli</i> X ± SD | <i>Staphylococcus aureus</i> X ± SD |
|------------------------------------|--|---|--|
| <i>P. americana</i> 200 mg/ml | 10.33 ± 0.57 | 10.33± 0.57 | 10.00 ± 0.0 |
| <i>P. americana</i> 300 mg/ml | 10.66 ± 0.57 | 10.33 ±0.57 | 10.00 ± 0.0 |
| <i>P. americana</i> 400 mg/ml | 11.33 ± 0.57 | 11.66±0.57 | 10.66± 0.57 |
| Control positivo: Gentamicina 10ug | 17.33 ± 0.57 | 18.33±0.57 | 20.33± 0.57 |
| Control negativo | 6.00± 0.0 | 6.00± 0.0 | 6.00± 0.0 |

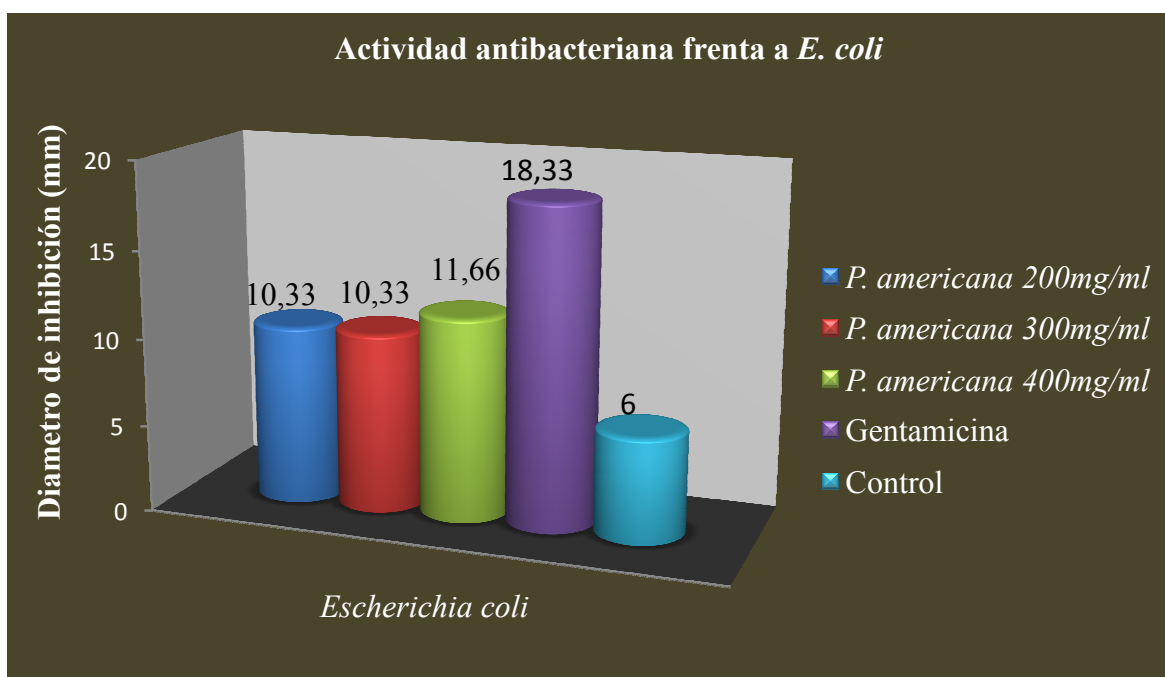
FUENTE: Elaborado por el autor.

GRÁFICO 01 A.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de *Persea americana* a 200, 300 y 400 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*.



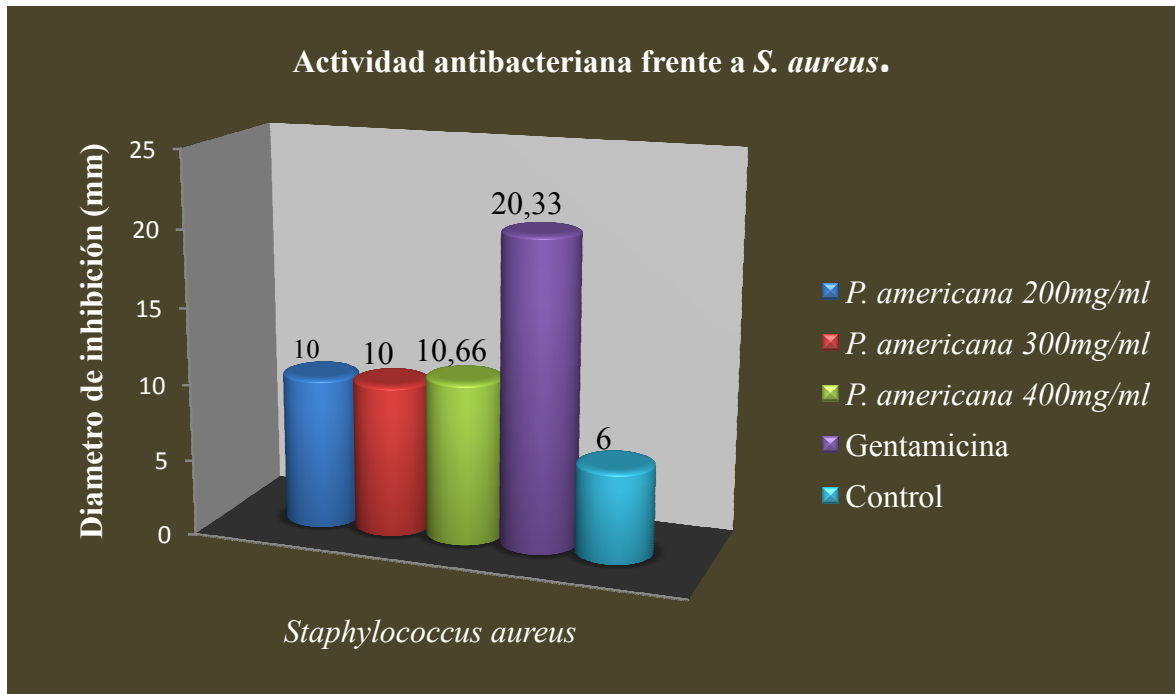
Fuente: Elaborado por el autor

GRÁFICO 01B.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de *Persea americana* a 200, 300 y 400mg/ml frente a *Escherichia coli*.



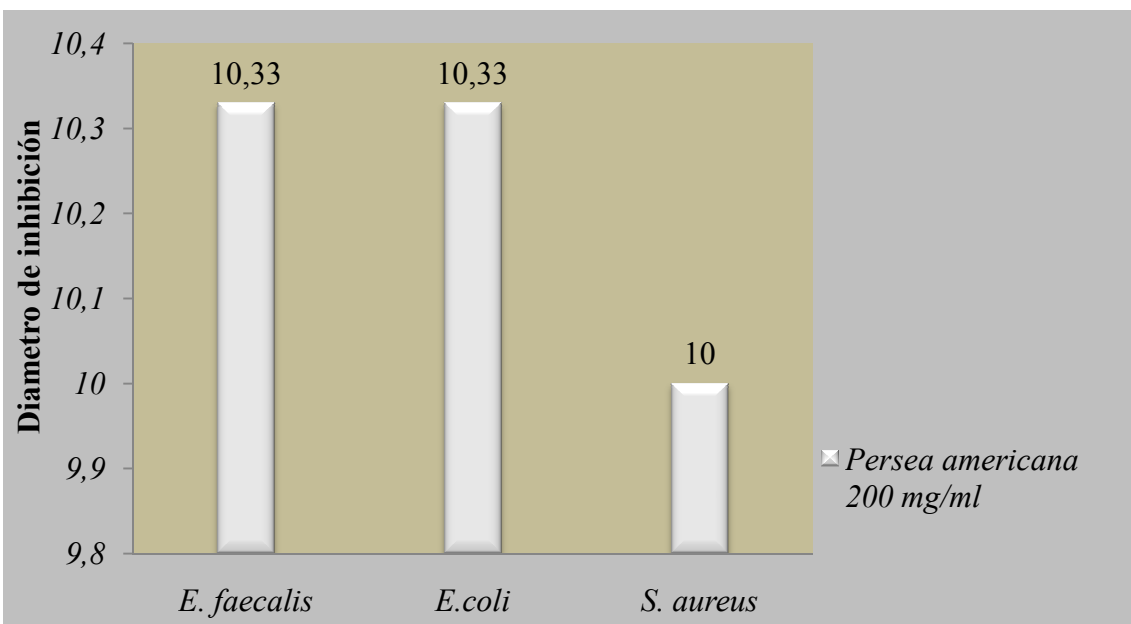
Fuente: Elaborado por el autor

GRÁFICO 01 C.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) de los extractos acuosos liofilizados de *Persea americana* a 200, 300 y 400 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*.



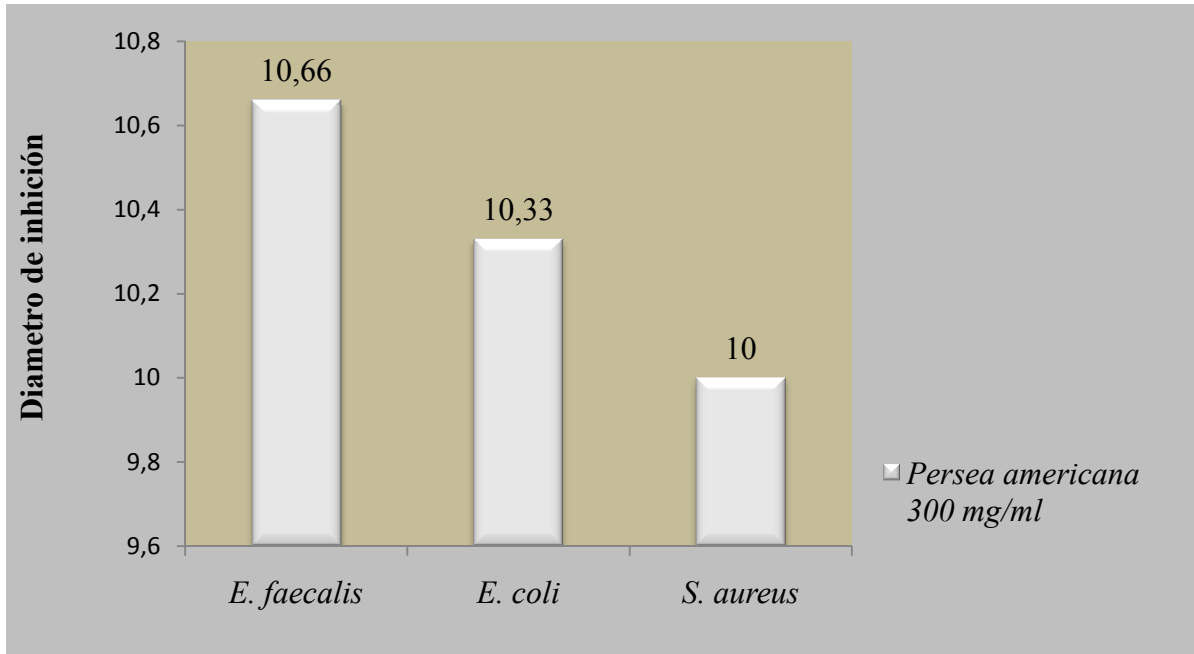
Fuente: Elaborado por el autor

GRAFICO 01 D.- Promedios de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



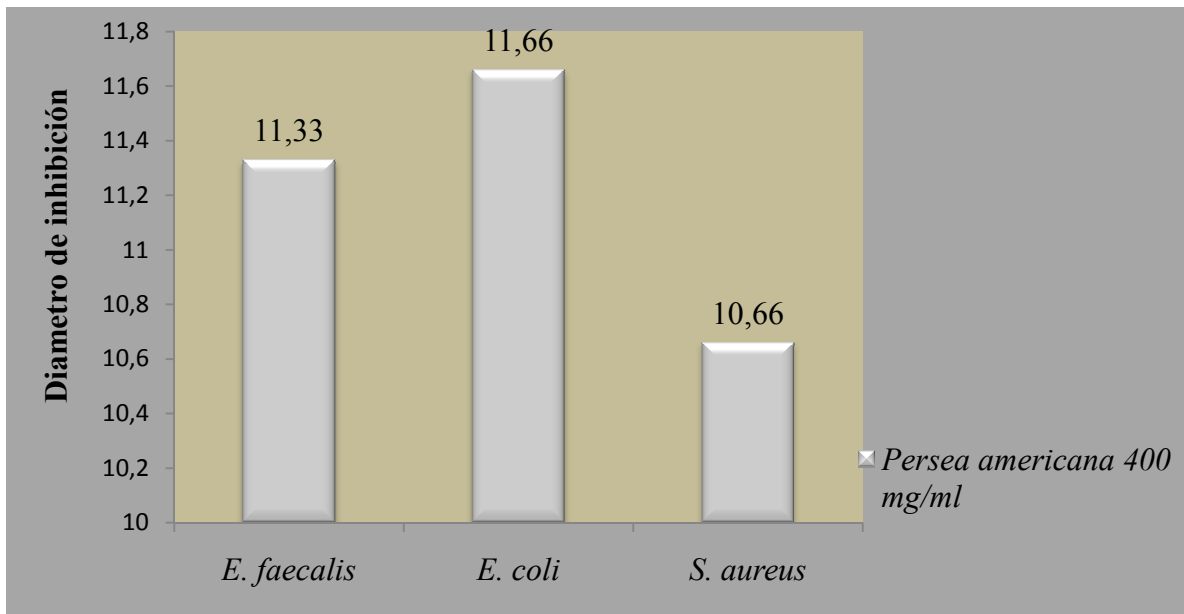
Fuente: Elaborado por el autor

GRAFICO 01 E.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 300 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaborado por el autor

GRÁFICO 01 F.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 400 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaborado por el autor

- a. Los porcentajes de inhibición de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de la especie *Persea americana* son detallados en Tabla 02 y Gráfico 02, en los que se aprecia lo siguiente:
- El mayor porcentaje de inhibición frente a *Enterococcus faecalis* fue 65.37% a una concentración de 400 mg/ml; en cambio a 200 y 300 mg/ml fue de 59.61 y 61.51% respectivamente.

 - El mayor porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli* fue 63.61% a una concentración de 400 mg/ml; en cambio, a 200 y 300 mg/ml fueron constantes (56.35%).

 - El mayor porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* fue 52.43% a una concentración de 400 mg/ml; en cambio, a 200 y 300 mg/ml se obtuvo un 49.18%.

TABLA 02.- Porcentajes de inhibición (%) de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Persea americana* frente a los microorganismos en ensayo.

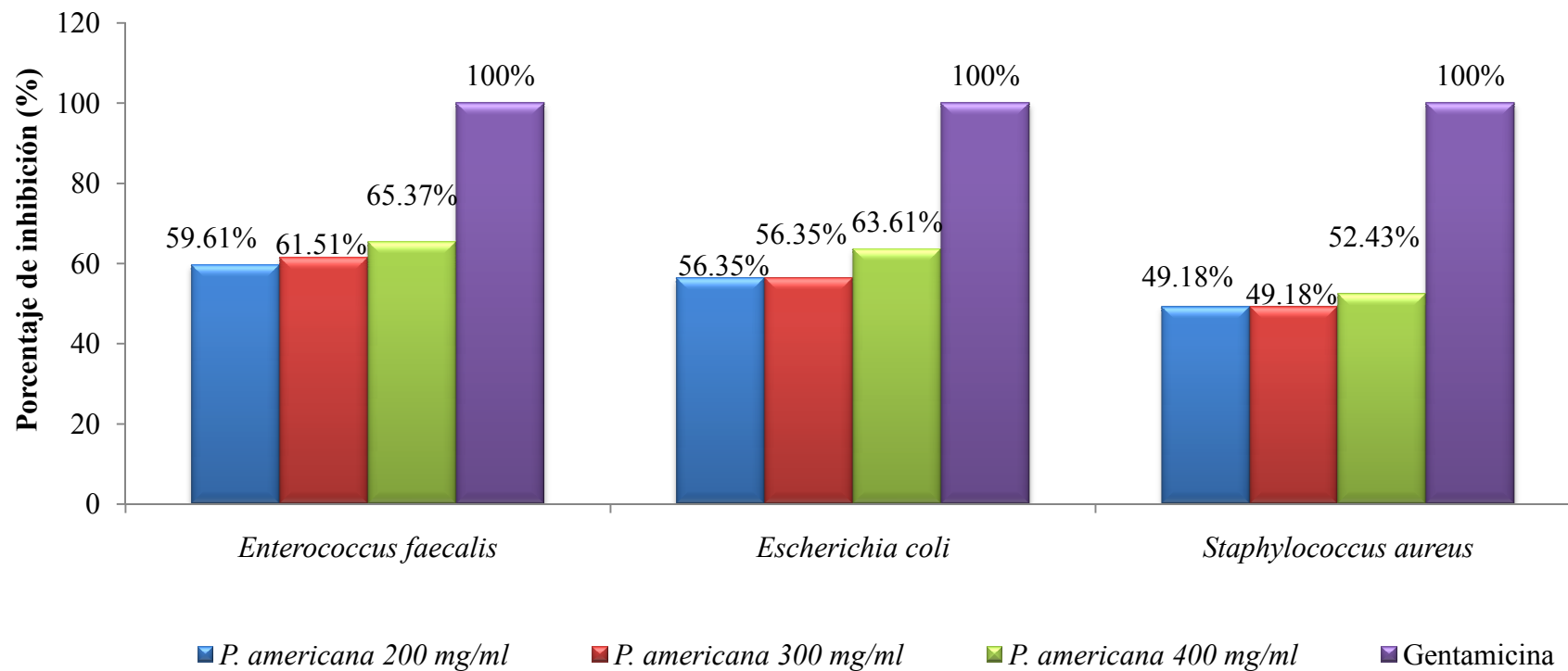
| Bacterias <i>Extractos</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| <i>P. americana</i> 200mg | 59.61 | 56.35 | 49.18 |
| <i>P. americana</i> 300mg | 61.51 | 56.35 | 49.18 |
| <i>P. americana</i> 400mg | 65.33 | 63.61 | 52.43 |
| Gentamicina 10µg | 100 | 100 | 100 |

FUENTE: Elaborado por el autor

CUADRO 03. Actividad Antibacteriana de extractos acuosos liofilizados de hojas de *Persea americana* a partir del porcentaje de inhibición frente a los microorganismos en estudio.

| Bacteria Extracto | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| <i>P. americana</i> 200 mg/ml | Moderadamente activo | Moderadamente activo | Poca actividad |
| <i>P. americana</i> 300 mg/ml | Moderadamente activo | Moderadamente activo | Poca actividad |
| <i>P. americana</i> 400 mg/ml | Moderadamente activo | Moderadamente activo | Moderadamente activo |

GRÁFICO 02. Porcentajes de inhibición (%) de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Persea americana* a 200, 300 y 400 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaborado por el autor

4.1.2 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE HOJAS DE LA ESPECIE *Persea americana* (palto) SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE 1 A 512 mg/ml POR MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana*, se especifican en la Tabla 03 y Gráfico 03 donde se aprecia lo siguiente:

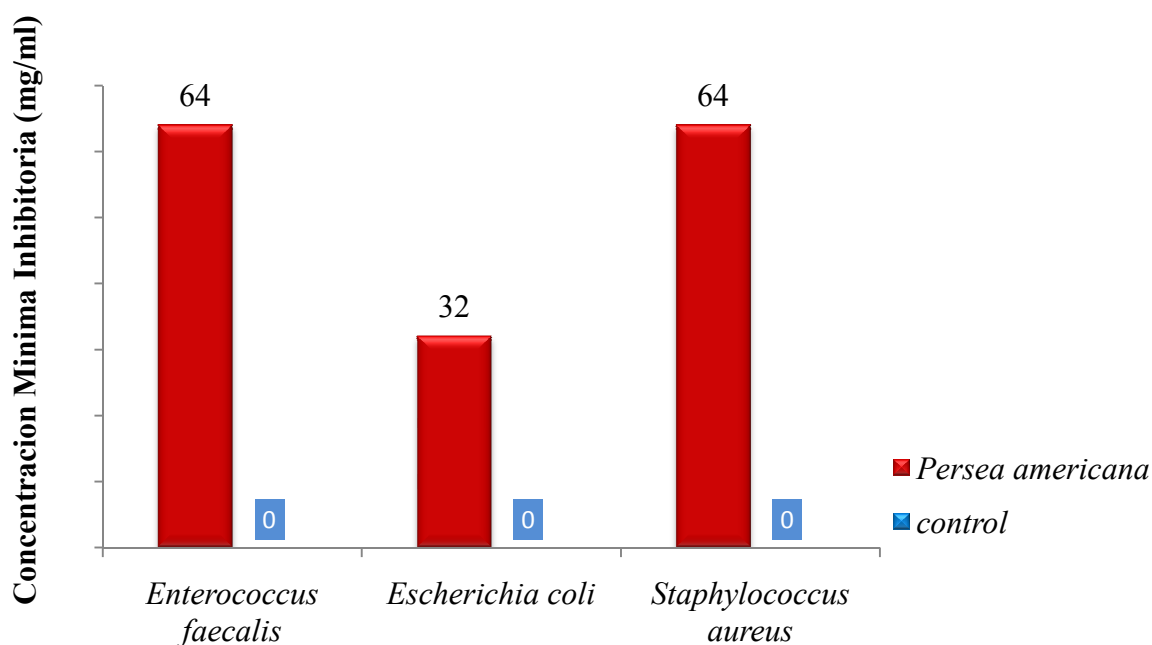
- La Concentración Mínima Inhibitoria frente a *Enterococcus faecalis* fue de 64 mg/ml.
- La Concentración Mínima Inhibitoria frente a *Escherichia coli* fue de 32 mg/ml.
- La Concentración Mínima Inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* fue de 64 mg/ml.

TABLA 03.- Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* frente a los microorganismos en estudio.

| Extracto | Bacterias | | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Persea americana</i> | 64 mg/ml | 32 mg/ml | 64 mg/ml |
| Control | 0 | 0 | 0 |

FUENTE: Elaborado por el autor

GRÁFICO 03.- Concentración Mínima Inhibitoria (expresados en mg/ml) del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* frente a los microorganismos en estudio.



Fuente: Elaborado por el autor

4.2 DISCUSIÓN

La resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos continúa siendo de particular interés en todo el mundo, por lo que es indispensable contar con nuevas alternativas terapéuticas. Si bien las plantas superiores no han aportado antibióticos que tengan amplia comercialización, la industria farmacéutica y la comunidad científica basados en gran parte en los exitosos resultados de su uso tradicional en la atención primaria en salud, están estimulando esta búsqueda desde dichas fuentes dado que la obtención de antibióticos a partir de hongos ha disminuido sustancialmente, o desde las síntesis química que poco han aportado en los últimos 20 años. Incluso en países muy desarrollados en la síntesis química, diversos autores llaman la atención sobre la importancia de recurrir a fuentes naturales, entre ellas las plantas, para explorar nuevas moléculas con actividad antiinfecciosa.⁷⁵

Es común el empleo popular de partes vegetales con la finalidad de obtener diversos efectos terapéuticos. Varios estudios han validado científicamente la eficacia de numerosos usos de la medicina tradicional utilizada por la gente. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales, incluyen aquellas con finalidad antimicrobiana.⁷⁶ Varias de las especies de las familias Lauraceae a la cual pertenece *Persea americana* se utilizaron a nivel tradicional para el tratamiento de diversas infecciones,⁷⁷ lo cual ha generado un aumento en el interés por determinar los metabolitos responsables de la actividad.

Con respecto a los resultados obtenidos del extracto acuoso liofilizado de hojas de la especie *Persea americana* (palto), la actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis* a una concentración de 200, 300 y 400mg/ml presentaron 59.61%, 61,51% y 65,37% de actividad, respectivamente; significando que tienen una moderada actividad de acuerdo al cuadro N° 02 (Ver pág. 48). En relación con la Concentración Mínima Inhibitoria, el extracto presentó 64 mg/ml.

Para *Escherichia coli*, la actividad del extracto de *Persea americana* fue de 56.35%, 56.35% y 63.61% a concentraciones de 200, 300 y 400 mg/ml, respectivamente. También se encontraron rangos de una actividad moderada (cuadro N° 02). El extracto de *Persea americana* presentó una CMI de 32 mg/ml.

Para *Staphylococcus aureus* a una concentración de 400 mg/ml tuvo 52.43% de actividad y de 200 y 300 mg/ml tuvo 49.18% en ambas concentraciones. En relación con la Concentración Mínima Inhibitoria el extracto presento 64 mg/ml.

Los resultados mostraron actividad inhibitoria muy dependiente de su concentración: a mayor concentración mayor su actividad sobre las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Pero ninguna concentración del extracto pudo acercarse a la Gentamicina 10µg que fue el control positivo; el control negativo (agua estéril) no presento ningún efecto.

Se ha reportado el efecto antibacteriano por GOMEZ-FLORES *et al* (2008)⁷⁸, donde obtuvieron resultados similares por los extractos etanólicos de hojas de *Persea americana* Mill. La cual inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*. FULGENCIO N.R. (2011) demostró que el extracto de hojas maceradas de *Persea americana* en cloroformo/metanol tuvieron actividad frente a *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus epidermidis*; por su parte el tallo tuvo actividad contra *Staphylococcus aureus*.

Otros estudios realizados por ORTEGA G.A. *et al* (2005) en *Persea americana* utilizando otros órganos de la planta, demostraron que el extracto de semilla tuvo actividad frente a *Escherichia coli*; en un ensayo similar, NEEMAN *et al* (1970)⁷⁹ demostró su efecto de los extractos metanólicos derivados de frutos y semillas teniendo efecto sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Klebsiella pneumoniae*. ENRÍQUEZ A.A. (2010),²⁸ en su estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso de *Persea americana*, sobre tres bacterias patógenas indicadoras de calidad en alimentos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. *Persea americana* tuvo efecto antimicrobiano a concentraciones de 0.03 g/ml y 0.9 g/ml.

El palto contiene entre muchos otros compuestos químicos, alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides, carbohidratos, ácidos grasos, aceites esenciales y flavonas. Dentro de estos compuestos, el estigmasterol se reporta como uno de los compuestos más abundantes e importantes en actividades relacionados con lesiones dermatológicas⁸⁰. La acción como antiséptico de extractos de hojas de aguacate, se basa en los compuestos terpenicos como cariofileno y el estragol.⁸¹

Sin embargo otros estudios realizados por MORAIS et al (2007),⁸² señalan varias clases de compuestos tales como los fitoesteroles, triterpenos, ácidos grasos, ácidos furanoicos, flavonoides y proantocianidinas, como los responsables de su efecto antimicrobiano. Según COWAN (2002),⁸³ los componentes reportados de *Persea americana* como flavonoides, esteroides y terpenoides actúan como reactivos en la pared celular de las bacterias (proteínas solubles), llevándoles a la muerte.

Como se mencionó anteriormente, muchas especies de la familia Lauraceae son utilizadas tradicionalmente para diferentes infecciones, encontrándose en muchos estudios resultados con actividad antibacteriana, como COY-CUCA (2007)⁸⁴ quienes aislaron metabolitos de algunas especies de esta Familia, obteniendo resultados positivos frente a *Staphylococcus aureus*. Esto concuerda con nuestros resultados aunque con una mínima diferencia de inhibición, lo que conllevaría a considerar que en el extracto de *Persea americana* existen metabolitos útiles para optimizaciones estructurales de moléculas antibióticas con mayor actividad.

4.3. CONCLUSIONES.

1. El extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* tuvo una actividad de 59.61%, 61,51% y 65,37%, en las concentraciones de 200 mg/ml, 300 mg/ml y 400 mg/ml, respectivamente frente a *Enterococcus faecalis*; y una Concentración Mínima Inhibitoria de 64 mg/ml frente a este microorganismo.
2. El extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* frente a *Escherichia coli* tuvo una actividad de 56.35% a concentraciones de 200 mg/ml, 300 mg/ml y a 400 mg/ml tuvo una actividad de 63.61%; y una Concentración Mínima Inhibitoria de 32 mg/ml.
2. Frente a *Staphylococcus aureus*, el extracto acuoso liofilizado de hojas de *Persea americana* en las concentraciones de 200 mg/ml, 300 mg/ml, tuvieron la misma actividad de 49.18%, y 52.43% a 400 mg/ml; y una Concentración Mínima Inhibitoria de 64 mg/ml.

5.4. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios fitoquímicos de *Persea americana* para obtener los metabolitos con actividad antimicrobiana.
- Continuar con los estudios de muestras de *Persea americana* utilizando otros métodos de extracción.
- Elaborar preparados galénicas de uso tópico con bajo costo para pacientes que presenten infecciones dérmicas, considerando el uso tradicional que tienen la especie estudiada en el presente trabajo.
- Determinar la actividad Tóxica del extracto de *Persea americana* In Vivo
- Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánico con otras plantas de nuestra región, en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en general.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Directrices interorganismos. Directrices sobre donativos de medicamentos, Revisión 1999. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1999.
2. Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC. Pharmaceutically Active Natural Product Synthesis and Supply via Plant Cell Culture Technology. *Mol Pharmaceutics*. 2008; 5(2):243-56
3. Brown Center. Missouri Botanical Garden . Medicinal plants.2010. Disponible en: <http://www.wlbcenter.org>. (26/07/10).
4. Duke, J.A. Análisis Farmacológico; Fitomedicinas Prometedoras; Revista de Medicina Complementaria; Medicina Holística 45. 1992. Pp116.
5. Brack A. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del 1. Perú. Centro Bartolomé de las Casas. Cuzco 1999
6. Premkumar VG, Shyamsundar D. Evaluation of antimicrobial activity of *Cynodon dactylon*. *Ind drugs* 2004; 41: 748-752.
7. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx* 2005; 47:381-7
8. Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:182-93.
9. National Nosocomial Infectious Surveillance System (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85.
10. Lee SY, Kuti JL, Nicolau DP. Antimicrobial management of complicated skin and skin structure infections in the era of emerging resistance. *Surgical Infect* 2005; 6:283-95.

11. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol* 2002; 15:430-8.
12. Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941TAL In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA 2005,607-624
13. Dobrindt U, Hacker J. Targeting virulence traits: potencial strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr Opin Microbiol* 2008, 11: 409-413.
14. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HLT Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007, 189: 3532-3546
15. Obregon A, G; Ruiz Diaz, E. Resistencia y Sensibilidad Antimicrobiana en el Servicio de Cuidados Intermedios (SCI) del Departamento de Cuidados Criticos del Hospital Almenara – Essalud. Federación Panamericana e Ibérica de Sociedades de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. 2000. Disponible en: www.infomedonline.com.ve/fpimcti/cri23art.pdf
16. Hinojosa Linares, W.; Salazar R., S; Gamero F., L. Sensibilidad de *Escherichia coli* a los antibióticos. *Rev Farmacol Terap* Vol4N°1-2.Lima, Perú. 1994
17. Cornejo M; Iglesia D; Zea E; Muños E; Mejia A. Urocultivo y Susceptibilidad Bacteriana en el Hospital Nacional de Sur de Arequipa (HNSA)-(IPSS). 1995 Disponible en: www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/home.htm.
18. Grupo Colaborativo Resis Net.La Resistencia a los Antibioticos en América Latina: Importancia de los Programas Artemis Net. 2000

19. Enciclopedia, "Agricultura y Jardinería" 3ra ed., Buenos Aires: Ed, ACNE. Argentina. P. 1,1973
20. Organización Mundial de la Salud. BOVISSOU.R. "Plantas Medicinales"; 2008, p. 3-9,2008
21. Bello, Gonzáles, M.A. Catalogo de plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico N°. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 2006. 138 p.
22. Gupta, M. Plantas medicinales iberoamericanas. Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED. 1995. P. 201.
23. Dorman, H. J. y Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of volatile oils. J. Appl. Microbiol. 2000. 88(2): 308-16
24. Knobloch, K., Weis N. y Weigaud H. 1986. Mechanism of antimicrobial activity of essential oils. University Erlangen Numberg. Rev. Plantas Médica. Journal of Medical plant Research. Germany Thiemepe. 1986, p.76.
25. Chacón A. A., Estudio in vivo del efecto de la infusión de semilla de aguacate (*Persea americana*) sobre microorganismos cariogénicos en alumnos mayores de 10 años de edad con dentición permanente, que asisten a la escuela Nacional Castañeda Paganini. Tesis para obtener el Título de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 1998
26. Mercado S. J. Determinación de la actividad biológica de los flavonoides de la hoja de *Persea americana* e identificación por electroforesis capilar. Unidad Profesional Interdisciplinaria de biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. Barrio La Laguna Ticoman, Colombia. 2001

27. Ortega Gómez Ana Carolina, Yonatan E. Cruz Toledo, Alejandro I. A. Alonso Calderón y Claudia Montalvo Paquini. Residuos de Aguacate (*Persea americana* var. *Hass*) con Actividad Antimicrobiana. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Politécnica de Puebla, Ingeniería en Biotecnología. Estado de Puebla-México. 2005

28. Enríquez A.A. Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en quesoilloˆ Tesis Para Obtener el Grado Académico de Maestro en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.Oaxaca-México. 2010

29. Escobar H.M; Pinto D.J, Zabalaga V.S, Escalante L.A;, Bustamante G.Z . 2010. Evaluación de la actividad antidiarreica y antibacteriana de los extractos de la semilla de palto (*Persea americana*) y buganvilla (*Bougainvillea glabra*). Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. BIOFARBO, 18(2), Diciembre 2010 .53 – 60.

30. Fulgencio N.R. Determinación del contenido de persina en diferentes accesiones de aguacate Mexicano y evaluación de la actividad antimicrobiana. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología. Universidad de Michoacana de San José de Hidalgo, Morelia.Michoacan.Mexico.2011.53p

31. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Ed Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala; 1995.p: 59-60.

32. Risco GG. *Persea americana* var. Fuente: actividad espasmolítica del decocto de semillas en ileon de Cavia parcelas en espasmo experimental .Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú. 1995

33. Mestanza GI .Contribucion al desarrollo de la fototerapia en Centro de Medicina Complementaria Essalud La Libertad-Trujillo. Bach. Fac. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú; 2000 p:44

34. Avilan L., Leal F., Bautista D. El Aguacate. Principios y técnicas para su producción. Venezuela. Espasante Editores. 1985, 380 p
35. Calabrese F, 1992. El Aguacate. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 249 p
36. King JR, Knight RJ, Volatile components of the leaves of various avocado cultivars. J Agr Food Chem. 1992. 40(7):1182-1185
37. De Almeida AP, Miranda MMFS, Simon I IC, Wigg MD, Lagrota MHC, Costa SS, Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. Phytother Res 1998. 12(8):562-567.
38. Merici F, Merici AH, YILMAZ F, YUNCULER G, YUNCULER O, Flavonoids of avocado (*Persea americana*) leaves. Acta Pharm Turc 1992, 34(2):61-63.
39. Cáceres A. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Ed Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala;1995 p: 59-60.
40. Risco GG. *Persea americana* var. fuente: actividad espasmolítica del decocto de semillas en íleon de *Cavia porcellus* en espasmo experimental. Tesis Bach. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.1995
41. Giron L, Encuesta TRAMIL (Costa atlántica). Centro Mesoamericano de Tecnología CEMAT, Guatemala, Guatemala1998.
42. Méndez M, Medina ML, Duran R, 1996 Encuesta TRAMIL. Unidad de recursos naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán CICY, Mérida, México.
43. Alonso J, Tratado de fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires, Argentina: ISIS ediciones SRL. 1998, p185

44. Gupta M. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED. Editorial
45. Huamán, RC: Los secretos de la amazonia “supervivencia en la selva” Ed. Grafital Editores, Lima, Perú. p: 313
46. Alonso, JR. (1998). Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas. Ed. ISIS ediciones SRL. Buenos Aires- Argentina; pp: 183-6.
47. Uribe C.F. Seguimiento epidemiológico de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus meticolino resistente* mediante electroforesis de campo pulsado. Carrera Microbiología. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado .Bogota D.C. 2003. Pág. 21,22.
48. Zaragoza T. Y Malagon O. Descripción etnobotánica y estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotóxica de los extractos totales de cinco especies vegetales nativas de la provincia de Loja. Planta de productos Naturales .Universidad Tecnica Particular de Loja. Ecuador. vol. 11.2005
49. Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod 2000; 26: 593-5.
50. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owat ZC. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32: 93-8.
51. Ureña I J. Microbiología Oral. 2 ed. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.; 2002
52. Oliver, A. *Control Calidad SEIMC: Resistencia a los glucopéptidos en Enterococcus*. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Vre.htm

53. Sánchez-Molina, M.I., Martín, D., Valladares, C. y cols. *Sensibilidad del género Enterococcus a nuevos antimicrobianos*. Rev Esp Quimioterap 2004; 17: 184-188.
54. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparison among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2002. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50:59–69.
55. Martínez-Odriozola P, Muñoz-Sánchez P, Gutiérrez-Macias A, Arriola-Martínez P, Montero-Aparicio E, Ezpeleta-Baquedano, C Análisis de 182 episodios de bacteriemia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.2007; 25:503–7.
56. Farmer JJ III. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification: En: *Manual of clinical microbiology*. 6° ed. Washington, D.C. ASM Press 1995. 440
57. Peñaranda LM, Sierra ME. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera simanba* y *Bursera Graveolens* contra sobre algunos microorganismos patógenos. Carrera Microbiología. Facultad Ciencias. Básicas. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá 2003 pág. 50, 51, 52, 53, 61 y 68.
58. Boop CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine N. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. En: *Manual of clinical microbiology*. Murray PR. Jo Baron, MA Ptaller, FC Yolken. thed Washington, D.C.E. d. ASM. Press. 1999: 459- 474.
59. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol Rev* 1998, 11:142-201
60. Rossi MA, Galas M, Corso A. XIII Curso intensivo de actualización en antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán. Servicio Antimicrobianos, 1999.

61. World Health Organization-Antimicrobial resistance. Fact sheet N°194. Revised January 2002.[Consultado 19agosto2006].Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html
62. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington CW. Diagnostic Microbiology. 5° ed. Lippincott. New York, 1997
63. A. L. Barry, D. Amsterdam, M. B. Coyle, E. H. Gerlach, C. Thornsberry, H. R. W, "SimpleInoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." *J. Clin.Microbiology.*, Vol. 10, pp. 910, 1979
64. S. National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", *National Committee forClinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*,Vol. 17(1), 1997.
65. C. National, for, Clinical, Laboratory, Standards., *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico.* (1998), pp. 7.18-7.21.
66. D. M. Hacek, D. C. Dressel, L. R. Peterson, "Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37(6), pp. 1881, 1999.
67. C. Valgas;, S. M. d. Souza;, E. F. A. Smânia;, A. S. Jr., "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 38, pp. 369, 2007.
68. Mbata TI, Debiao L, Saikia A, , "Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7(19), pp. 1571, 2006.

69. Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, S. A., "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis." *Agric Food Chem.*, Vol. 52(5), pp. 1132, 2004.
70. S. National Committee for Clinical Laboratory, "Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, in press." *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*
71. Isada C. M, L. K. Bernard, M. P. Goldman, L. D. Gray, J. A. Aberg, "Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures.", pp. 163, 2001.
72. McDermott P. F, S. M. Bodeis-Jones, T. R. Fritsche, R. N. Jones, R. D. Walker, "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 43, pp. 6136, 2005.
73. Andrews JM., "Determination of Minimum Inhibitory Concentration ", *J Antimicrob Chemother*, Vol. 48(31), pp. 5, 2001.
74. Wilkinson J. M., "Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts", *Modern Phytomedicine*, pp. 157-171, 2007.
75. Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC, "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*", *J. Ethnopharmacol*, Vol. 94(2-3), pp. 279, 2004}
76. Garzon C. Analisis Bromatológicos y fitoquímicos básicos de la especie priorizadas dentro del marco del proyecto Uso sostenible de los recursos vegetales del D.C y la región. Informe técnico inédito. Jardín Botánico José Celestino Mutis-Subdirección Científica . Bogotá. 2006.133 p.

77. Evans WC, Trease WC. Pharmacognosy. 14. ed. London: W. B. Sanders Company LTD; 1996. p. 37, 253, 340, 341, 496.
78. Gomez-Flores, R. et al. In Vitro rat lymphocyte proliferation induced by Ocimum basilicum, Persea americana, Plantago virginica, and Rosa spp. Extracts, J. Med. Plan Res., 2008. 2(1):5-10.
79. Neeman, I., A. Lifshitz y Kashman Y. New antibacterial agent isolated from the avocado pear. Appl. Microbiol. 1970. 19:470-473.
80. Napralert (Natural Product Alert). 1990. Program for collaborative research in the Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Illinois, Chicago. Nelson SD. Molecular mechanism of hepatotoxicity caused by acetaminophen. Semin Liv Dis., 10:267-268.
81. Delaporte, R.h., Sarragiotto M.H., Akemura O.S. Sanchez G.M, Filho B.P. y Nakamura C.V. 2004. Evaluation of the anti-inflammatory, free radical scavenging and antimicrobial activities of parts of Tillandsia streptocarpa Baker-Bromeliaceae. Journal of Ethnopharmacology 95: 229-233.
82. Morais, S.M., Facundo V.A., Bertini L.M., Cavalcanti E.S.B., Anjos-Junior J.F., Ferreira S.A., Brito E.S., y Souza-Neto M.A. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. Biochemical Systematics and ecology 35:670-675.
83. Cowan, M. M.. 2002. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12: 564-386
84. Coy B., Cuca S., Metabolitos con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia Lauraceae. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Colombia. 2007., pp.363-364

4.6. ANEXO

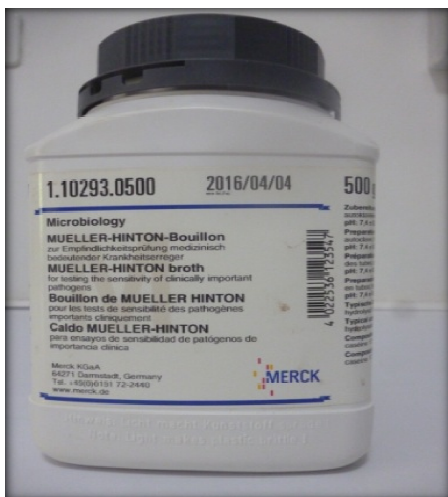
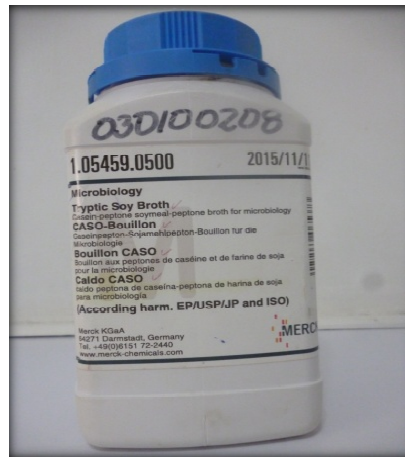
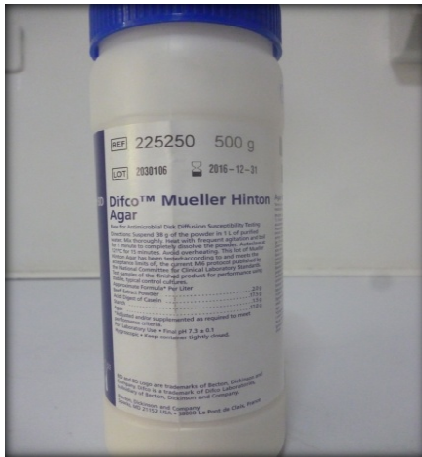
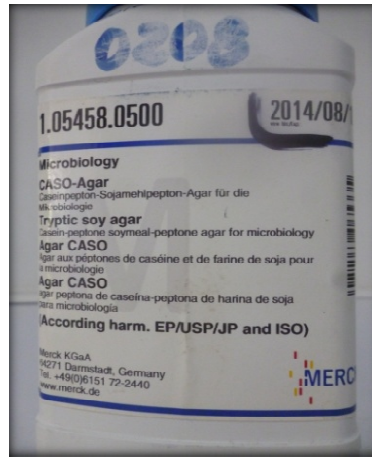
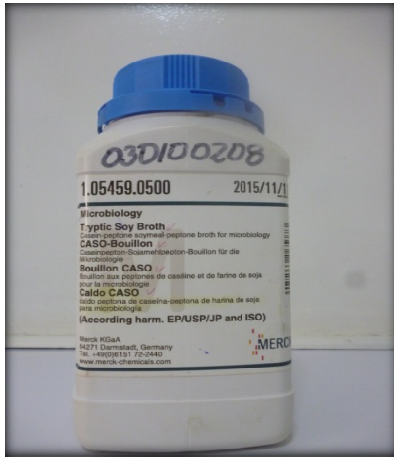
ANEXO 01.-Cepas del Instituto Nacional de Salud



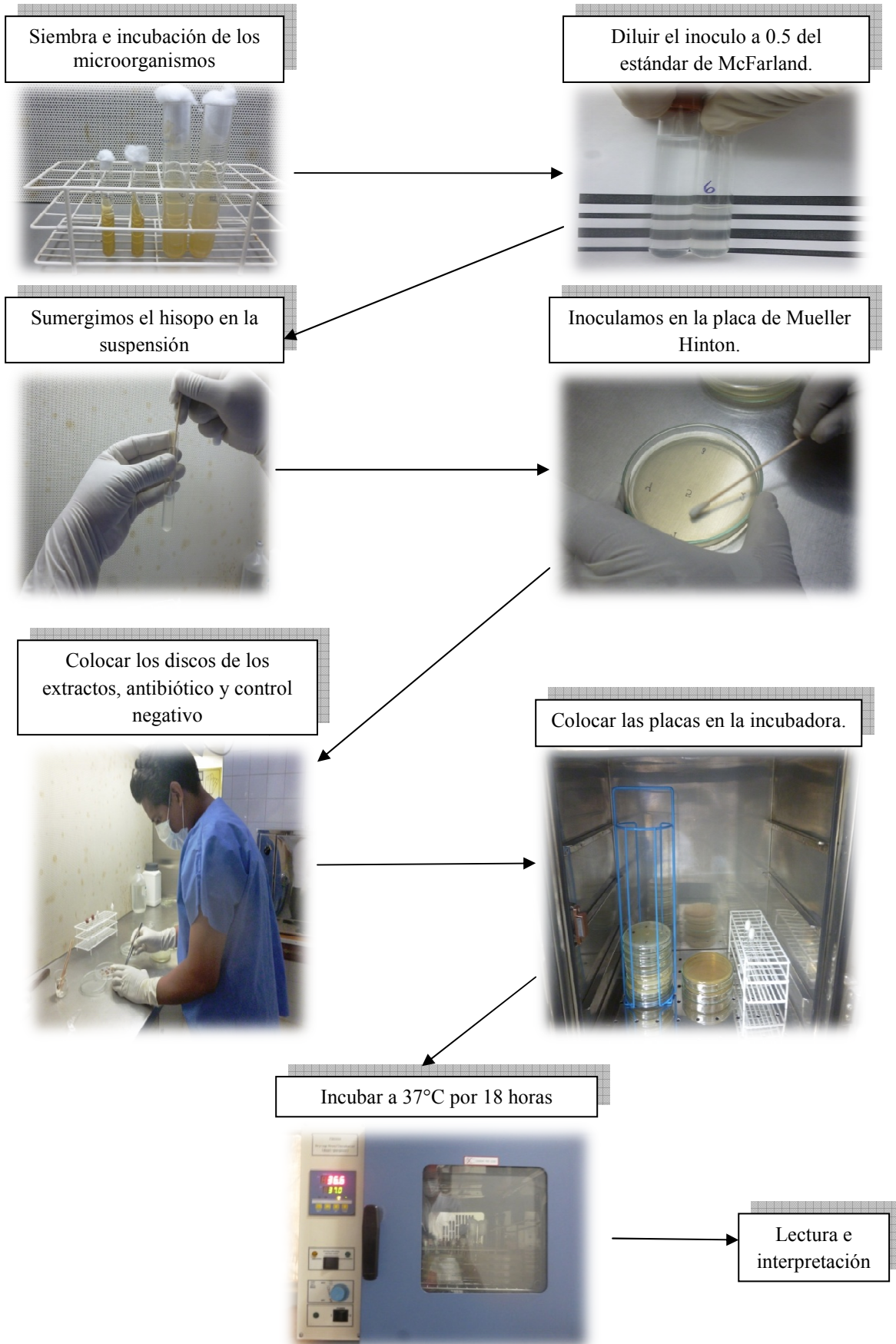
ANEXO 02. - Control Positivo



ANEXO 03.-Medios de Cultivo



ANEXO 04- Esquema para determinar la actividad antibacteriana por el método de disco difusión.

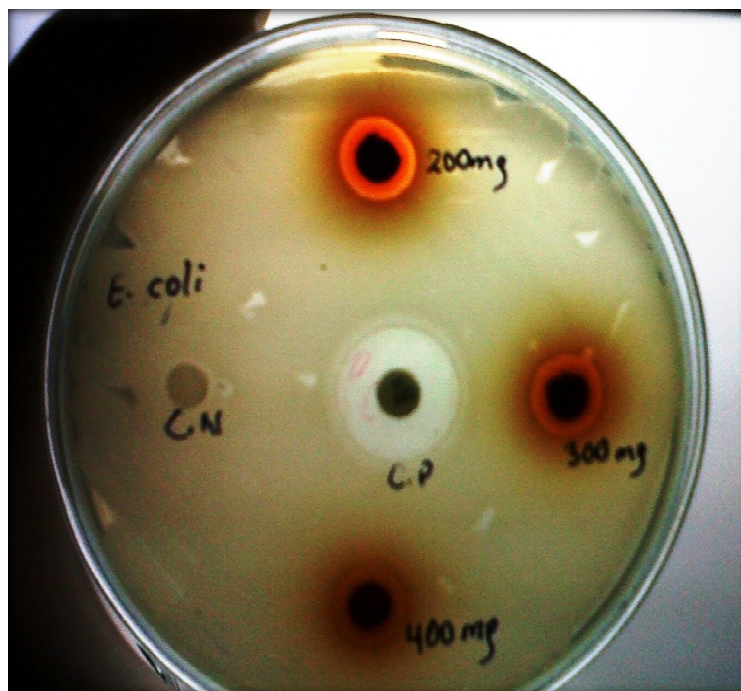


ANEXO 05.- Halos de inhibición por efecto del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200, 300 y 400mg/ml frente *Enterococcus faecalis*.



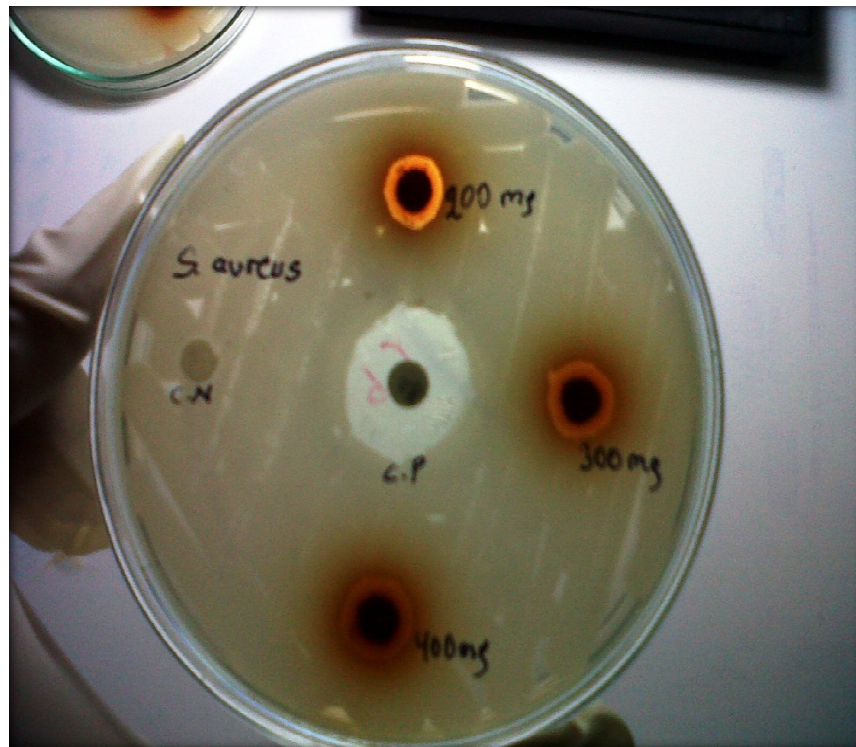
FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 06.- Halos de inhibición por efecto del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200, 300 y 400mg/ml frente *Escherichia coli*.



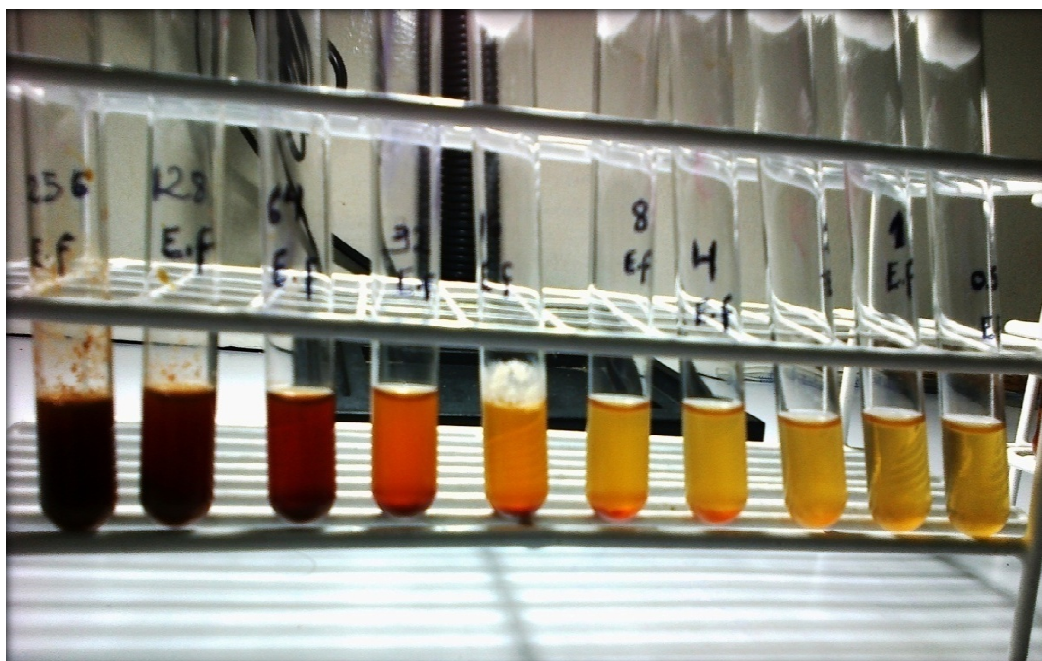
FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 07.- Halos de inhibición por efecto del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* a 200, 300 y 400mg/ml frente *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 08: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* frente a *Enterococcus faecalis*.



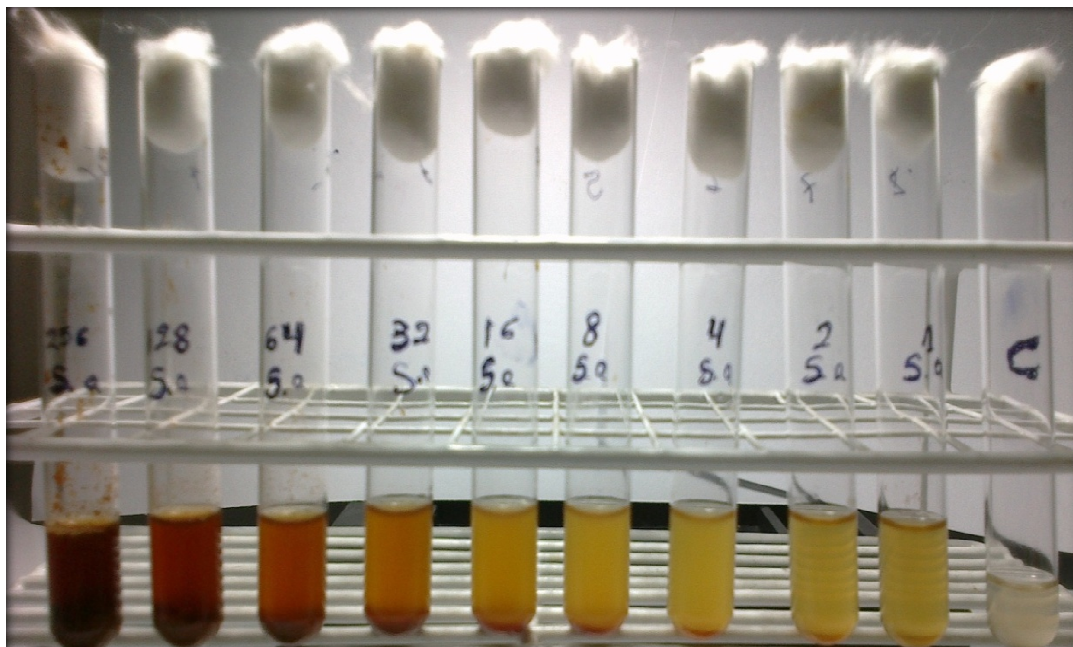
FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 09: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* frente a *Escherichia coli*.



FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 10: Concentración Mínima Inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de *Persea americana* frente a *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Obtenido por el autor

ANEXO 11: Evaluación de las actividades antimicrobiana de extractos vegetales en el laboratorio de microbiología en el instituto de medicina tradicional IMET-EsSALUD

Extracto a Evaluar:

Género:

Especie:

Nombre Común:

Fecha de Procesamiento:

1. ANTIBIOGRAMA

Antibiótico:

| Microorganismos ATCC | DZI (mm) | | | |
|--|------------|------------|------------|-----------|
| | Placa N°01 | Placa N°02 | Placa N°03 | X DZI ATB |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912 | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | | |

DZI: Diámetro de la zona de inhibición.

ATB: Antibiótico

X DZI ATB: Porcentaje del diámetro de la zona de inhibición del antibiótico

2. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA:

| Microorganismos ATCC | DZI (mm) | | |
|---|------------|------------|------------|
| | Placa N°01 | Placa N°02 | Placa N°03 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912 | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | |

DZI: Diámetro de la zona de inhibición.

Porcentaje de actividad antimicrobiano del extracto:

| Microorganismos ATCC | X DZI Extracto | X DZI Control | %AA |
|---|-----------------------|----------------------|------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25912 | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | | |

X ZDI: Porcentaje del diámetro de la zona de inhibición.

%A/A: Porcentaje de actividad antimicrobiana.

Control: Antibiótico

$$\%AA = \frac{XDZIEextracto}{XDZIControl} \times 100$$

3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (mg/ml)

| Cc. (mg/ml) | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>E. coli</i> ATCC 25912 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
|------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |