

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de frutos y hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Tesis presentada por las Bachilleres:

ORÚE BÉJAR, Claudia Ángela

REBAZA PEÑAFIEL, Fiorella

**Para obtener el Título Profesional de
QUÍMICO-FARMACÉUTICO**

Asesor:

Dra. Jave Márquez Jesús Mercedes

AREQUIPA – PERÚ

2013

DEDICATORIA

Dedicamos la presente tesis:

A Dios por mostrarnos día a día que con humildad,
paciencia y sabiduría todo es posible.

A nuestros padres y hermanos quienes con su amor,
apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre
a lo largo de nuestra vida estudiantil; a ellos que
siempre tuvieron una palabra de aliento en los
momentos difíciles y que han sido incentivos de
nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente queremos agradecerle a Dios por bendecirnos, por hacer realidad nuestro sueño anhelado.

A la Universidad Católica de Santa María de Arequipa por darnos la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

También nos gustaría agradecer a nuestros profesores durante toda nuestra carrera profesional porque todos han aportado con sus enseñanzas y consejos a nuestra formación.

Con todo nuestro amor para nuestros Padres que nos brindaron la confianza, tuvieron la paciencia necesaria para que nosotros pudiéramos lograr nuestros sueños.

A nuestros hermanos y Esposos por motivarnos y darnos aliento y valentía cuando sentíamos que el camino se terminaba, ahora nos toca regresar un poquito de todo lo inmenso que nos han otorgado.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.).....	5
1.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
1.1.2. UBICACIÓN TAXONÓMICA	6
1.1.3. NOMBRE CIENTÍFICO	6
1.1.4. NOMBRES COMUNES.....	6
1.1.5. HÁBITAT	7
1.1.6. PARTE EMPLEADA.....	7
1.1.7. HISTORIA.....	7
1.1.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	8
1.1.9. COMPOSICIÓN ALIMENTARIA DEL FRUTO	9
1.1.10. ACCIONES FARMACOLÓGICAS	9
1.1.10.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	9
1.1.10.2 Actividad antidiarreica-espasmolítica.....	10
1.1.10.3 Actividad hipoglicemiante	11
1.1.10.4 Otros.....	12
1.1.11. EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS.....	13
1.1.12. CONTRAINDICACIONES	13
1.1.13. USOS ETNOMEDICINALES	13
1.1.14. POSOLOGÍA	14
1.1.15. USOS ALIMENTARIOS.....	15
1.2. GENERALIDADES DE BACTERIAS.....	15
1.2.1. BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	16

1.2.1.1	Staphylococcus aureus	16
1.2.2.	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	23
1.2.2.1	Escherichia coli	24
1.2.2.2	Pseudomonas Aeruginosa	30
1.3.	OBTENCION DE EXTRACTOS	35
1.3.1.	<i>Desecado:</i>	35
1.3.2.	<i>Triturado:</i>	36
1.3.3.	<i>Procesos fisicoquímicos a tener en cuenta:</i>	36
1.3.4.	<i>Naturaleza del disolvente:</i>	38
1.3.5.	<i>Temperatura:</i>	38
1.3.6.	<i>Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente:</i>	39
1.3.7.	<i>Tipos de Extractos</i>	39
1.3.7.1	Extractos Fluidos.....	39
1.3.7.2	Extractos Blandos	40
1.3.7.3	Extractos Secos	40
CAPÍTULO II		41
MATERIALES Y MÉTODOS		41
2.1.	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	41
2.2.	MATERIALES	41
2.2.1.	UNIDADES DE ESTUDIO	41
2.2.1.1	ESPECIES BOTANICAS.....	41
2.2.1.2	microorganismos	41
2.2.2.	INSTRUMENTAL DE LABORATORIO	43
2.2.2.1	Instrumental de vidrio	43
2.2.2.2	Equipos y Aparatos	44
2.2.2.3	Otros accesorios	44
2.2.3.	REACTIVOS	44
2.2.4.	MEDIOS DE CULTIVO	45
2.3.	MÉTODOS	45
2.3.1.	PROCEDIMIENTO PARA el tratamiento de la PLANTA	45
2.3.1.1	RECOLECCIÓN	45
2.3.1.2	SELECCIÓN	45
2.3.1.3	ESTABILIZACIÓN	46
2.3.1.4	DESECACIÓN	47
2.3.1.5	TRITURACIÓN.....	47
2.3.2.	PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	48
2.3.2.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO POR PERCOLACIÓN	48

2.3.2.2	PROCEDIMIENTO	50
2.3.2.3	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO	51
2.3.2.4	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO por maceración	53
2.3.2.5	CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	55
2.3.3.	<i>MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DEL LOS EXTRACTOS DE PSIDIUM GUAJAVA</i>	56
2.3.3.1	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS	56
2.3.3.2	DETERMINACIÓN DE LA concentración inhibitoria mínima (CIM)	61
2.3.3.3	DETERMINACIÓN DE LA concentración BACTERICIDA mínima (CBM)	62
2.3.4.	<i>MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	65
2.3.4.1	MEDIA	65
2.3.4.2	varianza.....	65
2.3.4.3	Desviación estándar.....	65
2.3.4.4	Análisis de varianza.....	65
CAPÍTULO III	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.1.	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS POR LOS DIFERENTES METODOS DE EXTRACCIÓN: MACERACIÓN, PERCOLACIÓN Y SOXHLET	67
3.2.	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS EXTRACTOS	68
3.3.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	73
3.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA	75
3.5.	DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CMI Y CBM, MEDIANTE EL MÉTODO HOYO PLACA	76
CONCLUSIONES	78
SUGERENCIAS	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	83
ANEXO N°1: MEDIOS DE CULTIVO	84
ANEXO N°2: MEDIO DE CONTRASTE	87
ANEXO N°3: GALERÍA FOTOGRÁFICA	88

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal, evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanolicos del fruto y hojas de *Psidium guajava* “guayaba”, frente a cepas tipificadas pertenecientes a las especies de bacterias Gram positivas / (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram negativas / (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853).

Para la obtención de extractos se utilizó tres diferentes métodos de extracción que utilizan disolventes. Estos métodos fueron la maceración, percolación y mediante Soxhlet, los dos últimos métodos son continuos y el primero discontinuo. Los principios activos (frutos y hojas) de la guayaba fue recolectada de la provincia de Camaná. Luego de la recolección se procedió al tratamiento de la droga, para ello se procedió a estabilizar los principios activos, luego desecar, triturar y finalmente el proceso de obtención de los extractos mediante los métodos citados. En este sentido se logró 6 muestras problema, es decir, tres tipos de extractos (por maceración, percolación y Soxhlet) para el fruto y otros tres para las hojas de guayaba.

Se realizó una prueba de sensibilidad inicial para los extractos secos obtenidos frente a las muestras bacterianas. La concentración inicial del extracto seco fue de 200mg/ml, se observó que solo es sensible *Staphylococcus*

aureus frente al macerado de hojas de *Psidium guajava* (guayaba), no existiendo sensibilidad para los extractos del fruto ni del resto de extractos de las hojas.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto seco de las hojas de *Psidium guajava* obtenido mediante maceración fue de 50mg/ml; y la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 100mg/ml, en ambos casos sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

Finalmente al realizar pruebas de hipótesis (ANOVA) se determinó que el extracto seco a 100mg/ml de hojas de *Psidium guajava* obtenido mediante maceración fue el que presentó mayor actividad antibacteriana frente al extracto de hojas de *Psidium guajava* obtenido por maceración a 50mg/ml.



ABSTRACT

This research work has as main objective to evaluate the in vitro antibacterial activity of the extracts of the fruit and leaves of *Psidium guajava* “guava”, against strains typified the species of Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

For obtaining these extracts were used three different extraction methods using solvents. These methods were maceration, percolation and Soxhlet. The last two methods are continuous and the discontinuous first. The drug (fruits and leaves) of guava was collected from a home garden located in the district of Camana. After the collection proceeded to drug treatment, it is proceeded to stabilize the drug, after drying, grinding and finally the process of obtaining the extracts by the methods cited. In this sense was achieved six samples, in three types of extracts (maceration, percolation and Soxhlet) for the other three for fruit and guava leaves.

Initial sensitivity test was performed for the obtained dry extract against bacterial samples. The initial concentration of solids was 200mg/ml, we observed that it is only sensitive *Staphylococcus aureus* versus macerated leaves *Psidium guajava* (guava), uncorrelated sensitivity to the fruit extracts or extracts from the rest of the leaves.

The minimum inhibitory concentration(MIC) for the dry extract of *Psidium guajava* leaves was obtained by maceration of 50mg/ml, and the minimum bactericidal concentration(MBC) was 100mg/ml, in both cases on the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.

Finally, when statistical hypotheses (ANOVA) determined that the dry leaves of 100mg/ml of *Psidium guajava* were obtained by maceration, which showed higher antibacterial activity.



INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional desde siempre hasta la actualidad está íntimamente vinculada a los pueblos, pese al avance de la ciencia y tecnología, la población tiene una clara tendencia y preferencia por lo natural. Es por ello que existen numerosas plantas medicinales a las que la población atribuye muchos efectos desde nutritivos hasta medicinales. Una de estas especies que es considerada un buen alimento y planta medicinal es la guayaba, cuyo nombre científico es *Psidium guajava*. Es una fruta tropical que pertenece a la familia de las Mirtáceas la cual incluye a más de 3.000 especies de árboles y arbustos de los cinco continentes.

Todas las guayabas las producen árboles del género *Psidium* que crecen en regiones tropicales de América, Asia y Oceanía.

En el Perú se produce en provincias como San Martín, Loreto, Huánuco, Junín, Lima (Chosica), Cuzco.

Existen variedades de guayaba bien diferenciadas por su color, lo más destacable de la guayaba en cuanto a su aporte nutricional se refiere al aporte de fibra (hasta 6g) y vitamina C (hasta 60mg). Ambos en cantidades significativas de tal manera que se pueden considerar alimentos fuente de estos compuestos. La fibra actúa como un suave laxante y además “alimento” para las bacterias buenas de la flora intestinal, de tal manera que fortalece el sistema inmunológico. Por otra parte el consumo del fruto es recomendado para aliviar diarreas y disenterías, muchos pobladores de los lugares donde se cultiva acusa efectos beneficiosos de las hojas en el tratamiento de “heridas infectadas”

En nuestro medio al no haber encontrado trabajos de investigación que evidencien estas acciones farmacológicas es que las autoras del presente estudio decidimos evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos del fruto y hojas de *Psidium guajava* (guayaba), frente a cepas tipificadas pertenecientes a las especies de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*), y con ello demostrar si tienen o no un efecto antibacterial.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de frutos y hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar las técnicas extractivas para obtener los extractos etanólicos (maceración, percolación, soxhlet) de frutos y hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”.
- Mediante el método de Excavación – Placa y el método de Disco- Placa - Cultivo determinar la sensibilidad de los microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) del extracto etanólico de frutos y hojas de *Psidium guajava* L (guayaba).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos de frutos y hojas de *Psidium guajava* L “guayaba”, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) teniendo en cuenta los resultados previos de sensibilidad.
- Comparar la eficacia antibacteriana de los extractos etanólicos de *Psidium guajava* L.

HIPÓTESIS

Las plantas en sus órganos como frutos y hojas contienen componentes químicos con actividad antimicrobiana es probable que los extractos etanólicos obtenido a partir de estos presenten actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA L.*)

1.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Arbusto perenne, perteneciente a la familia de las Mirtáceas, caracterizado por presentar una altura variable, entre 3 y 7 metros; tronco de hasta 30 cm de diámetro, recubierto por una corteza marrón claro o gris-verdoso, que se desprende en delgadas escamas, hojas oblongas o elípticas, de 4 a 12 cm de largo por 3.5-4.5 cm de ancho, pubescentes, con nervaduras prominentes en el reverso; pedúnculos axilares con 1-3 flores pubescentes, con pétalos blancos de 1.5-2cm y cáliz envolviendo la yema; lóbulos del cáliz de 1-1,5cm unidos en el botón; y un fruto globoso o piriforme (guayaba), amarillo, de 3-6cm de diámetro. ⁽⁴⁾

1.1.2.UBICACIÓN TAXONÓMICA

Tipo: Fanerógama

Clase: Dicotiledónea

Orden: Myrtiflorales

Familia: Mytaceae

Género: Psidium

Especie: *Psidium guajava*⁽²¹⁾

1.1.3.NOMBRE CIENTÍFICO

Psidium guajava Linneo.⁽²¹⁾



FIGURA N°1: Frutos de *Psidium guajava* L.

Fuente: Elaboración propia

1.1.4.NOMBRES COMUNES

- **Español:** guayaba, guayabo, arazá (Paraguay).
- **Portugués:** guayabo, goiaba, goiabeira, dijamboé, araçá.
- **Inglés:** guava.
- **Otros:** guayabe, goyavier (francés), guayaba (italiano), guava (alemán)⁽¹⁾

- **Perú:** guayaba, tspata (piro) bimpish (cashibo), sailla, shahuintu (quechua), sháwi (aguaruna) ⁽⁴⁾

1.1.5.HÁBITAT

El género *Psidium* comprende alrededor de un centenar de especies de América tropical y neotropical. *Psidium guajava* es originaria de América tropical, posiblemente del sur de México o del Amazonas colombiano, desde donde se habría propagado. Asimismo, se han encontrado restos de esta especie en antiquísimos cementerios del Perú (Ancón, Gallinazo, Virú, Ocucaje, etc). Hoy en día se encuentra naturalizado en regiones tropicales y subtropicales del mundo, hasta los 1200-1800 metros de altura, cultivándose incluso en regiones templadas de Europa. Existen más de 90 variedades, estando la mayor producción concentrada en la India, Brasil, Colombia, Cuba, Hawai, Puerto Rico, Estados Unidos, Cuba y México. ⁽¹⁾

En nuestro país se distribuye en costa, sierra baja y Amazonía hasta 3000msnm ⁽⁴⁾.

1.1.6.PARTE EMPLEADA

La droga está constituida por las hojas y la corteza secas, aunque también se emplean en medicina los frutos y en menor medida la raíz. ⁽¹⁾

1.1.7.HISTORIA

Más allá del empleo alimentario, existen evidencias acerca del uso medicinal de las hojas de guayaba desde épocas precolombinas como astringente, antidiarreico y antisarnoso. Los antiguos indígenas de México le denominaron *xalxócotl* (en idioma náhuatl) que significa “fruto duro-ácido” (*xocotl*) y “arenoso” (*xalli*). La llegada de los europeos a América hizo despertar el interés en comercializar sus frutos. De esta manera, portugueses y españoles llevaron semillas a otras colonias de Asia y África. Fernández de Oviedo en su obra “Historia General y Natural de las Indias” (1544) denominó como guayaba al fruto de este árbol, tomando la denominación indígena *guaiava* o *walaba*. La guayaba fue utilizada

medicinalmente también por el ejército liberador de Cuba durante la guerra de la independencia de ese país en el siglo XIX. Grosourdy en su obra “El Médico Botánico Criollo” publicada en 1864, hace referencia al empleo de esta planta contra las indigestiones, resfriados y enfermedades cutáneas. La primera publicación científica sobre las propiedades de la guayaba data de 1949 a partir de los trabajos de W. Collière quien descubrió propiedades bacteriostáticas del extracto acuoso.

1.1.8.COMPOSICIÓN QUÍMICA

- Hoja: taninos (9-10%), aceite esencial (0,1-0,3%) rico en cariofileno, nerolidiol, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, α -pineno y 1,8-cineol; triterpenoides (ácido gujavanoico, obtusinina, ácido goreishico), ácido oleánico, ácido ursólico, ácido catecólico, ácido guayavólico, ácido malísico, ácido elágico, β -sitosterol, flavonoides (avicularina, quercetina-3-O- β -d-glucósido, quercetina-3-O- α -L-ramnósido y quercetina-3-O-gentiobiosido, quercetina-3-O- α -arabinopiranosido=guayaverina; morin-3-O- α -L-lixopiranosido).
- Raíz: taninos (10-20%), leucoantocianidinas, esteroides, cumarinas (amritósidos, ácido gálico).
- Flor: cumarinas, flavonoides (guayaverina, avicularina, quercetina, quercetina-3-arabinósido), ácido oleánico (triterpeno).
- Fruto: ácido cinámico (0.4mg/k), ácido-3-hexenoico (0,2mg/k), polifenoles, taninos, terpenos, glucósidos esteroidales (saponinas, bufadienólidos, cardenólidos), antraquinonas, pectina (ácido-D-galacturónico, D-galactosa y L-arabinosa) y abundante ácido ascórbico (en ocasiones llega a los 400mg/100g de pulpa).
- Corteza: taninos elágicos (12-30%) conformados por casuarinina, estaquicerina, estricninitina, hexa-HO-difenilglucosa, casuarina.⁽¹⁾

1.1.9.COMPOSICIÓN ALIMENTARIA DEL FRUTO

Cada 100g del fruto contiene: calorías 69 kcal, agua 80,6g; proteínas 1g; grasas 0,4g; hidratos de carbono 17,3g; fibra 5.6g; cenizas 0.7g; calcio 15mg; fósforo 24mg; hierro 0,7mg; sodio 4mg; potasio 291mg; caroteno 75µg; tiamina 0,05mg; rivoftavina 0,04mg; niacina 1,10mg y ácido ascórbico 132mg.

1.1.10.ACCIONES FARMACOLÓGICAS

Las principales actividades de esta especie están centradas en sus acciones antimicrobianas, antidiarreicas e hipoglucemiantes. Para una mejor comprensión se dividirán los ensayos biológicos realizados de acuerdo a la actividad terapéutica propuesta:⁽²⁾

1.1.10.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El extracto acuoso de la hoja de guayaba ha demostrado actividad inhibitoria *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Sarcinia lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus albus*, *S.aureus* y *Vibrio cholerae*. Otros trabajos efectuados con extractos hidroetanólicos y tinturas de esta planta han exhibido actividad inhibitoria, *in vitro*, contra cepas de diferentes microorganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *S.flexneri*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*. Tanto el extracto acuoso como el metanólico de la corteza evidenciaron actividad inhibitoria frente a *E.coli*, *Klebsiella penumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.⁽²⁾

Con referencia a la actividad antimicrobiana de la tintura se verificó una inhibición del 80% sobre cepas de *E.coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Streptococcus pyogens*, siendo la CIM para *S.typhi* y *S.aureus* de 5mg/ml. En el caso de *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, la administración del extracto fluido de las hojas al 40% evidenció una baja actividad inhibitoria. En el caso de *S.aureus*, el extracto acuoso de *Psidium guajava* en una concentración de 6,5mg/ml demostró una fuerte y total inhibición sobre 9 cepas diferentes.

Gran parte de la actividad antibacteriana es atribuida a los flavonoides *avicularina*, *guayaverina* y *quercetina*, como así también a los taninos, cuya concentración inhibitoria mínima (CIM) resulto cercana al 100mg/ml, siendo dicho guarismo algo inferior al demostrado por cloranfenicol y tetraciclina.

También pudo verificarse en la maceración hidroalcohólica de las hojas, actividad antimicótica contra *Candida albicans*, *C.kruseii*, *C.parapsilosis* y *C.stellatoidea* (CIMD de 1-2mg), mientras que la decocción acuosa de las hojas halló actividad únicamente con *Epidermophyton floccosum* entre los seis dermatofitos patógenos ensayados. La actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* fue considerada de mediana intensidad. En tanto el extracto fluido de las hojas al 40% no evidenció actividad inhibitoria *in vitro* sobre cultivos de *Candida albicans*.⁽²⁾

De igual modo la tintura de las hojas resulto inactiva *in vitro*, frente a cepas de *Neisseria gonorrhoea* y *Vibrio cholerae*. Tampoco desarrolló actividad inhibitoria sobre modelos, *in vivo*, de queratoconjuntivitis en cobayos infectados con *Salmonella dysenteriae*. Por su parte la infusión de las hojas ha exhibido, *in vitro*, actividad inhibitoria contra *Trichomonas vaginalis*, en cuyo caso tendría ingerencia el ácido psidiólico el cual en diferentes ensayos demostró actividad antiprotozoaria. En pacientes afectadas de trichomoniasis vaginal la administración de un ovulo elaborado con extracto alcohólico de hojas de guayaba aplicado una vez al día durante 15 días, produjo efectos beneficiosos similares al fármaco de referencia metronidazol.

1.1.10.2 ACTIVIDAD ANTIDIARREICA-ESPASMOLÍTICA

Tanto la *quercetina* como la *quercetina-3-arabinósido*, serían responsables de la actividad antidiarreica atribuida a esta especie, la cual se ha comparado a la ejercida por difenoxilato. La *quercetina* presente principalmente en hojas y corteza, ha demostrado una definida acción antisecretora de la producción de acetilcolina (no reversible por naloxano) la cual se llevaría a cabo a través del bloqueo de los canales de calcio o por inhibición del sistema enzimático que relaciona la síntesis de prostaglandinas con la liberación de acetilcolina. Debe recordarse que la acetilcolina es estimulante de la musculatura lisa de intestino y de otros músculos lisos de contracción involuntaria.⁽²⁾

Estudios experimentales determinaron que el extracto acuoso de las hojas presenta actividad espasmolítica en dosis de 1mg/ml sobre íleon y aorta aisladas de cobayo; en tanto el extracto alcohólico ha demostrado inhibir las contracciones espontáneas también en el íleon de cobayo aislado, en una respuesta dosis dependiente. En los ensayos se pudo constatar que el íleon contraído eléctricamente o por cloruro de potasio fue efectivamente relajado por *quercetina*, demostrando este compuesto una respuesta más potente que la evidenciada por indometacina. Como la indometacina es casi 10 veces más potente como inhibidor de la enzima ciclooxigenasa que la propia *quercetina* no es consecuencia necesaria de la disminución de prostaglandinas.⁽²⁾

La actividad espasmolítica y antidiarreica también fue evidenciada por la fracción metanólica (compuesta entre otros por cinco glicósidos de *quercetina*) de los frutos inmaduros de guayaba. Dichos glucósidos al ingresar al TGI se hidrolizan, liberando su aglicona (*quercetina*) que es el principio activo. Tanto en las fracciones activas de *Psidium guajava* como en las tisanas, los glucósidos de *quercetina* se encuentran de manera más abundante que la aglicona, siendo esta última la que posee mayor afinidad antiespasmódica. La fracción metanólica de las hojas también demostró actividad inhibitoria *in vitro* contra *Shigella sp*; *Salmonella sp*, *E.coli* y *Vibrio cholerae*, agentes causales de diarrea y disentería.

En un estudio clínico llevado a cabo en China con niños que padecían enteritis y diarreas debido a infección por rotavirus, se pudieron observar excelentes resultados con la administración de extractos acuosos de hojas de guayaba. Otro ensayo clínico controlado a doble ciego llevado a cabo en 50 pacientes con diarrea aguda, determinó la utilidad de un medicamento elaborado en base a extractos de hojas de guayaba en cápsulas con valoración de *quercetina* (1500mg/día durante 3 días), demostrando disminuir los síntomas cólicos y dolorosos de manera significativa.

1.1.10.3 ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE

Estudios realizados en China dan cuenta del efecto hipoglicemiante del jugo de la fruta administrado intraperitonealmente a ratones con diabetes inducida por aloxano en dosis de 1g/k. Dicho efecto, si bien se consideró satisfactorio, fue

menos marcado que el logrado en iguales condiciones por la clorpropamida y metformina. El mecanismo de acción no está del todo aclarado ya que estudios posteriores no revelaron cambios en los niveles plasmáticos de insulina. En otro estudio, no resultó significativo el descenso de glucemia observado en conejos a los cuales se les suministró por vía intragástrica el jugo del fruto de guayaba.⁽²⁾

En cambio en diferentes ensayos, en dosis de 200mg/k, los extractos etanólico, acuoso y butanólico de las hojas de *P.guajava* han demostrado descender la glucemia y mejorar la tolerancia a la glucosa sobre ratas diabéticas aloxonizada. Por otra parte, estos mismos extractos bloquearon la lipólisis inducida por adrenalina en células grasas del tejido adiposo del epidídimo de ratas.⁽²⁾

Estudios clínicos efectuados en humanos demostraron que el jugo de guayaba reduce las cifras basales de glucemia en voluntarios sanos y en diabéticos tipo II o no insulino-dependientes. Una evidencia indirecta del efecto hipoglucemiante de *P.guajava* se ha observado en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina a partir de la administración de extractos acuosos (1,32g/k) de las hojas de la planta parásita *Loranthus bengwensis* la cual parasita las especies *Citrus limonium*, *Jatropha curcas* y *P.guajava*. Cuando esa planta no parasita la guayaba no se observa el efecto hipoglucemiante.⁽²⁾

1.1.10.4 OTROS

A través de diferentes ensayos *in vitro* se ha demostrado que extractos de guayaba presentan actividad antioxidante, antiagregante y antiherpética. En relación a la primera, tanto en la pulpa como en la cáscara del fruto se localizan polifenoles extraíbles (2,62-7,79%), los cuales evidenciaron una fuerte actividad antioxidante *in vitro*, a través de tres modelos diferentes de ensayo: actividad barredora sobre DPPH, actividad reductora oxidativa de hierro e inhibición de la oxidación de la lipoproteína LDL catalizada por cobre. En estudios de oncología experimental, el extracto triclorometánico de las hojas demostró actividad citotóxica contra células sarcomatosas KB, en tanto el extracto etanólico resultó citotóxico sobre células malignas P388. En cambio ninguno de los extractos resultó activo contra células KB-VI ni evidenció actividad antimetabólica en un modelo *in vitro* de inhibición de astrocitoma.⁽²⁾

El consumo de la hoja fresca en infusión/decocción no proporciona acción diurética, antihipertensiva ni cronotropa positiva. La riqueza en sesquiterpenos, típica en la familia Mirtáceas, ha hecho que se puedan realizar algunos ensayos con el aceite esencial, el cual ha demostrado sobre ratas, efecto antiinflamatorio en el test de carragenina y antineoplásico *in vitro*. En este último caso la actividad inhibitoria fue observada sobre un modelo de proliferación tumoral del mieloma SP2/0, con un porcentaje de efectividad del 90%.⁽²⁾

1.1.11.EFECTOS ADVERSOS Y/O TÓXICOS

Por lo general la toma de extractos orales de las diferentes partes de la guayaba son bien toleradas. Decocciones de las partes aéreas de esta planta pueden presentar concentraciones de *quercetina* de hasta un 44%. En este sentido se ha observado a través del test de Ames que dicha sustancia cuando alcanza concentraciones de 800mg/k de hoja seca resulta mutagénica. La DL₅₀ de la *quercetina* se ha calculado en 161mg/k administrada por vía oral en ratas.⁽²⁾

La administración por separado de infusiones de corteza y hojas de guayaba a ratones en dosis de 1-5g/k no evidenciaron señales de toxicidad aguda. Estudios de mutagenicidad revelaron que el extracto metanólico en concentración de 5mg/placa, presenta actividad antimutagénica sobre *Salmonella typhimurium TA-98* y *E.coli WP-2*, cuando dichos gérmenes fueron irradiados con dosis tóxicas de radiaciones ultravioletas o invadidos por mutágenos varios. En cuanto al empleo interno de partes de la planta que no involucren al fruto, se aconseja su uso discontinuado, no mayor a 30 días.⁽²⁾

1.1.12.CONTRAINDICACIONES

Hasta no verificarse su seguridad e inocuidad, se desaconseja su empleo durante el embarazo, lactancia y en niños pequeños.⁽²⁾

1.1.13.USOS ETNOMEDICINALES

Son muchos y variados los empleos de las distintas partes de la guayaba en América y Asia tropical. Su uso más difundido es como antidiarreico,

empleándose a tal fin la decocción de la corteza y/o hojas y/o frutos. También el jugo fresco. La decocción de las hojas es empleada en la República Dominicana como antidiarreica, sedante y contra los vértigos (en este último caso asociado a *Allium sativum* y *Bunchosia glandulosa*). La decocción de los retoños foliares se emplea en Cuba contra los vómitos y resfriados.⁽⁵⁾

La mayoría de los países la decocción de las hojas y la corteza se aplican, por vía externa, en casos de enfermedades cutáneas y úlceras varicosas. Con menor frecuencia se emplea la decocción de las hojas, como hipoglicemiante, antitusiva, reguladora del ciclo menstrual, para aliviar cólicos hepáticos y abdominales, anginas, como antimicrobiano, antiinflamatorio, antiemético, antihelmíntico e hipocolesterolemia. En Brasil le atribuyen propiedades hepatoprotectoras, antisépticas en infecciones orofaríngeas y como descongestiva en hemorroides. En Minas Gerais (Brasil) emplean la corteza del tronco por vía interna como estomáquico y antiespasmódico, mientras que por vía externa el lavado de úlceras y en leucorrea (ducha vaginal). En Costa Rica recomiendan la decocción de las flores y corteza como emenagogo y antiamebiano.⁽⁵⁾

En las Islas Canarias emplean la fruta seca en procesos hemorroidales. En Guatemala, más allá de los usos tradicionales, recomiendan la guayaba en diabetes (igual en Panamá), piodermitis, uretritis, asma, glositis y dermatopatías. En Colombia utilizan los cogollos y las hojas como tónicos capilares en casos de alopecia, en tanto las semillas tienen empleo como hipoglicemiantes. En algunas comunidades de Karnataka (India) emplean infusiones orales con las hojas jóvenes trituradas, para reducir los efectos adversos de la marihuana. El jugo fresco lo recomiendan para tratar cefaleas y alergias en niños.

1.1.14.POSOLOGÍA

- Decocción: 10.20g/l de hojas, haciendo hervir durante tres minutos
- Jugo: La ingesta del jugo de guayaba con fines terapéuticos se estima en 240ml cada 4-6 horas.
- Uso tópico: La decocción de la hoja para uso tópico se estima 50-100g/l.⁽²⁾

1.1.15.USOS ALIMENTARIOS

Los frutos frescos, cocidos o en jalea son comestibles. La pectina de los frutos es muy útil para hacer jaleas. Separando la pulpa, se utilizan los llamados “cascos de guayaba” para preparar deliciosos postres. El aceite esencial de las hojas o las semillas, debido a la presencia de *eugenol*, se emplea como saborizante aromático. En Venezuela preparan una bebida astringente con las frutas y hojas, conocida como guarapo. En Seychelles preparan con los frutos una bebida alcohólica conocida como *lepire*. En Brasil preparan *goiabada*, partiendo de un puré del fruto (separando las semillas) y cocinando a fuego lento (con o sin azúcar) hasta que tome punto.⁽²⁾

1.2. GENERALIDADES DE BACTERIAS

Las bacterias son organismos unicelulares ubicuos en la naturaleza, los cuales se pueden encontrar gracias a su gran capacidad de adaptación en distintos lugares en condiciones diversas. La célula bacteriana deriva su energía de dos fuentes principales: compuestos inorgánicos y CO₂ en las llamadas bacterias autótrofas y compuestos orgánicos preformados como polisacáridos, grasas y proteínas en las denominadas bacterias heterótrofas. Estas últimas pueden utilizar dichos compuestos aeróbicamente en presencia de oxígeno (respiración) o anaeróbicamente, sin oxígeno (fermentación). De acuerdo a la utilización de tal compuesto, las bacterias se clasifican en anaerobias obligadas, anaerobias facultativas, aerobias obligadas y microaerofílicas; cuando requieren cantidades grandes de CO₂, se denominan capneicas.⁽²⁴⁾

Las bacterias desde el punto de vista metabólico son microorganismos supremamente activos, producen en su interior o exportan al medio donde se encuentran, un sinnúmero de sustancias. Varias de estas sustancias tienen relación con patología en el hombre. Algunas de estas son de carácter enzimático y se llaman exotoxinas, las cuales tienen acciones específicas sobre determinadas células de mamíferos. Otras muchas se dirigen a la transformación de substratos específicos en el medio como son las responsables de la fermentación de sustancias, las fijadoras de nitrógeno, etc.⁽²⁴⁾

Las bacterias se reproducen por fisión binaria en la cual una célula madre da origen a dos células hijas idénticas. Este proceso es gobernado por el cromosoma bacteriano. ⁽²⁴⁾

1.2.1. BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellas bacterias que toman la violeta de genciana, poseen una pared celular gruesa compuesta por varias capas de peptidoglucano, lo cual hace que estas células sean más rígidas y resistentes a factores mecánicos externos.

La pared celular además contiene a los ácidos teicoico y lipoteicoico, los primeros son polisacáridos ácidos que contienen glicerolfosfato o residuos de ribitol, que estabilizan la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos son aquellos ácidos teicoicos que están unidos a lípidos de membrana.

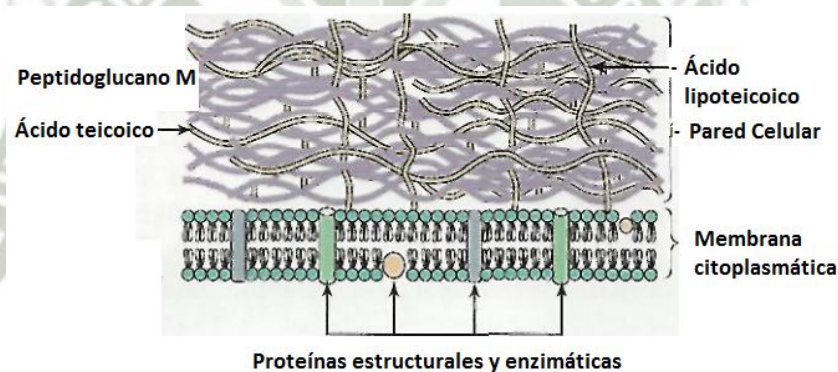


FIGURA N°2: Estructura externa de una bacteria Gram (+)

Fuente: Microbiología Médica, Cedric Mins y otros. 2011

1.2.1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

S.aureus coloniza de forma habitual casi al 30% de las personas, encontrándose principalmente en la nariz y la zona nasofaríngea, piel y genitales externos y rara vez en el colon y la vagina. En el medio hospitalario, tanto en enfermos como en personal sanitario, aumenta de manera importante el porcentaje de colonización, al igual que en diabéticos, pacientes sometidos a diálisis crónica y drogodependientes. La resistencia de esta bacteria a condiciones adversas hace que

sea un importante patógeno, ya que puede causar brotes epidémicos principalmente en hospitales.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1 Morfología

Es un microorganismo Gram (+) de forma esférica, de aproximadamente 1µm de diámetro. Tiende a agruparse en forma de racimos. Su pared celular es la típica de grampositivos, con peptidoglicano asociado a ácidos teicoicos mediante el aminoácido L-lisina. A diferencia de los estreptococos produce catalasa, enzima que desdobra el agua oxigenada. En agar pueden formar colonias de color amarillo dorado y pueden ser betahemolíticas. Su característica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre los que destaca el manitol, para producir ácido láctico, lo que le diferencia de los demás estafilococos. Resiste altas concentraciones de sal, por lo que el medio Chapman (agar manitol salado) es útil para su aislamiento e identificación.⁽¹⁵⁾

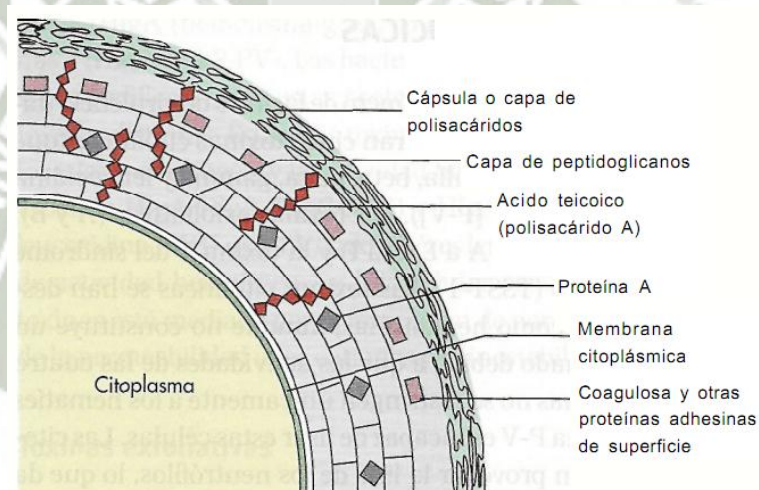


FIGURA Nº3: Estructura de la pared estafilocócica

Fuente: Microbiología Médica, Cedric Mins y otros. 2011

1.2.1.1.2 Determinantes de patogenicidad

Las infecciones por *S.aureus* suelen deberse a una alteración de las barreras naturales a la infección (piel y defensas del sistema inmunológico). La infección suele producirse, por tanto, en enfermos con heridas graves, quemaduras, pacientes que han sido sometidos a intervención quirúrgica, que se infectan al estar en contacto con objetos o personas portadoras. Los pacientes inmunodeprimidos

tienen también mayor probabilidad de infectarse. Los determinantes patogénicos se pueden clasificar en tres grupos.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1.3 Componentes de la pared celular

Peptidoglicano, ácidos teicoicos, proteína A, factor de agregación y proteínas estructurales de la pared que contribuyen a la adherencia.

1.2.1.1.1.4 Enzimas

- La coagulasa es una enzima que transforma el fibrinógeno en fibrina, coagulando el plasma en ausencia de calcio. Está formada por una parte fija (factor de agregación) y una parte soluble. Permite la formación de un foco donde es difícil que lleguen los leucocitos y antimicrobianos. Suele haber relación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa.
- Las estafilocinasas son sustancias termolábiles que descomponen las mallas de fibrina, contribuyendo a la capacidad invasora del microorganismo.
- La hialuronidasa descompone el ácido hialurónico, polisacárido del tejido conjuntivo, colaborando en la invasión hística.
- Las betalactamasas son causantes de la inactivación de los antibióticos betalactámicos. Pueden estar codificados por cromosomas, plásmidos o transposones.
- Otras enzimas, como lipasas, fosfolipasas, fosfatasas, proteasas, etc, también colaboran en el proceso.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1.5 Toxinas

Enzimas que pueden producir su efecto en zonas distantes del foco infeccioso.

- Hemolisinas: la alfa hemolisina rompe membranas celulares de hematíes, leucocitos, fibroblastos y células de la piel. La beta hemolisina degrada esfingomielina de estas mismas células.

- Leucocidinas: enzimas formadas por dos subunidades F y S. se unen a fosfolípidos de membrana de leucocitos y macrófagos destruyéndolos por alteración de la permeabilidad celular.
- Toxina exfoliativa o epidermolítica: presenta dos formas, una termoestable codificada por el cromosoma, y otra termolábil codificada por plásmidos. Actúa extracelularmente separando las células del estrato granuloso y espinoso con la epidermis produciendo epidermolisis o exfoliación. Actúa como superantígeno estimulando los linfocitos T.
- Toxina del síndrome del shock tóxico (TSST): se ha relacionado con la utilización de tampones vaginales y la infección de heridas. Se caracteriza por fiebre, exantema difuso, descamación de las palmas de las manos y de las plantas de los pies y shock con hipotensión muy grave. Esta toxina se comporta como superantígeno induciendo la producción de interleucina 1 y 2 del factor de necrosis tumoral.
- Enterotoxinas: causan intoxicación alimentaria con fiebre y vómitos. Son superantígenos. Se han descrito siete, siendo el A el más común.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1.6 Patogenia

S.aureus puede dar lugar a procesos supurados y a procesos tóxicos.

1.2.1.1.1.7 Procesos supurados

El primer paso de la infección es la adherencia y la colonización. En las glándulas sebáceas y/o folículos pilosos existen ciertos factores que se oponen a la colonización: flora normal, ácidos grasos, descamación epitelial, fagocitosis, etc. Si estos factores fracasan se ponen en marcha los mecanismos bacterianos desencadenando el proceso que suele ser localizado (sólo una mayor actividad bacteriana, junto con el fracaso de los factores defensivos del huésped darán lugar a la generalización y a la aparición de cuadros sépticos). La adherencia de *S.aureus* se produce por medio de unas sustancias presentes en la pared celular y/o en la cápsula mucoide llamadas adhesinas: son ácidos lipoteicoicos que se unen a fibronectina, colágeno o fibrinógeno.⁽¹⁵⁾

Tras la adhesión se produce la invasión, que consiste en el paso de las células hacia el tejido subepitelial.

La enfermedad es causada por la multiplicación del microorganismo y la producción de sustancias que contribuyan a su virulencia.

1.2.1.1.1.8 Procesos tóxicos

- La ingestión de la enterotoxina, preformada en alimentos contaminados estimula por vía vagal el centro del vómito y, al ser un superantígeno, libera interleucina 2, originando una acción tóxica en la mucosa gástrica que se manifiesta con náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal.
- En infecciones locales la liberación de la exfoliatina lesiona y separa el estrato granuloso de la piel dando lugar a dermatitis exfoliativa.
- En el shock tóxico, la producción de la toxina activa la producción de interleucina 1 y 2 y del factor de necrosis tumoral.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1.9 Manifestaciones clínicas

1.2.1.1.1.10 Lesiones en la piel y mucosas

Son las infecciones más comunes producidas por *S.aureus*.

- *Forúnculo*: Se produce por la infección de un folículo piloso, una glándula sudorípara o sebácea. Suele ser una complicación del acné al estar el conducto ocluido.



FIGURA N°4: Folliculitis producida por Staphylococcus aureus

Fuente: Microbiología Médica, Cedric Mins y otros. 2011

En la base de la pestaña producen el *orzuelo común*, normalmente de curso benigno, que se cura espontáneamente sin necesidad de tratamiento. Esta infección puede tener episodios más o menos continuos debido a un mismo fagotipo, lo que se conoce como forunculosis crónica.

- *Ántrax estafilocócico*: Se produce cuando se unen varios forúnculos y se alcanzan regiones más profundas generalmente en el cuello o en la espalda. Puede dar lugar a bacteriemia.
- *Pénfigo neonatorum o impétigo ampollar*: Como consecuencia de la producción de la toxina epidermolítica aparecen grandes ampollas. El *pénfigo neonatorum* aparece en recién nacidos y el impétigo ampollar en niños más mayores y en adultos inmunodeprimidos.⁽¹⁵⁾
- *Paroniquia*: Es una infección del tejido blando contiguo a las uñas.
- *Infecciones en heridas*: muy comunes en hospitales.

1.2.1.1.11 Infecciones generalizadas (bacteriemia)

Se origina por el paso de *S.aureus* al torrente circulatorio desde un foco localizado. El 80% de los casos aparece en medio hospitalario. Esta bacteriemia es grave, ya que se puede producir una diseminación del microorganismo hacia otros órganos, originando lesiones en el endocardio, riñón, pulmón o huesos. El uso de fármacos por vía parenteral también contribuye a la bacteriemia.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.12 Infecciones localizadas en vísceras

Vienen provocadas principalmente por una bacteriemia desde una lesión cutánea existente, aunque ésta haya pasado desapercibida.

- *Lesiones del aparato locomotor*: La infección más común es la osteomielitis, en la que *S.aureus* es la causa más frecuente. Normalmente las extremidades inferiores son las más afectadas, aunque también se observa un alto número de infecciones vertebrales. También es frecuente

la *artritis infecciosa* por *S.aureus*. La bursitis (inflamación de la bolsa periarticular) y la piomiositis (inflamación del músculo esquelético) son infecciones más raras.

- *Endocarditis*: Es la infección más común que se desarrolla tras una bacteriemia, siendo *S.aureus* el causante del 80-90% de las endocarditis infecciosas.
- Otras infecciones localizadas importantes son la *meningitis*, aparición de abscesos en riñón o pulmón y la *neumonía estafilocócica*, que suele aparecer por aspiración de secreciones orales o por diseminación hematógena.⁽¹⁵⁾

1.2.1.1.1.13 Infecciones principalmente por acción exotóxica

Enfermedades causadas por la liberación al medio de sustancias tóxicas que ejercen su efecto a cierta distancia del foco infeccioso.

- *El síndrome de la piel escaldada*: se debe a la producción de toxina exfoliativa que produce formación de ampollas y descamación de la epidermis. Se presenta principalmente en niños recién nacidos denominándose síndrome de Ritter y en niños mayores y adultos se llama necrólisis epidérmica tóxica.
- *El síndrome del shock tóxico*: Es un cuadro grave asociado a la utilización de tampones vaginales, debido a la toxina TSST-1. Los síntomas suelen ser fiebre alta, diarrea, vómitos y exantema cutáneo en manos y pies. Puede progresar hasta el shock grave en 48 horas.
- *Las intoxicaciones alimentarias*: se producen por la contaminación de alimentos por *S.aureus* productores de enterotoxinas. Estos procesos solo requieren de hidratación y no se debe aplicar antibiótico.⁽¹⁵⁾



FIGURA N°5: Síndrome de piel escaldada

Fuente: Microbiología Médica, Cedric Mins y otros. 2011

1.2.1.1.1.14 Tratamiento

Cuando las lesiones son de carácter benigno no es necesario, por lo general, tratamiento y normalmente el drenaje es suficiente para curar la infección. Sin embargo, cuando las lesiones son más profundas o existen factores de riesgo importantes se deben tratar lo antes posible.⁽¹⁵⁾

La mayoría de cepas de *S.aureus* hoy en día son resistentes a las penicilinas penicilinasa-sensibles. Esta resistencia se produce por la acción de la penicilinasa sobre el anillo betalactámico del antimicrobiano.

El descubrimiento de penicilinas penicilinasa-resistentes (meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina y dicloxacilina) y de las cefalosporinas fue una solución hasta que empezaron a aparecer cepas resistentes a ellas. Actualmente existe entre 5 y un 10% de resistencia. Además, estas cepas suelen ser resistentes también a otros grupos de antimicrobianos como cefalosporinas de segunda y tercera generación, eritromicina y aminoglucósidos.⁽¹⁵⁾

Es muy importante la realización del antibiograma. Si es una cepa meticilín-resistente se pueden emplear fluoroquinolonas, rifampicina, teicoplanina o vancomicina.

1.2.2.BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas no toman el colorante de fondo, la violeta genciana, después de ser fijada con lugol (toman solo la safranina); poseen una capa

delgadade peptidoglicano y una segunda membrana llamada membrana externa. Entre esta y la pared celular se encuentra un espacio virtual, el espacio periplásmico. Como constituyente importante de la membrana externa se encuentra el lipopolisacárido (o endotoxina) responsable de muchos de los efecto tóxicos reportados en las infecciones causadas por gérmenes Gram negativos.

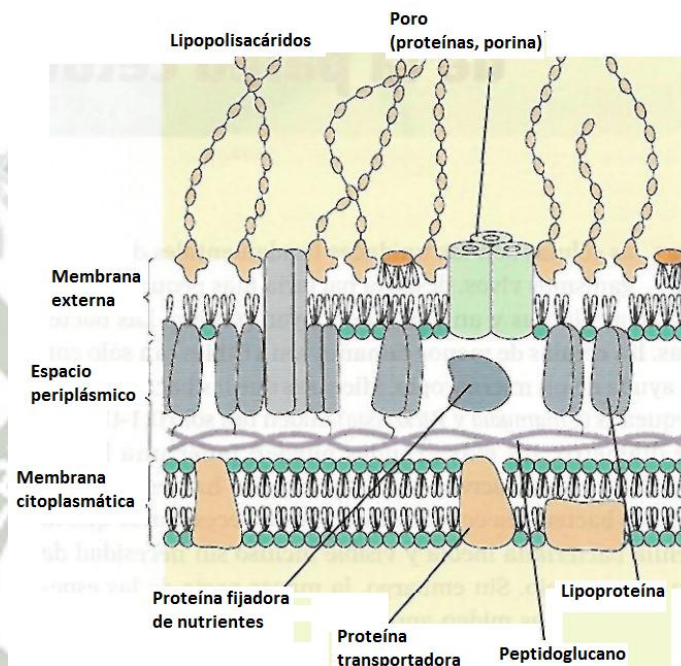


FIGURA Nº5: Estructura externa de una bacteria Gram negativa

Fuente: Microbiología Médica, Cedric Mins y otros. 2011

1.2.2.1 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Forma parte de la flora intestinal normal animales y humanos. Cada gramo de heces humanas contiene hasta 10^8 microorganismos *Escherichia coli*. Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades, incluida la gastroenteritis e infecciones extraintestinales, como las urinarias (ITU), meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (p.ej., *Escherichia coli* O157 es la causa más frecuente de colitis hemorrágica).⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1 Morfología

Se trata de un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo. Fermenta

glucosa, es oxidasa negativa y reduce los nitratos a nitritos. Presenta movilidad por flagelos peritricos. Junto con las demás enterobacterias comparte con las demás bacterias gramnegativas características típicas (citoplasma, ribosomas, membrana celular, pared con su membrana externa y apéndices como flagelos y *pili*). La membrana interna o citoplasmática la constituye una bicapa fosfolipídica. La pared está formada por un peptidoglicano más delgado que el de las bacterias grampositivas, y una membrana externa que contiene proteínas purinas reguladoras de la permeabilidad, y el típico lipopolisacárido de los gramnegativos, formado por una estructura lipídica interna –lípidos A o endotoxina causante del shock séptico-, una zona intermedia mucho más pequeña con un número limitado de 5 a 7 azúcares y una parte externa constituida por el polisacárido con capacidad antigénica –antígeno somático-. Entre la membrana interna y la externa, a ambos lados del peptidoglicano, se encuentra el espacio periplásmico.⁽¹⁵⁾

En agar Mac Conkey forma colonias planas, secas, rosadas con un área circundante de color rosa más oscuro compuesto por sales precipitadas.⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1.2 Determinantes de patogenicidad

Escherichia coli posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, las cepas de *Escherichia* poseen unos factores de virulencia especializados que se pueden clasificar en dos categorías generales; adhesinas y exotoxinas.

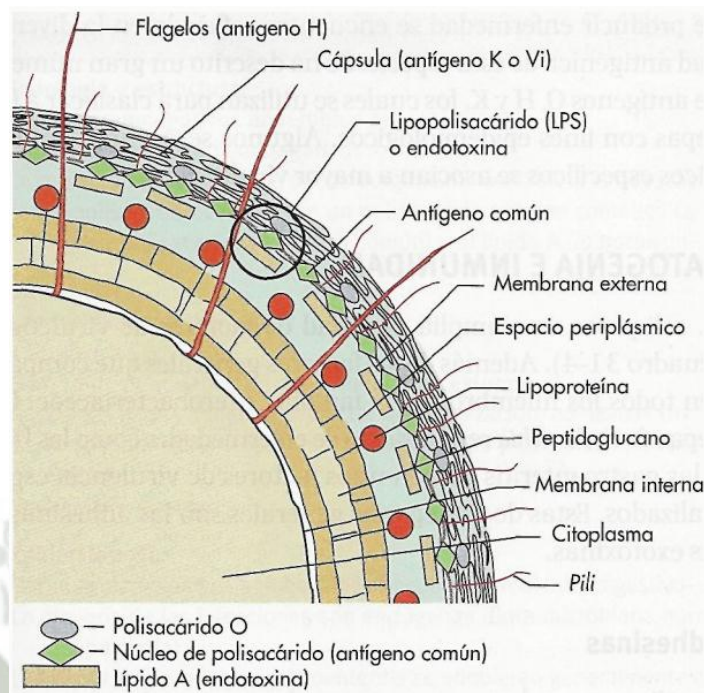


FIGURA Nº6: Estructura antigénica de las enterobacterias

1.2.2.1.1.3 Adhesinas

Escherichia coli es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células en estas localizaciones para evitar ser eliminado por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal. Las cepas de *Escherichia coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas. Estas incluyen factores antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III), fimbrias de adherencia y agregación (AAF/I, AAF/III), pili que forman haces (Bfp), intimina, pili P (que también se une a los antígenos del grupo sanguíneo P), proteína Ipa (antígeno del plásmido de invasión) y fimbrias Dr (que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo Dr).⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1.4 Exotoxinas

Escherichia coli produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT- I y LT-II). Por otra parte, las hemolisinas (HlyA) se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *Escherichia*

*coli*uropatógeno. El mecanismo preciso de funcionamiento de estas toxinas se describe en los siguientes apartados.⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1.5 Patogenia y Manifestaciones clínicas

Escherichia coli es causa frecuente de infecciones oportunistas; sin embargo, algunas cepas de *Escherichia coli* poseen capacidad patógena primaria, pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas sin factores predisponentes.

1.2.2.1.1.6 Infecciones urinarias

Las infecciones urinarias en personas sin factores predisponentes están causadas en su mayor parte por cepas de *Escherichia coli* de determinados serotipos denominados uropatógenos. En la gran mayoría se han detectado adhesinas específicas para la mucosa de las vías urinarias, como los *pili* P y S, con los que colonizan esos territorios a pesar del flujo urinario. Muchas de estas cepas presentan un tiempo de generación muy corto, por lo que se multiplican rápidamente; además, disponen de un lipopolisacárido resistente a la acción lítica del complemento y la presencia de cápsula disminuye su susceptibilidad a la fagocitosis. Esto ha sugerido la teoría de que las infecciones urinarias están causadas por bacterias patógenas. Los serogrupos O2 y O6 de *Escherichia coli* uropatógenas son los aislados con mayor frecuencia en clínica.

Sin embargo, otras evidencias sugieren que sólo se produce infección urinaria cuando existen factores predisponentes locales, aunque éstos pasen desapercibidos – trauma del coito, pequeño residuo vesical, reflujo vesicoureteral discreto, etc. – y *E.coli* sería la bacteria causante de infecciones urinarias con mayor frecuencia simplemente porque es la más abundante en el periné, desde donde invade el tracto urinario, causando en realidad una infección oportunista.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones localizadas en el tracto urinario bajo (cistitis) son polaquiuria, disuria, y raramente febrícula; la orina suele ser turbia. Cuando la infección se hace ascendente (pielonefritis) se asocia a estos síntomas dolor lumbar, fiebre elevada y afectación del estado general.⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1.7 Infecciones intestinales

Existen evidencias epidemiológicas y experimentales con animales y voluntarios humanos, de que algunas cepas de *Escherichia coli* poseen capacidad enteropatógena produciendo enteritis.

Las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* pueden adscribirse a cuatro grupos según el mecanismo patogénico por el que producen la lesión. Se han correlacionado algunos serogrupos de *E.coli* con cada uno de estos grupos de patogenicidad, aunque esta correlación no es absoluta.

- ***E.coli* enteroinvasiva (ECEI).** Algunas cepas de *Escherichia coli* (serogrupos O:112, O:124) poseen potencial enteroinvasor con un mecanismo patogénico a nivel molecular idéntico al de *Shigella*, produciendo lesiones ulceradas en el colon. El cuadro clínico es habitualmente una diarrea febril, inespecífica y benigna, aunque en las formas graves, como también sucede en la disentería por *Shigella*, puede existir sangre y moco en las heces, así como detectarse leucocitos en la misma.⁽¹⁵⁾
- ***Escherichia coli* productora de enterotoxinas citotónicas (ECET).** Existen cepas de *E.coli* (serogrupos O:6, 7, 8, 15, 27, 63, 78, etc.), que producen toxinas causantes de diarrea secretora. Se han detectado dos tipos de toxinas secretoras, una termolábil y otra termoestable, ocasionando ambas un trastorno de la fisiología, sin alteración anatómica, en los enterocitos del epitelio intestinal. Para que produzcan enteritis estas cepas deben expresar además de las toxinas, factores de colonización intestinal como fimbrias. El cuadro clínico se caracteriza por una diarrea con deposiciones líquidas, sin moco ni sangre, que puede variar de moderada a presentar una gravedad semejante al cólera. Estas cepas son frecuentes en países subdesarrollados, siendo causa habitual de diarrea del viajero. En la actualidad, ambas toxinas pueden detectarse por métodos inmunológicos.
- ***Escherichia coli* productora de enterotoxinas citotóxicas (*E.coli* enterohemorrágico: ECEH).** Algunas cepas de *E.coli* (serogrupo O157, O26, etc.), pueden producir una toxina citotóxica para la línea Vero

(verotoxina), diferente de las toxinas citotónicas ya comentadas. En la actualidad, se conoce la existencia de dos verotoxinas VT1 y VT2. Las células precisan además de fimbrias específicas para la adhesión al epitelio como condición de patogenicidad. La enfermedad presenta un periodo de incubación de 3-4 días, se caracteriza por dolor abdominal intenso y diarrea, primero acuosa que puede acompañarse de sangre; el proceso suele ser afebril. Puede complicarse en niños con el síndrome hemolítico-urémico.⁽¹⁵⁾

- ***Escherichia coli* enteropatógena clásica (ECEPc):** No se conoce con exactitud cómo se produce la lesión; posiblemente, engloba subgrupos con mecanismos de patogenicidad diferentes, observándose afectación ultraestructural de las microvellosidades intestinales. La clínica, tras una incubación de 5-10 días, se caracteriza por vómitos y diarreas con heces líquidas con moco, sin sangre. Puede existir fiebre y en los lactantes es posible la deshidratación.⁽¹⁵⁾

1.2.2.1.1.8 Tratamiento

Los antibióticos a utilizar deben ser activos *in vitro* frente a la cepa, y alcanzar concentraciones suficientes en el foco. La capacidad de esta bacteria para adquirir genes de resistencia hace imprescindible la realización de antibiograma.

En las infecciones urinarias la topografía de la infección (cistitis o pielonefritis), junto con otros posibles condicionantes, son fundamentales para la orientación terapéutica. El cotrimoxazol, las quinolonas y los aminoglucósidos, cuando son activos *in vitro*, son clínicamente muy eficaces.

En las enteritis por *Escherichia coli* se ha demostrado la eficacia del tratamiento antibiótico e incluso parece contraindicado en la enteritis hemorrágica. Solamente las formas graves de *Escherichia coli* enteroinvasora se benefician del tratamiento antibiótico.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Del género *Pseudomonas*; *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más ampliamente estudiada en lo que respecta a las infecciones en seres humanos. Aunque este microorganismo es habitante del medio ambiente (suelos, agua, plantas; sobrevive bien en los ambientes domésticos: bañeras, hidromasajes, soluciones para lentes de contacto; y el ámbito hospitalario: sumideros duchas, equipo respiratorio; son algunos ejemplos); rara vez es habitante de la flora normal de los seres humanos, sin embargo, también es un patógeno oportunista muy agresivo.

1.2.2.2.1.1 Morfología

Son bacilos gramnegativos que pueden estar rodeados de una cápsula polisacárida llamada limo. Son móviles por un flagelo polar, monótrico. Las cepas recién aisladas presentan fimbrias (adhsinas) o *pili* sexuales.⁽¹⁵⁾

Se desarrollan en cualquier medio a temperaturas entre 10 y 42°C. Existen tres tipos de colonias: rugosa, lisa y mucoide. Algunas colonias presentan brillo metálico. Producen pigmentos fluorescentes y difusibles como pioverdina o fluoresceína y piocianina. Éste último es característico de *P.aeruginosa*, produciéndolo algo más del 50% de los aislados. Confiere color verde o azul al medio a pH neutro. Otra propiedad característica es el olor dulzón de los cultivos por la producción de 2-aminocetofenona.

1.2.2.2.1.2 Determinantes de patogenicidad

- Adhesinas. Como factores de fijación destacan las fimbrias y la capa de polisacárido. La adherencia requiere una lesión previa. Establecida la colonización la piocianina dificulta la función ciliar y lesiona el epitelio.
- Endotoxina. La lisis de *Pseudomonas* da lugar a la liberación del lípido A con la endotoxina, que interviene en el establecimiento de la infección y en los síndromes asociados a la septicemia. Es causante de fiebre, hipotensión, leucopenia o leucocitosis, oliguria, coagulación intravascular diseminada y distrés respiratorio del adulto. También activa la coagulación, fibrinólisis, quininas y complemento. Estimula la

producción de prostaglandinas y leucotrienos e induce la síntesis y liberación de citocinas.

- Citotoxina. Ataca la membrana de la mayoría de las células eucariotas y tiene efecto letal sobre los polinucleares.⁽¹⁵⁾
- Hemolisinas: Las dos hemolisinas que produce el bacilo piocianico actúan sinérgicamente escindiendo lípidos y lecitinas.⁽¹⁵⁾
- Exotoxina A. Cataliza la transferencia de ADP-ribosa del NAD al factor de elongación 2, inhibiendo la síntesis proteica. Presente tres dominios diferentes, siendo el mayor el que contiene el sitio activo, que se une a las células diana. El dominio 2 colabora en el transporte a través de las membranas y el 3 corresponde al centro catalítico de la enzima.

Una nueva perspectiva de la toxina, es su comportamiento como superantígeno, uniéndose a dos receptores alfa y beta de las células T y el del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, de monocitos y células B produciendo la liberación de citocinas inflamatorias, modulando la respuesta inmune.⁽¹⁵⁾

- Elastasa. Es una metaloenzima que actúa como exopeptidasa. Puede digerir proteínas como la elastina, colágeno, fibrina, inmunoglobulinas IgG e IgA, componentes del complemento y transferrina.
- Exoenzima S. Es capaz de ribolisar-ADP en varias proteínas de membrana eucariotas, reconociendo las mismas secuencias de hidratos de carbono que las células bacterianas de *P.aeruginosa*.
- Sideróforos. *P.aeruginosa* sintetiza dos sideróforos en respuesta a la limitación de hierro: pioquelina y pioverdina.
- Exopolisacárido mucoide (alginato). Está constituido por ácido manurónico y glucurónico en una estructura repetitiva. Se sitúa alrededor de las bacterias fijándolas al medio y protegiéndolas de la fagocitosis, anticuerpos, complemento y antibióticos.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.3 Manifestaciones clínicas

Se presenta en pacientes con sus defensas locales y/o generales disminuidas.

1.2.2.2.1.4 Infección del tracto respiratorio

Las neumonías primarias por *P.aeruginosa* se presentan principalmente en pacientes hospitalizados graves, politraumatizados, con procesos pulmonares crónicos o con fallo cardiaco congestivo. El cuadro clínico suele ser muy grave (30 a 40% de mortalidad) existiendo necrosis alveolar, invasión vascular y frecuentemente bacteriemia.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.5 Infecciones urinarias

Son muy frecuentes, se suelen adquirir en el hospital general, secundarias a exploraciones de las vías urinarias, con una clínica similar a la producida por otras especies bacterianas *P.aeruginosa* es uno de los patógenos que mejor se adhieren al epitelio de la vejiga, pudiendo determinar infecciones ascendentes.

La localización primaria en el tracto urinario es una de las principales fuentes de diseminación hepática, con una producción de bacteriemia.

El catéter desempeña un papel clave en la actividad patogénica de *Pseudomonas*, ya que suele ser el lugar inicial de adherencia y multiplicación, formándose un biofilme, nicho protector y origen de la infección.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.6 Infecciones osteoarticulares

Existen dos mecanismos para afección osteoarticular:

- La diseminación hematógena a partir de un foco primario.
- Propagación por continuidad.

Para lograr la erradicación de *P.aeruginosa* en estas infecciones, el tratamiento debe alcanzar valores bactericidas en sangre y hueso por tiempo prolongado.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.7 Infecciones oculares

Es una de las causas más frecuentes de queratitis bacteriana y, en menor grado, de endoftalmitis, blefaroconjuntivitis, oftalmia *neonaturum*, abscesos esclerales y celulitis orbital.

Dada la escasa vascularización y la limitada respuesta inmunitaria de la córnea, humores vítreo y acuoso las *Pseudomonas* se multiplican produciendo enzimas. Esta queratitis puede conducir a la pérdida de visión, por lo que debe considerarse una urgencia médica.

1.2.2.2.1.8 Infecciones óticas

En el 1-2% de personas sanas *P.aeruginosa* forma parte de la flora comensal del conducto auditivo externo. Produce el 50-70% de otitis externas banales. La otitis maligna invasiva se produce en pacientes diabéticos mayores.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.9 Infecciones cutáneas

P.aeruginosa produce epidemias de exantemas maculopapulosos y vesiculopapulosos en piscinas. La infección por *P.aeruginosa* en enfermos con quemaduras extensas implica un difícil tratamiento y una elevada mortalidad. La hidroterapia puede propiciar la colonización con cepas resistentes que se multiplican con rapidez en las escaras. La posterior invasión de planos subyacentes y la diseminación por el torrente circulatorio puede evolucionar a una septicemia.

Entre las infecciones de la piel se encuentra el ectima gangrenoso descrito en algunos casos de bacteriemia por *P.aeruginosa*, cuyas características son coincidentes con la infección cutánea primaria, necrótica y hemorrágica.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.10 Bacteriemia

En los grandes hospitales la bacteriemia por *P.aeruginosa* alcanza el 14% del total y el 26% de las causadas por bacilos Gram negativos. La mortalidad es elevada.

La clínica suele ser indistinguible de las causas por otros bacilos gram negativos y depende mucho de la localización primaria de la infección. Produce fiebre, taquicardia y taquipnea, también puede haber hipotensión y shock.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.11 Endocarditis

Las endocarditis por *P.aeruginosa* suponen más del 50% de las causadas por bacilos Gram negativos, y la mayoría de las que padecen los usuarios de drogas por vía EV. *P.aeruginosa* posee alta afinidad por el endocardio, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus viridans*. La válvula tricuspíde es la localización prevalente. El cuadro clínico es de evolución subaguda. La endocarditis de aorta y mitral cursan de un modo agudo y fulminante. El diagnóstico se hace por hemocultivo y se completa por cultivo e histopatología de la válvula o muestra obtenida por biopsia.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.12 Infecciones meníngeas

Son poco frecuentes, teniendo mayor importancia las que aparecen tras intervenciones de neurocirugía.

1.2.2.2.1.13 Infecciones gastrointestinales

P.aeruginosa puede infectar el tracto digestivo desde la orofaringe hasta el recto, principalmente en huéspedes inmunodeprimidos. El tubo digestivo constituye una eficiente puerta de entrada para el desarrollo de bacteriemias. Esta situación es especialmente peligrosa en pacientes con cáncer que, tras encontrarse en el ambiente hospitalario, recibir quimioterapia y antibióticos de amplio espectro, son colonizados en su intestino por *P.aeruginosa*.

Los síndromes determinados por esta bacteria no tienen que ser diferenciales ni específicos.⁽¹⁵⁾

1.2.2.2.1.14 Tratamiento

Es recomendable iniciar la terapéutica después de la toma de muestras, y si la situación lo permite con datos microbiológicos confirmados. Es conveniente la vigilancia durante el tratamiento por la posibilidad de aparición de resistencias.

Entre los betalactámicos pueden usarse carboxipenicilinas (ticarcilina sola o asociada a tazobactam), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima), de cuarta (cefepima y cefpirona), monobactam (aztreonam) y carbapenem (imipenem y meropenem). De los aminoglucósidos suelen ser eficaces amikacina, tobramicina, gentamicina y netilmicina.⁽¹⁵⁾

Para conseguir un efecto bactericida rápido se combina un betalactámico con un aminoglucósido.

Para infecciones del tracto urinario las quinolonas han demostrado su actividad *in vitro* y su eficacia clínica, condicionada por el problema de las resistencias.⁽¹⁵⁾

1.3. OBTENCION DE EXTRACTOS

Consiste en poner en contacto la droga con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la droga al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción con disolventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos.⁽²⁰⁾

Para que la extracción con disolventes se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores:

1.3.1. DESECADO:

Para la extracción se debe trabajar con la droga convenientemente desecada conforme los métodos de desecación desarrollados, a excepción de ciertas drogas.

1.3.2. TRITURADO:

Para la elaboración de las sustancias de interés de origen vegetal se requiere además una adecuada trituración de la droga. No es posible la utilización de droga completa debido a su voluminosidad y escasa superficie de contacto con el disolvente. Con la trituración progresiva se incrementa la superficie y con ello, el área de ataque del líquido de extracción. Las drogas pulverizadas presentan una superficie notablemente grande y además en función del grado de pulverización, contiene más o menos un número elevado de células rotas, cuyo contenido puede ser incorporado directamente por el disolvente. No, obstante, tampoco es recomendable una pulverización excesivamente fina de la droga, porque en este caso, tras el proceso de extracción resulta difícil separar el líquido extractivo del residuo inútil, presentándose al final el líquido con cierta turbidez, que repercutirá en la presentación del preparado final, también con una pulverización demasiado fina, se incorporan sustancia lastre (generalmente clorofila).

Lógicamente, la extracción de sustancias activas a partir de drogas, depende de la estructura anatómica de estas últimas. La difusión de medicamentos solo es posible en muy pequeña medida cuando las capas externas de la droga son poco permeables para el agua. Hay que contar con esta circunstancia especialmente en el caso de epidermis vegetales con cutícula gruesa y cubiertas celulares suberosas. Resulta pues imprescindible necesaria la pulverización de drogas tipo leño, cortezas, semillas, raíces, frutos, rizomas. (en este caso es imprescindible, el lavado previo de la droga, siendo el grado de trituración un tanto grosera, similar a granos de azúcar)

La droga troceada (pero nunca en polvo) se somete al grado necesario de trituración, tomando en cuenta siempre la droga de que se esté tratando, en el caso de las hojas, las condiciones de extracción son fáciles de por sí, pues el agente extractivo puede pasar sin dificultades al interior a través de quebraduras y estomas.

1.3.3. PROCESOS FISICOQUÍMICOS A TENER EN CUENTA:

Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias que contiene y que pueden alcanzar el disolvente sin obstáculos. Durante

la trituración de la droga se destruyen muchas células. El número de las células destruidas o al menos machacadas crece linealmente con un grado de finura creciente. Las sustancias contenidas en la droga (que generalmente aparecen en forma cristalina soluble) son lavadas y arrastradas de los fragmentos celulares por el disolvente. Este proceso se denomina *lavado celular* y está restringido a la acción que tiene el disolvente frente a las células rotas durante el proceso de trituración.

De una forma más complicada que el proceso de lavado transcurre el *proceso de difusión celular* o para algunos autores llamado también *proceso de extracción*, para nosotros vamos a llamarlo según la primera denominación y así evitar confusiones terminológicas con la categoría genérica que es la extracción. Durante este proceso el material de la droga seca absorbe primero el disolvente. Como en la mayor parte de las drogas se utilizan mezclas etanol – agua, esta agua hace que la droga se hinche debido al gran aumento de volumen. Ya se había deducido que la membrana plasmática se había vuelto permeable debido al desecado y otras influencias. El líquido de extracción puede por tanto penetrar sin problemas en las células intactas. Cuanto más grosero sea el polvo tanto más preponderante será el proceso de difusión celular. En la célula el líquido de extracción hace que se disuelvan las sustancias activas que almacena. Las células completas contienen entonces soluciones concentradas de sustancias activas. Estas se encuentran separadas de los disolventes restantes mediante una pared permeable. Entre el disolvente cargado de sustancias activas dentro de las células y el disolvente que los rodea existe un mayor o menor gradiente de concentración. Como consecuencia de la difusión, este gradiente se equilibra en el transcurso del tiempo. La permeabilidad de la pared celular garantiza que incluso las sustancias coloidales pasen al extracto. El tiempo necesario para el equilibrio de concentraciones es parcialmente dependiente del tipo de droga (hojas o raíces) y del grado de trituración. La extracción termina cuando se produce el equilibrio de concentraciones. Para poder obtener buenos rendimientos es de gran importancia que el gradiente de concentraciones se mantenga alto tomando las medidas adecuadas. La posibilidad más fácil para el mantenimiento de la diferencia de concentración entre el líquido interior y exterior al material a extraer es la agitación. Este método naturalmente puede no conducir a la extracción total. Mejores resultados se obtiene mediante múltiples o continuas

renovaciones del líquido de extracción. Mediante suficiente empleo de disolvente puede conseguirse por este procedimiento una extracción casi total.

Ambos procesos el proceso de lavado y el proceso de difusión celular, se realizan casi simultáneamente en cada extracción. El proceso de difusión transcurre sin embargo más despacio que el de lavado.

1.3.4.NATURALEZA DEL DISOLVENTE:

Principalmente se utilizan en las extracciones agua y las mezclas hidroalcohólicas (agua y alcohol etílico) en proporción variable. También es posible utilizar otros disolventes orgánicos como acetona, éter etílico (poco usado actualmente), hexano, propilenglicol (muy usado en cosmética), etc. El agua es un buen disolvente de muchos principios activos de las drogas pero por esta misma razón resulta generalmente poco selectivo. Además muchos principios activos se hidrolizan en agua

Por otra parte, los extractos acuosos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados y deben ser obtenidos para su utilización en un periodo de tiempo relativamente corto. Utilizar mezclas variables de agua y alcohol permite seleccionar las sustancias que se desea extraer.

En investigación fitoquímica sobre todo; es factible el uso de extracciones sucesivas variando los disolventes y con ello se consigue separar los principios activos de las sustancias de interés farmacológico así como separar los principios activos entre sí.⁽²⁰⁾

1.3.5.TEMPERATURA:

El aumento de la temperatura favorece la extracción de principios activos de las drogas porque aumenta su solubilidad en los disolventes utilizados, pero a su vez puede favorecer la degradación de dichos complejos activos, por lo que es necesario controlarla para conseguir una máxima extracción sin consecuencias indeseables para los principios activos. En ningún caso se pueden utilizar temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles.⁽²⁰⁾

1.3.6. TIEMPO DE CONTACTO ENTRE LA DROGA Y EL DISOLVENTE:

Depende de las características de la droga (dureza, grado de trituración, etc.) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, etc.).

1.3.7. TIPOS DE EXTRACTOS

Son preparados obtenidos por concentración parcial o total de líquidos extractivos, mediante la evaporación del disolvente.⁽²⁰⁾

Los extractos bien preparados por lo general son de color oscuro y de aspecto fino, liso y transparente. Los extractos de color verdoso son preparados a partir de las hojas de una planta, y esa tonalidad se debe a la presencia de clorofila. En los casos de extractos provenientes de flores, son oscuros al comienzo pero luego se van aclarando debido a la oxidación que sufre la clorofila.

Los principales métodos de obtención de extractos son la maceración, percolación y soxhlet, aunque con más frecuencia son utilizados los dos primeros.

La elección del disolvente está en función de la droga y de la solubilidad de los principios activos. Cuando por algún motivo el paciente no pueda recibir extractos o en su caso tinturas alcohólicas (por ejemplo ulcerosos, alcohólicos, niños) se puede reemplazar por extractos de glicerina líquidos. La *glicerina* proporciona un sabor más dulce que la hierba amarga y da una sensación de tibieza en la boca que las hace más aceptables en los niños.

Podemos distinguir diferentes tipos de extractos según la concentración de principio activo respecto a la droga original y según su consistencia.

1.3.7.1 EXTRACTOS FLUIDOS

O extractos propiamente dichos, son preparados líquidos de extracción que se obtienen en la extracción de drogas. Como líquidos de extracción pueden utilizarse mezclas etanol – agua, que pueden contener determinados aditivos, constituyendo los principales métodos de extracción la percolación y la maceración, guardando una relación de extracto droga de 1:1 ó 1:2.

Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire. Son muy usados para obtener formas líquidas (jarabes, gotas, elixires, etc.) ya que se manipulan y dosifican con facilidad.

1.3.7.2 EXTRACTOS BLANDOS

Son preparados altamente viscosos o semisólidos que se obtienen de extractos de drogas por evaporación del líquido de extracción. Solamente se encuentra el extracto espeso de regaliz.

Este tipo de extractos son poco estables y por su consistencia resultan difíciles de manipular, por lo que en la actualidad ya no se usan.

1.3.7.3 EXTRACTOS SECOS

Son preparados pulverulentos, que se preparan de extractos de drogas por evaporación del líquido del extracto, así podemos obtenerlos mediante la eliminación del líquido extractivo o menstruo (generalmente alcohol o mezcla hidroalcohólica), hasta sequedad mediante evaporación continua y controlada, no siendo ello posible sin la utilización de baño maría debido a la inminente carbonización del extracto, para esto se utiliza un equipo eléctrico denominado rotavapor, utilizado en laboratorios dedicados a la investigación fitoquímica. Consiste en un balón en donde se deposita el extracto y este gira continuamente dentro de un baño de agua a velocidad continua y temperatura controlada evitando así el peligro de carbonización del líquido extractivo.

Contienen buena concentración de principios activos y son preparados bastante estables (aunque en muchas ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación que se pueden utilizar incluso para preparar tinturas, extractos fluidos, etc.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

Para la realización de nuestra investigación, se realizó en la provincia de Camaná, el laboratorio de Control de Calidad, laboratorio de Microbiología (H-403) de la Universidad Católica de Santa María y en los laboratorios de microbiología del Consorcio Industrial de Arequipa CIDASA.

2.2. MATERIALES

2.2.1. UNIDADES DE ESTUDIO

2.2.1.1 ESPECIES BOTANICAS

La especie botánica bajo estudio está constituida por las hojas y frutos maduros de *Psidium guajava* L.

2.2.1.2 MICROORGANISMOS

Con el fin de evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y frutos de *Psidium guajava* L. Se utilizaron como microorganismos cepas tipificadas obtenidas del Laboratorio del Consorcio Industrial, cepas correspondientes a las siguientes especies bacterianas:

- Gram positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Gram negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

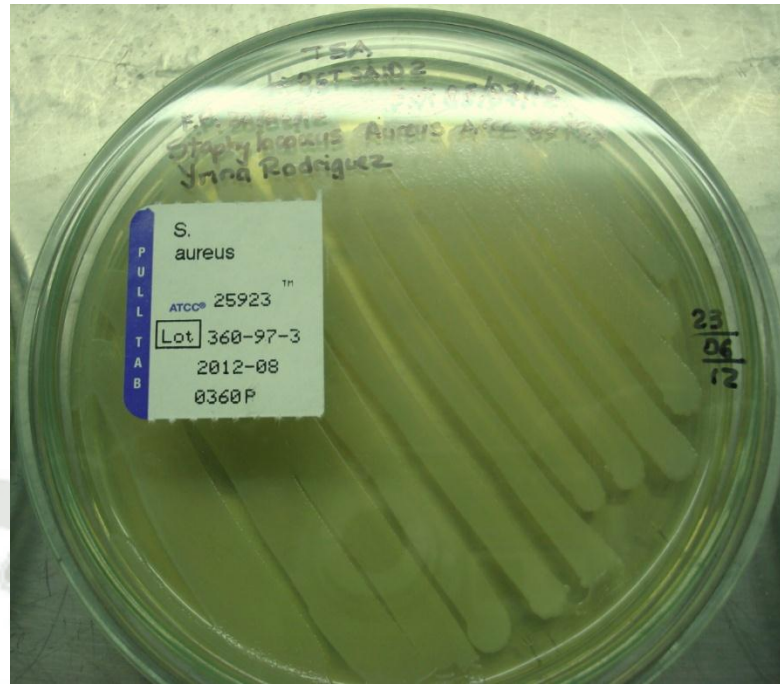


FIGURA N°6: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Fuente: Elaboración propia laboratorio CIDASA



FIGURA N°7: *Escherichia coli* ATCC 25922

Fuente: Elaboración propia laboratorio CIDASA



FIGURA N°8: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Fuente: Elaboración propia laboratorio CIDASA

2.2.2. INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

2.2.2.1 INSTRUMENTAL DE VIDRIO

- Baguetas (BOECO)
- Embudos
- Matraces de vidrio 100, 500 y 1000 ml.
- Placas Petri de vidrio de 100mm x 15mm
- Probeta graduada de: 50 y 100ml (BOECO)
- Tubos de ensayo (PIREX)
- Vasos de precipitado: 50, 100, 250ml (BOECO)

2.2.2.2 EQUIPOS Y APARATOS

- Autoclave. Beltec, LS-B50L
- Balanza analítica. Ohaus, Pioneer.
- Contómetro de colonias. Quebec, CC-1000
- Estufa-esterilizadora. J.P. Selecta, 2000210
- Estufa-incubadura. Fisher Scientific
- Mechero Bunsen
- Micropipeta 100 μ l
- Refrigeradora. Coldex, Autofrost R162
- Rotavapor

2.2.2.3 OTROS ACCESORIOS

- Algodón estéril
- Asa de Kohle
- Cámara fotográfica
- Espátulas
- Gasas estériles.
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes quirúrgicos estériles.
- Lápiz marcador
- Papel filtro rápido
- Papel filtro Whatmann Nro 1 de 1 mm de espesor
- Pera de decantación.

2.2.3.REACTIVOS

- Agua destilada (Delta)

- Alcohol etílico. Delta (USP)

2.2.4.MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey
- Agar Mueller Hinton
- Caldo peptonado

2.3. MÉTODOS

2.3.1.PROCEDIMIENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA PLANTA

2.3.1.1 RECOLECCIÓN

Debido a que es una planta que se practica su cultivo para su comercialización, para la obtención del material biológico (hojas y frutos) de la guayaba, estas se obtuvieron de la provincia de Camaná.



FIGURA N°9: Arbusto de *Psidium guajava* L.

Fuente: Elaboración propia

2.3.1.2 SELECCIÓN

Luego de recolectar el material biológico se procedió a seleccionar las hojas y frutos que se encontraban en buen estado. Para el caso de los frutos se seleccionó al azar algunos ejemplares se observó por su parte externa y luego se

cortó en mitades para apreciar la parte interna. En el caso de las hojas se seleccionó las hojas maduras sin ningún signo de contaminación o infección, eliminando ramas y otros elementos extraños.



FIGURA Nº10: Droga seleccionada de *Psidium guajava* L.

Fuente: Elaboración propia

2.3.1.3 ESTABILIZACIÓN

Con el propósito de inactivar enzimas que pueden provocar un descarrilamiento enzimático afectando la estabilidad de sustancias activas presentes en el fruto, se procedió a la estabilización del material fresco mediante el método de calor seco.

Pero antes de aplicar este método se consideró la naturaleza carnosa del fruto, por lo que previamente se procedió a cortar cada uno en rodajas (filetear) finas de 3mm aproximadamente, una vez logrado los cortes, se colocó las rodajas en un recipiente de vidrio y se introdujo a la estufa, que se atemperó previamente a 90°C, la droga permaneció en su interior durante cinco minutos.

Las hojas por su parte fueron sometidas a estabilización a la misma temperatura que para el caso de los frutos pero durante 3 minutos.

2.3.1.4 DESECACIÓN

El agua de vegetación, favorece no solo la actividad enzimática, sino además promueve el desarrollo de microorganismos; es por ello que se procedió a desecar mediante el método con calor artificial en estufa. Para ello las rodajas de los frutos de la guayaba recientemente estabilizadas, se mantuvieron en estufa durante 5 horas a una temperatura de 60°C. Las hojas en cambio fueron sometidas a 50°C durante 5 horas.



FIGURA N°11: Desecación de hojas de *Psidium guajava* L.

Fuente: Elaboración propia

2.3.1.5 TRITURACIÓN

La trituration se realizó en un molino de platos doméstico (molino de granos marca Corona), a través de triturationes repetidas hasta lograr un grado de trituration moderado y homogéneo. Este material se conservó en envase de vidrio de boca ancha con cierre hermético. Disponiéndose un envase para cada tipo de droga, hojas y frutos.



FIGURA Nº12: Trituración de hojas y fruto de *Psidium guajava* L.

Fuente: Elaboración propia

2.3.2. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.3.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO POR PERCOLACIÓN

2.3.2.1.1.1 *Método*

Método de extracción con disolvente continuo: Percolación

2.3.2.1.1.2 *Disolvente*

Alcohol etílico 96°

2.3.2.1.1.3 *Fundamento*

Este método de extracción se fundamenta en la renovación continua del disolvente, lo que origina un gradiente de concentración muy alta. Este método es útil para drogas que se encuentren secas y trituradas, considerando que el grado de trituración nunca debe ser fino. ⁽¹⁷⁾

El disolvente se deposita en la parte superior del percolador, en un recipiente provisto de un sistema de goteo. Precisamente este sistema de goteo permite un flujo continuo de disolvente, provocando los procesos de lavado y difusión celular. En este tipo extracción influyen el grado de trituración, la velocidad de goteo, la naturaleza de la droga, entre otros.

Antes de llenar el percolador debe humedecerse la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento, a fin de facilitar la penetración del disolvente en las membranas celulares durante la percolación. Si no se realiza este paso previo, la presión de esponjamiento que se desarrollará, puede influir en la velocidad del líquido extractivo incluso puede romper el recipiente. El llenado del percolador requiere ejercer una cierta compresión con la punta de los dedos. Por una parte, no deben quedar espacios libres en el interior de la masa del material, pues dificultan la regularidad del flujo del líquido extractivo, disminuyendo el rendimiento de la extracción; por otra parte, un llenado excesivamente compacto lentifica el paso del líquido o hasta puede impedir su paso.

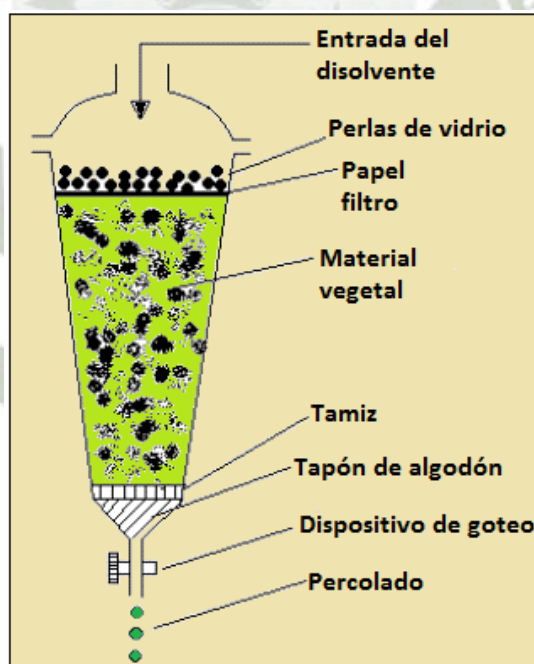


FIGURA Nº13: Equipo de Percolación

Luego de llenar el percolador con la droga humedecida, se abre la llave del recipiente que contiene el líquido extractivo, procediendo a cerrar la llave de salida del percolador, hasta que el líquido extractivo alcance un centímetro por encima del borde superior que ocupa la droga. A partir de este momento se inicia la percolación propiamente dicha, cuya velocidad de goteo se regula en dependencia con la cantidad de droga, de forma que, en la unidad de tiempo, se igualen los goteos de entrada y salida. Al terminar la percolación se exprime la droga y, en su caso, se añade el líquido obtenido al percolado, hasta obtener el líquido extractivo según la concentración determinada que puede ser al 10 o 20%.

Operando en condiciones perfectas, ya sea según las indicaciones prescritas u otras análogas, las primeras porciones del percolado están casi saturadas de principios solubles; en cambio, las últimas porciones están constituidas casi únicamente por el mismo menstuo.

2.3.2.2 PROCEDIMIENTO

Pesar 10 g de droga (hojas o fruto) de *Psidium guajava* previamente estabilizado, desecado y triturado, en un recipiente adecuado con un poco de disolvente se humedece la droga, luego con la droga húmeda cargamos el percolador, cubrimos con papel filtro y perlas de vidrio y procedemos a la extracción. Antes de iniciar la percolación mediante goteo, se suelta disolvente a chorro continuo hasta que cubra al menos 1 cm por sobre la superficie de la droga. Dejar macerar media hora para luego iniciar el goteo del disolvente el que debe ser ajustado de tal modo que recojan 3ml de percolado en 1 minuto. Recibir 100ml de percolado y/o ajustar el volumen para lograr una concentración del 10%.

El percolado logrado, debe envasarse en un recipiente de vidrio color ámbar de cierre hermético, rotular señalando la droga su concentración, volumen total del percolado, disolvente y fecha. Almacenar en lugar fresco y seco, hasta el momento para realizar la concentración del mismo.

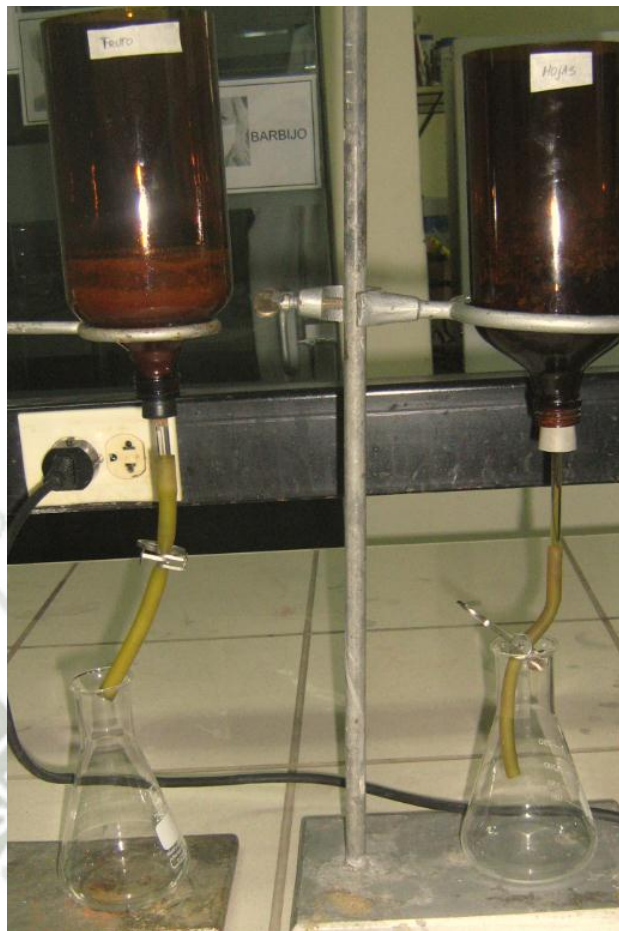


FIGURA Nº14: Percolación del fruto y hojas de *Psidium guajava*

Fuente: Elaboración propia

2.3.2.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

2.3.2.3.1.1 Método

Método de extracción con disolventes continuo: Soxhlet.

2.3.2.3.1.2 Disolvente

Alcohol etílico 96°

2.3.2.3.1.3 Fundamento:

Es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz o ampolla (1), un cuerpo extractor o tubo de extracción (2) y un refrigerante (4).

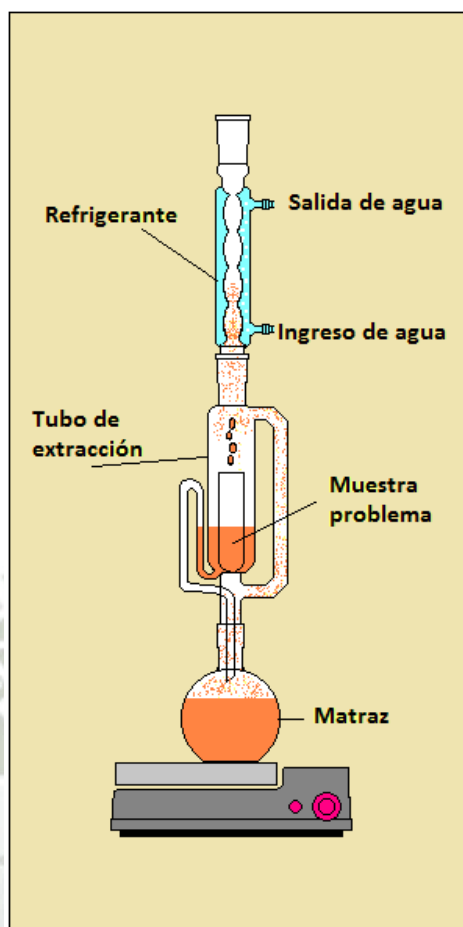


FIGURA N°15: Equipo de extracción Soxhlet

El Soxhlet es un aparato diseñado para realizar una extracción continua pero en la que se reutilice el disolvente. En la ampolla se coloca el disolvente que se calienta con una manta calefactora. En el tubo se coloca la droga triturada en un cartucho de papel filtro. Al calentarse el disolvente (que no debe tener punto de ebullición muy elevado) asciende por el tubo y al llegar al refrigerador condensa y cae sobre la droga. Ésta se va empapando de disolvente hasta que llega al nivel y entonces desciende por el tubo y vuelve a caer en la ampolla para ser reutilizado.

El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en la ampolla inferior.

2.3.2.3.1.4 Procedimiento

Pesar 10g de droga (hojas y fruto) de *Psidium guajava* debidamente estabilizado, desecado y triturado a grado fino; y colocarlo en un papelón de papel

filtro. En el matraz colocar 100ml de alcohol etílico y proceder a la extracción hasta agotamiento del complejo activo presente en la droga.

El extracto conservarlo en recipiente color ámbar de vidrio con un rotulo que indique la cantidad de droga, disolvente, volumen del extracto y fecha. Almacenar en un lugar fresco, seco y alejado de la luz.



FIGURA N°16: Extracción por soxhlet del fruto y hojas de *Psidium guajava*

Fuente: Elaboración propia

2.3.2.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO POR MACERACIÓN

2.3.2.4.1.1 Método

Método de extracción con disolventes discontinuo: Maceración.

2.3.2.4.1.2 Disolvente

Alcohol etílico 96°

2.3.2.4.1.3 Fundamento:

La maceración es el procedimiento más simple de extracción. La droga respetando el grado de trituración prescrito se incorpora al líquido de extracción. El conjunto se conserva protegido contra la luz solar directa (para evitar las posibles

reacciones o alteraciones de color catalizadas por la luz) y se agita repetidamente. El tiempo de maceración es diverso; las distintas farmacopeas recomiendan tiempos de maceración que oscilan entre 4 a 10 días. Unos 5 a 7 días son recomendables para la ocurrencia de los procesos anteriormente mencionados (proceso de lavado celular y proceso de difusión celular). Para sacar el máximo provecho a estos procesos es indispensable la agitación repetida del conjunto (varias veces al día). Actuando así se garantiza la rápida compensación de concentración de las sustancias extractivas en el líquido. El estado de reposo durante la maceración implica una sensible disminución de la difusión de sustancias activas. Teóricamente, en la maceración no es posible el agotamiento de las sustancias, o sea, su extracción absoluta. Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento. Después de la maceración se filtra o cuela el conjunto (generalmente un colador de tela limpio), exprimiendo el residuo. Con este fin algunos laboratorios utilizan prensas especiales para extraer eficientemente el líquido extractivo.

La maceración se utiliza cuando los principios activos son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable (hojas, flores poco compactas). Es útil principalmente para la extracción de principios termolábiles, ya que se trabaja a temperatura ambiente.



FIGURA N°17: Procedimiento de maceración

Fuente: Elaboración propia

2.3.2.4.1.4 Procedimiento

Pesar 10g de droga (hojas o fruto) de *Psidium guajava* debidamente estabilizado, desecado y triturado a grado fino; e introducir en un recipiente de capacidad suficiente, boca ancha y cierre hermético. Añadir 100ml de disolvente, cerrar y agitar vigorosamente. Dejar este sistema de extracción durante 7 días con agitaciones esporádicas durante este periodo, conservándolo en un lugar lejos de la luz, fresco y seco. Transcurrido este tiempo filtrar y de ser necesario completar con disolvente hasta 100ml.

2.3.2.5 CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La concentración tiene como objetivo eliminar el disolvente de los extractos de *Psidium guajava*, para concentrar los componentes del complejo activo.

2.3.2.5.1.1 Procedimiento

Colocar los extractos (percolado, macerado y soxhlico) en el balón del rotavapor, y concentrar a 80°C, hasta sequedad.



FIGURA N°18: Concentración de extractos mediante rotavapor

Fuente: Elaboración propia

2.3.3.MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *PSIDIUM GUAJAVA*

2.3.3.1 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA LOS DIFERENTES EXTRACTOS

Esta prueba tiene como objetivo evaluar la sensibilidad antimicrobiana de los diferentes extractos etanólicos sobre cepas en estudio de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853).

2.3.3.1.1.1 Método 1

Excavación-Placa

2.3.3.1.1.2 Fundamento

Este método se basa en que la sustancia a investigar depositada en la excavación toma contacto con la superficie del agar de tal manera que difunde hacia el medio circundante, a medida que aumenta la distancia a la excavación hay una reducción logarítmica de la concentración de la sustancia hasta alcanzar un punto en el que el desarrollo microbiano de la superficie del agar ya no es inhibido, la actividad de la sustancia se evalúa midiendo el halo de inhibición formado.

2.3.3.1.1.3 Procedimiento

2.3.3.1.1.4 Preparación del inóculo

- Seleccionar 4-5 colonias de un cultivo en placa de las bacterias en estudio; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853).
- Depositar en 3 tubos (un tubo por tipo bacteriano) 5 ml de caldo peptonado estéril.
- Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transferirlo al tubo que contiene 5ml de caldo peptonado.

- La turbidez del tubo debe corresponder a la del tubo N°5 de la Escala de Mac Farland (para realizar este paso correctamente, se debe usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste), la misma que equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml, luego realizar una dilución al 1/100 de éste inóculo (0.2ml del inóculo en 19,8ml en caldo peptonado). Así obtendremos un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.

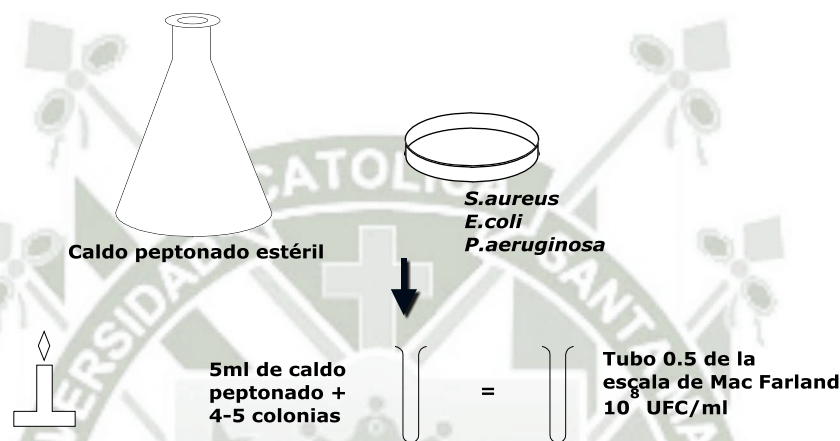


FIGURA N°20: Esquema de sensibilidad antimicrobiana

2.3.3.1.1.5 Disolución de los extractos secos

Pesar en ambiente aséptico 200mg de extracto seco de frutos y hojas de *Psidium guajava*, y completar con el disolvente del extracto: alcohol hasta 1ml.

2.3.3.1.1.6 Siembra del inóculo

- Preparar Agar Mueller Hinton y Agar Mac Conkey en cantidad suficiente para el sembrado de todas las muestras de estudio (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853)).
- Autoclavar y colocar 20ml de este agar (4mm de altura), una vez que ha adquirido consistencia, utilizar un hisopo de algodón de brazo largo estéril, sumergiendo este hisopo en el inóculo y eliminar el exceso

presionándolo sobre la pared interna del tubo que lo contiene y por encima del nivel del caldo de cultivo.

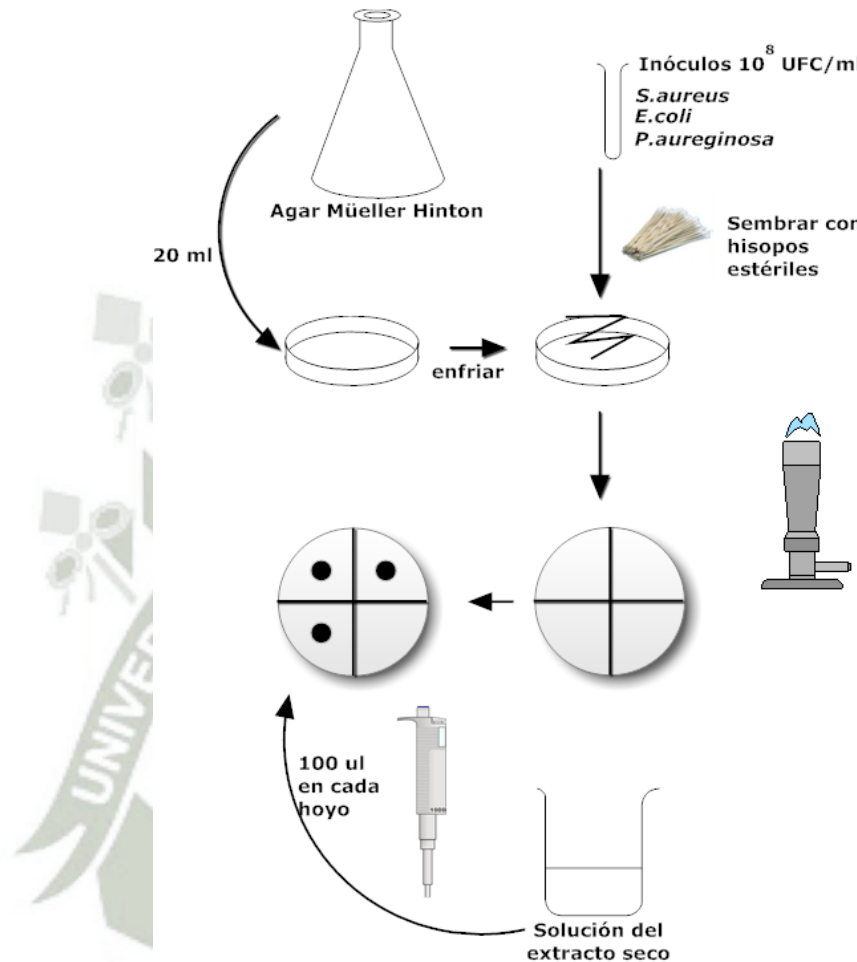


FIGURA N°21: Esquema de sensibilidad antimicrobiana

- Inocular la superficie de la placa de agar Müller-Hinton y Agar Mac Conkey según corresponda con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones, por último pasar por el reborde de la placa, dejar secar 5 minutos.
- Con la ayuda de un lápiz marcador dividir la placa en 4 porciones. Luego a través de un tubo estéril con una boca de 5mm de diámetro, realizar 3 hoyos en tres de las porciones de la placa, la cuarta dejarla como control.

- Depositar en cada uno de los tres hoyos, 100 μ l, de la solución de extracto, dejar secar las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos, para que se inicie la difusión de los extractos.
- Luego del secado dejar incubar en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
- Pasado este periodo, realizar las mediciones de los halos de inhibición.

2.3.3.1.1.7 Método 2

Disco – placa – cultivo.

2.3.3.1.1.8 Fundamento

Este método se fundamenta la inhibición del crecimiento bacteriano, debido a la difusión de la sustancia en estudio presente en un soporte constituido por papel filtro Whatmann, desde el cual difunde a los medios de cultivo.

2.3.3.1.1.9 Procedimiento

2.3.3.1.1.10 Preparación del inóculo

- Seleccionar 4-5 colonias de un cultivo en placa de las bacterias en estudio (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853)).
- Depositar en 3 tubos (un tubo por tipo bacteriano) 5 ml de caldo peptonado estéril.
- Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transferirlo al tubo que contiene 5ml de caldo peptonado.
- La turbidez del tubo debe corresponder a la del tubo N°5 de la Escala de Mac Farland (para realizar este paso correctamente, se debe usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste), la misma que equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml, luego realizar una dilución al 1/100 de éste inóculo (0.2ml del

inóculo en 19,8ml en caldo peptonado). Así obtendremos un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.

2.3.3.1.1.11 Disolución de los extractos secos

Pesar en ambiente aséptico 200mg de extracto seco de frutos y hojas de *Psidium guajava*, y completar con el disolvente del extracto hasta 1ml.

2.3.3.1.1.12 Siembra del inóculo

- Preparar Agar Mueller Hinton y Agar Mac Conkey en cantidad suficiente para el sembrado de todas las muestras de estudio (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853)).
- Autoclavar y colocar 20ml de este agar (4mm de altura), una vez que ha adquirido consistencia, utilizar un hisopo de algodón de brazo largo estéril, sumergiendo este hisopo en el inóculo y eliminar el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo que lo contiene y por encima del nivel del caldo de cultivo.
- Inocular la superficie de la placa de agar Müller-Hinton y Agar Mac Conkey según corresponda con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones, por último pasar por el reborde de la placa, dejar secar 5 minutos.
- Empapar los discos de papel filtro con las diluciones del extracto seco según el cuadro de concentraciones y colocar cada disco en la superficie de cada placa.
- Dejar incubar en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
- Pasado este periodo, realizar las mediciones de los halos de inhibición.

2.3.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

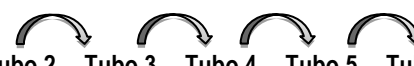
La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la menor concentración de una sustancia antimicrobiana capaz de *inhibir* el crecimiento de una cepa bacteriana dada. Para la realización de esta prueba se trabajó con el extracto etanólico, obtenido mediante maceración de hojas, ya que fueron estos extractos con los que se apreció sensibilidad.

2.3.3.2.1.1 Método

Dilución en tubo.

2.3.3.2.1.2 Procedimiento

- Se prepara el inóculo de *S.aureustomando* de 4-5 colonias de las placas, se inoculan en 5ml de caldo peptonado estéril, enjuagando bien en el líquido, a fin de retirar todo el material adherido en el asa.
- La turbidez del tubo debe corresponder a la del tubo N°5 de la Escala de Mac Farland, la misma que equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml, luego realizar una dilución al 1/100 de éste inóculo (0.2ml del inóculo en 19,8ml en caldo peptonado). Así obtendremos un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.
- Preparar una solución estéril de caldo peptonado y añadir a cada tubo conforme el siguiente cuadro de concentraciones. Realizar por triplicado por cada concentración. Luego añadir el extracto y homogenizar mediante agitación.

Descripción						
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Extracto seco 200mg/ml	1	1	1	1	1	-
Caldo peptonado ml	---	1	1	1	1	1
Volumen	1	1	1	1	1	1
Concentración (mg/ml)	200	100	50	25	12.5	6.25
Inóculo 10 ⁶ UFC/ml	1	1	1	1	1	1-
Volumen final	2	2	2	2	2	2
Concentración final 200mg/ml	100	50	25	12.5	6.25	3.125

Fuente: Elaboración propia

- Luego añadir 1ml del inóculo y mezclar.
- Incubar los tubos a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo observar la turbidez de los tubos. Los tubos turbios indican que el desarrollo bacteriano no ha sido inhibido, por el contrario los tubos claros evidencian inhibición del crecimiento de las bacterias (observar cuadro N° 10).

2.3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

En este método se preparan diluciones del antimicrobiano a variadas concentraciones utilizando un medio de cultivo adecuado, posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación se realiza un subcultivo de los medios sembrados previamente y puede determinarse así la actividad bactericida.

2.3.3.3.1.1 *Método*

Dilución en caldo.

2.3.3.3.1.2 Procedimiento

2.3.3.3.1.3 Preparación del inóculo

- Con un asa de Kolle estéril se procede a tocar la superficie de 4 a 5 colonias de la muestra.
- Posteriormente sumergir el asa de Kolle en caldo peptonado, se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa.
- La turbidez del tubo debe corresponder a la del tubo N°5 de la Escala de Mac Farland, la misma que equivale a una concentración de 10^8 UFC/ml, luego realizar una dilución al 1/100 de éste inóculo (0.2ml del inóculo en 19,8ml en caldo peptonado). Así obtendremos un inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/ml.

2.3.3.3.1.4 Preparación de las diluciones del extracto de guayaba en caldo

- El extracto de hojas de guayaba se disuelve a distintas concentraciones en caldo peptonado conforme al siguiente cuadro de concentraciones.

Descripción	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Extracto seco 200mg/ml	1	1	1	1	1	-
Caldo peptonado ml	---	1	1	1	1	1
Volumen	1	1	1	1	1	1
Concentración (mg/ml)	200	100	50	25	12.5	6.25
Inóculo 10^6 UFC/ml	1	1	1	1	1	1-
Volumen final	2	2	2	2	2	2
Concentración final 200mg/ml	100	50	25	12.5	6.25	3.125

Fuente: Elaboración propia

- Añadir 1ml del inóculo a cada tubo.
- Luego se incuba por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C .

- Finalmente se realiza un subcultivo de las diluciones que no mostraron turbidez, para determinar la concentración bactericida; incubando durante 24 horas a 37°C en Agar Tripticasa soya (TSA).

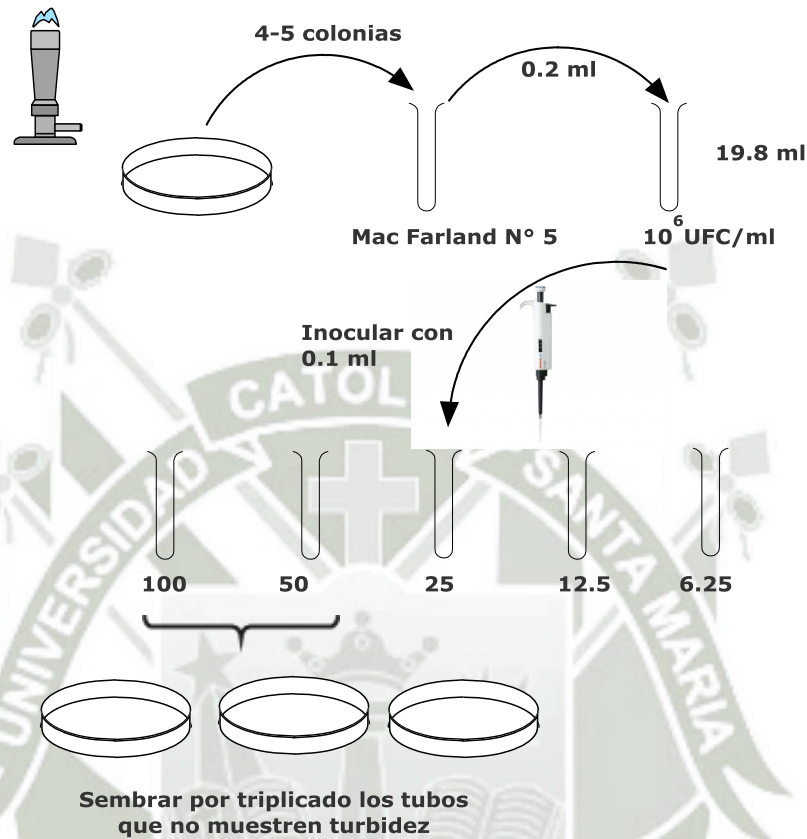


FIGURA N°22: Esquema de concentración bactericida mínima (CBM)

2.3.4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estimarán los siguientes estadísticos:

2.3.4.1 MEDIA

La media se calcula sumando todas las observaciones de un conjunto de datos y dividiendo entre el total de mediciones, se expresa como sigue:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2.3.4.2 VARIANZA

La varianza cuantifica la cantidad de variabilidad, o dispersión, alrededor de la media de las mediciones. Más explícitamente, la varianza se calcula restando la media de un conjunto de valores de cada una de las observaciones, después se elevan al cuadrado estas desviaciones, y se suman y dividen entre la cantidad de observaciones del conjunto de datos menos 1. Al representar la varianza por s^2 ,

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

2.3.4.3 DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar de un conjunto de datos es la raíz cuadrada de la varianza.

$$s = \sqrt{s^2}$$

2.3.4.4 ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza de un criterio (ANOVA de un criterio) es una metodología para analizar la variación entre muestras y la variación al interior de las mismas con varianzas, en lugar de rangos. Como tal, es un método estadístico útil para comparar dos o más medias poblacionales. El ANOVA de un criterio nos permite poner a prueba hipótesis, tales como:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

H_1 = al menos dos medias poblacionales son diferentes

El estadístico F para ANOVA con un criterio es el siguiente:

$$F = \frac{s_b^2}{s_w^2}$$

s_b^2 = estimación de la varianza entre muestras

s_w^2 = estimación de la varianza al interior de las muestras.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS POR LOS DIFERENTES METODOS DE EXTRACCIÓN: MACERACIÓN, PERCOLACIÓN Y SOXHLET

Se obtuvo los extractos etanólicos mediante los métodos de extracción: maceración, percolación y soxhlet; tanto para el fruto y hojas de *Psidium guajava*. Todos los extractos fueron concentrados mediante rotavapor.

Luego fueron envasados en sus correspondientes frascos de vidrio, con cierre hermético y rotulados. Reservándose cantidades suficientes para la evaluación del efecto antibacteriano.

CUADRO N°1
CARACTERES ORGANOLÉPTICOS DE LOS EXTRACTOS

Droga	Tipo de extracto	Organolepsia			
		Color	Aspecto	Olor	Sabor
Hojas	Percolación	Verde oscuro	Límpido	Característico	Amargo
	Soxhlet	Verde muy oscuro	Límpido	Característico	Amargo
	Maceración	Verde oscuro	Lig. Turbio	Característico	Amargo
Fruto	Percolación	Amarillo claro	túrbido	Característico	Lig. amargo
	Soxhlet	Verde oliva claro	túrbido	Característico	Lig. amargo
	Maceración	Amarillo claro	túrbido	Característico	Lig. amargo

Fuente: Elaboración propia

FIGURA N°24: Extractos de hojas y frutos de guayaba



Fuente: Elaboración propia

3.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS EXTRACTOS

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a la sensibilidad de la bacteria Gram positiva y Gram negativas a los distintos extractos de *Psidium guajava* por el método hoyo placa. Notaremos en el cuadro siguiente, que

se mostró sensibilidad solo al extracto etanólico obtenido mediante maceración de las hojas.

CUADRO N°2
SENSIBILIDAD A LOS DISTINTOS EXTRACTOS DE *PSIDIUM GUAJAVA*
POR EL MÉTODO HOYO-PLACA

Droga	Tipo de extracto	Repetición	Concentración 200 mg/ml		
			<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hojas	Percolación	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Soxhlet	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Maceración	1	Resistente	Resistente	19.0
		2	Resistente	Resistente	18.0
		3	Resistente	Resistente	23.0
Fruto	Percolación	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Soxhlet	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Maceración	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente

Fuente: Elaboración propia

Luego de observar el cuadro Nro 2 correspondiente a la prueba de sensibilidad de las distintas cepas bacterianas y a los extractos tanto del fruto y las hojas de *Psidium guajava* por el método hoyo-placa; concluimos que, de ambas drogas evaluadas solo las hojas muestran actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, y dentro de los tipos de extracto, muestran actividad antibacteriana frente a dicha bacteria, los extractos obtenidos mediante el método de maceración a una concentración de 200mg/ml.

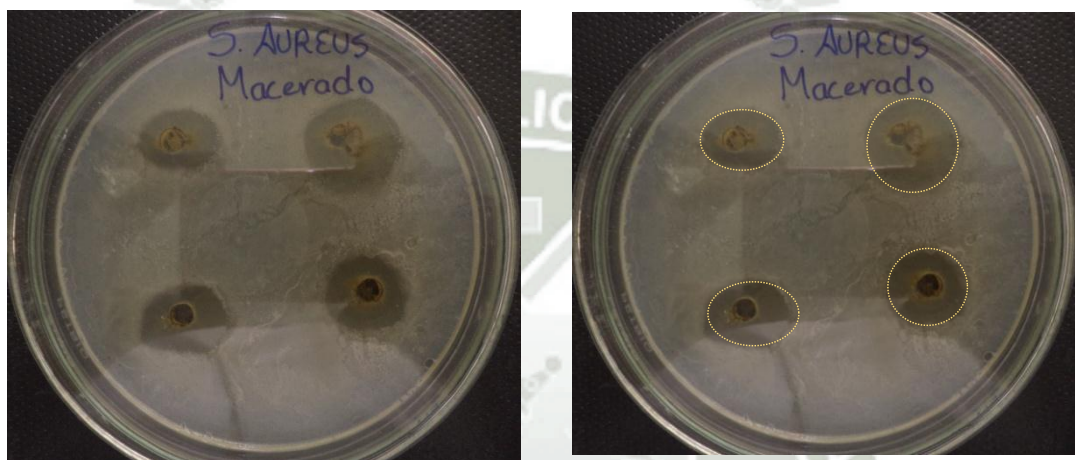


FIGURA N° 25 y 26: Inhibición al 200 mg/ml (Maceración)

Fuente: Elaboración propia

CUADRO N°3

**SENSIBILIDAD A LOS DISTINTOS EXTRACTOS DE *PSIDIUM GUAJAVA*
POR EL MÉTODO DISCO-PLACA**

Droga	Tipo de extracto	Repetición	Concentración 200 mg/ml		
			<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hojas	Percolación	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Soxhlet	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Maceración	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
Fruto	Percolación	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Soxhlet	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente
	Maceración	1	Resistente	Resistente	Resistente
		2	Resistente	Resistente	Resistente
		3	Resistente	Resistente	Resistente

Fuente: Elaboración propia

Según el cuadro 3, que muestra los resultados de la sensibilidad de las bacterias a los extractos bajo estudio, tanto de frutos y hojas de guayaba por el método disco-placa, no se observa sensibilidad alguna mediante este método.

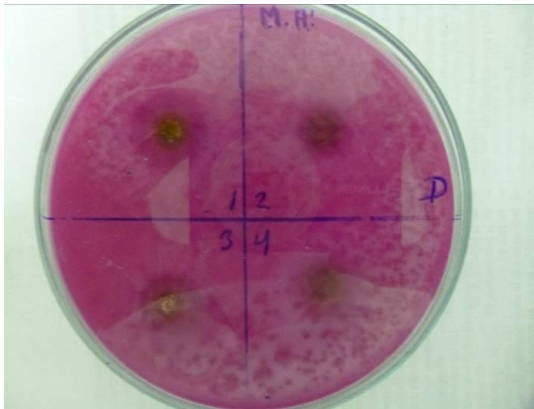


FIGURA N° 27: Resistencia de E.coli mediante método hoyo placa y disco (D en la figura) con extracto de hojas de guayaba (macerado)

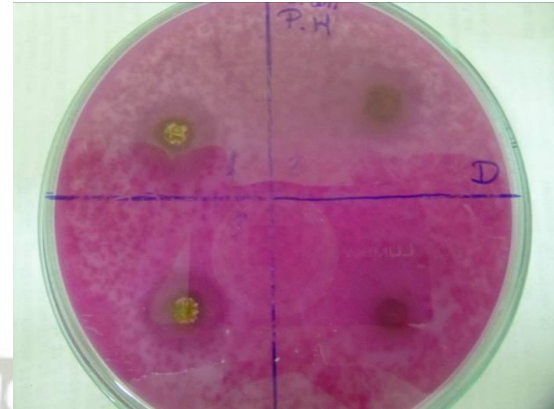


FIGURA N° 28: Resistencia de E.coli mediante método hoyo placa y disco (D en la figura) con extracto de hojas de guayaba (percolado)

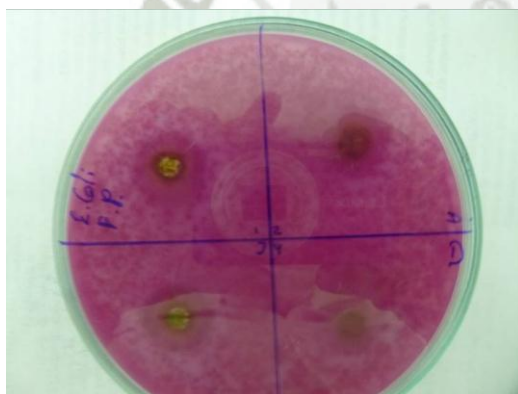


FIGURA N° 29: Resistencia de E.coli mediante método hoyo placa y disco (D en la figura) con extracto de frutos de guayaba (percolado)

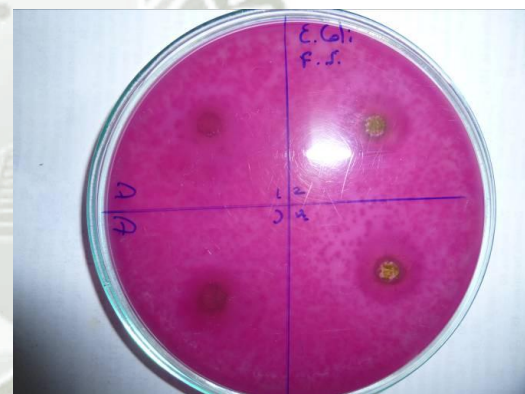


FIGURA N° 30: Resistencia de E.coli mediante método hoyo placa y disco (D en la figura) con extracto de frutos de guayaba (Soxhlet)

Fuente: Elaboración propia

3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Luego de evaluar la sensibilidad, se determinó la concentración mínima inhibitoria del macerado de las hojas de *Psidium guajava* L. frente a *Staphylococcus aureus*, utilizando el método descrito en el capítulo anterior. Se consideró la concentración hallada en la prueba de sensibilidad que fue de 200mg/ml, por lo que se ensayó concentraciones inferiores a esta concentración y fueron a partir de 100mg/ml.

CUADRO N°4

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL MACERADO DE LAS
HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE CULTIVOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923

Rep.	Concentración mg/ml				
	100	50	25	12.5	6.25
1	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
2	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
3	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente

Fuente: Elaboración propia

El cuadro N°4, confirma la prueba de sensibilidad realizada anteriormente, y establece la concentración mínima inhibitoria para el extracto etanólico (obtenido por el método de maceración) de hojas de *Psidium guajava* en 50mg/ml.

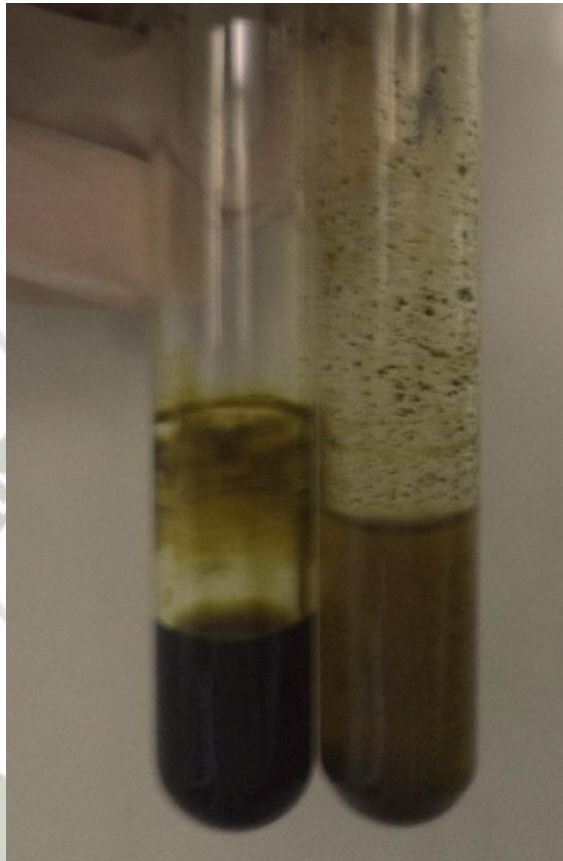


FIGURA N°31: Tubo sin turbidez (izq) a 50mg/ml de extracto de guayaba y tubo con turbidez (der) a 25mg/ml de extracto de hojas de guayaba (maceración)

Fuente: Elaboración propia

3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA

CUADRO N°5

CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL MACERADO DE LAS HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE CULTIVOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923

Repetición	Concentración mg/ml				
	100	50	25	12.5	6.25
1	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
2	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
3	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

Fuente: Elaboración propia

La concentración bactericida mínima mediante el método dilución en caldo tanto, para el macerado de las hojas de *Psidium guajava* se estableció en 100mg/ml de extracto seco.

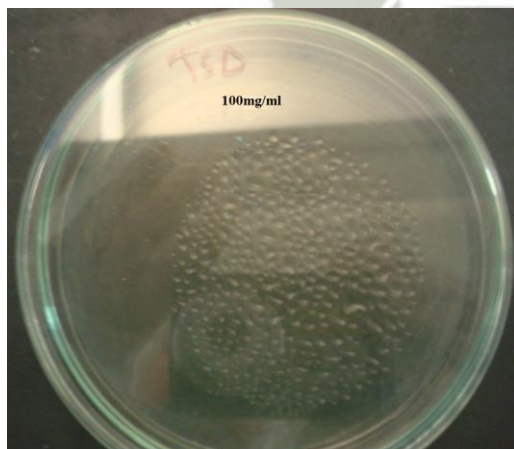


FIGURA N°32: CBM a 100 mg/ml

Fuente: Elaboración propia

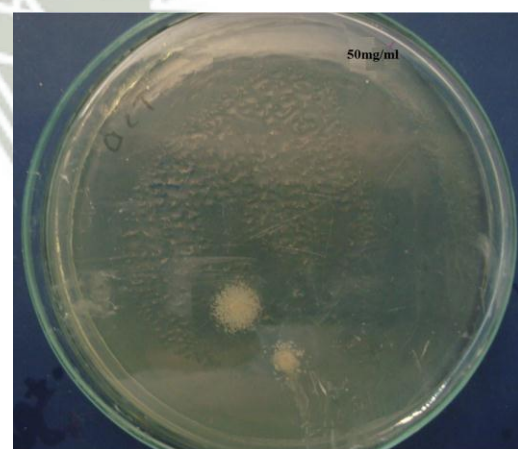


FIGURA N°33: CBM a 50mg/ml

3.5. DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CMI Y CBM, MEDIANTE EL MÉTODO HOYO PLACA

CUADRO N°6

HALOS DE INHIBICIÓN DEL MACERADO DE HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923

Repetición	Halos de inhibición (mm)	
	50 mg/ml (CMI)	100 mg/ml (CBM)
1	10.0	19.0
2	13.0	17.0
3	14.0	18.0
4	16.0	22.0
Media	13.25	19.0
Desviación típica	2.5	2.16

Fuente: Elaboración propia

CUADRO N°7

ANOVA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL MACERADO DE HOJAS DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923

	Suma de cuadrados	Gl Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	66,125	1	66,125	12,115	,013
Intra-grupos	32,750	6	5,458		
Total	98,875	7			

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°6 se observa que como media del halo de inhibición a 50mg/ml que es la concentración mínima inhibitoria del extracto de las hojas de guayaba es de 13.25 mm; y la media del halo de inhibición a 100mg/ml es la concentración bactericida mínima del mismo extracto obtenido mediante maceración es 19.0mm. Es necesario realizar un análisis de varianza (ANOVA) a ambas medidas para rechazar la hipótesis de nulidad que asume que ambas no difieren entre sí, es decir son iguales.

El cuadro N°7 muestra el ANOVA para los halos de inhibición del extracto de *Psidium guajava*, obtenido mediante maceración a 50 y 100mg/ml (CMI y CBM respectivamente), como Sig=0.010, y este es menor a 0.005 entonces se acepta la hipótesis de investigación que asume que los grupos estadísticamente difieren entre sí, y se rechaza la hipótesis nula que interpreta que los grupos se parecen. En conclusión, los halos de inhibición en tanto medias y varianzas del extracto obtenido por maceración a 50mg/ml es estadísticamente diferente respecto a la concentración de 100mg/ml; es decir, que la medida de la concentración mínima inhibitoria es estadísticamente diferente a la de la concentración bactericida mínima, se trata por tanto de dos concentraciones con eficacias claramente distintas.



FIGURA N°34: Halos de la CBM a 100 mg/ml

Fuente: Elaboración propia

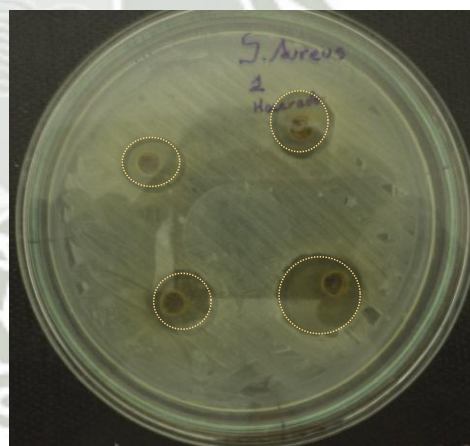


FIGURA N°35: Halos de la CIM a 50mg/ml

CONCLUSIONES

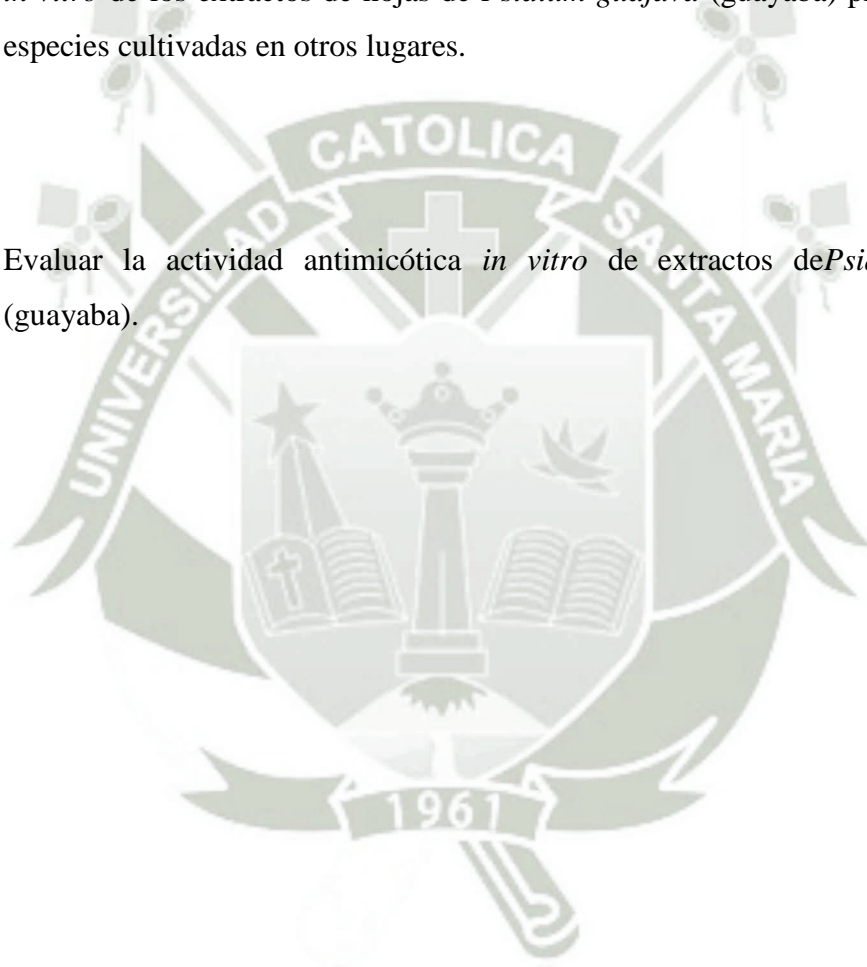
- 1°. Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de frutos y hojas de *Psidium guajava* L.(guayaba) frente a microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), siendo el de mayor actividad antibacteriana el extracto de las hojas a 100mg/ml obtenido mediante maceración.
- 2°. Para la obtención de extractos de hojas y fruto de *Psidium guajava* L, se desarrollaron tres métodos extractivos con disolventes: maceración, percolación y mediante equipo Soxhlet.
- 3°. Mediante el método excavación-placa-cultivo sólo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) mostró sensibilidad frente al extracto de las hojas de *Psidium guajava* obtenido mediante maceración. El fruto de *Psidium guajava* no presenta acción antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853).
- 4°. La cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto seco de las hojas de *Psidium guajava* obtenido mediante maceración de 50mg/ml; y la concentración mínima bactericida (CMB) de 100mg/ml.
- 5°. Luego de realizar pruebas de hipótesis (ANOVA y test de TUKEY) se determinó que el extracto seco a 100mg/ml de hojas de *Psidium guajava* obtenido mediante maceración fue el que presentó mayor actividad antibacteriana frente al extracto de hojas de *Psidium guajava* obtenido por maceración a 50mg/ml

SUGERENCIAS

- 1°. Determinar la seguridad del extracto seco de las hojas de *Psidium guajava* (guayaba), calculando la dosis letal media en animales de experimentación.

- 2°. Se sugiere determinar los factores que influyen sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas de *Psidium guajava* (guayaba) provenientes de especies cultivadas en otros lugares.

- 3°. Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* de extractos de *Psidium guajava* (guayaba).



BIBLIOGRAFÍA

1. Aldave Pajares Augusto; Mostacero León José: BOTÁNICA FARMACÉUTICA. 1ª Edición. 1988. Editorial Libertad. Lima, Perú.
2. Alonso Jorge: TRATADO DE FITOMEDICINA BASES CLÍNICAS Y FARMACOLÓGICAS. 1ª Edición. 2004. Editorial ISIS. Argentina.
3. Añanca Cotrado E.: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE VAINAS DE *CAESALPINIA SPINOSA* (TARA) EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *STREPTOCOCCUS PYOGENES*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica. Tacna, Perú. 2009.
4. Ashutosh Kar: PHARMACEUTICAL MICROBIOLOGY. 1ª Edition, 2008. Published by New Age International.
5. Brack Egg Antonio: DICCIONARIO ENCICLOPÉDICO DE PLANTAS ÚTILES DEL PERÚ. 1ª Edición. 1999.
6. Bravo Díaz Luis: FARMACOGNOSIA. 1ª Edición. 2003. Editorial Elsevier. Madrid, España.
7. Bruneton J.: FARMACOGNOSIA FITOQUÍMICA PLANTAS MEDICINALES. 2ª Edición. 2001. Editorial Acribia S.A.
8. Castro Zurita V.; Marcilla Truyenque S.: EFECTO BACTERICIDA Y FUNGICIDA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA *MATRICARIA RECUTITA* (MANZANILLA) FRENTE A MICROORGANISMOS AISLADOS DE LESIONES BUCOFARÍNGEAS. Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2004.
9. Collins C. H. & Lyne P.: MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS. 5ª Edición, 1989. Editorial Acribia, SA. España.
10. Daniel Wayne: BIOESTADÍSTICA, BASE PARA EL ANÁLISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. 4ª Edición, 2007. Editorial Limusa S.A. México.

11. Delgado-Iribarren Alberto y otros: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición, 1994. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.
12. Diaz R. & Gamazo C. & López-Goñi I.: MANUAL PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA. 2ª Edición, 1999. Editorial Masson.
13. Fuentes Escarcena A.; Gutiérrez Carpio B.: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO E IN VIVO DEL EXTRACTO DE *SCHINUS MOLLE* L. (MOLLE). Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2007.
14. GARCÍA GUTIÉRREZ, ZEA CHÁVEZ: “Efecto antiinflamatorio tópico de la asociación de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) y *Calendula officinalis* (caléndula) en el edema inducido experimentalmente en ratas”
15. García-Rodríguez J.A. & Picazo J.J.: COMPENDIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA. 1ª Edición, 2006. Editorial Harcout Brace.
16. Gennaro Alfonso: REMINGTON FARMACIA. 19ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 1999
17. Gonzáles Alfaro José: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición, 2004. Editorial Ciencias Médicas. La Habana-Cuba.
18. Hernández Sampieri R., Fernández Collado C.: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN, 5ª Edición, 2010. MCGRAW HILL Interamericana Editores.
19. Kayser Fritz & col: MEDICAL MICROBIOLOGY. 10ª Edition. 2005. Editorial Thieme.
20. Kukllinski C.: FARMACOGNOSIA, ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICAMENTOSAS DE ORIGEN NATURAL, 1ª Edición, 2000. Ediciones Omega S.A.
21. Lock de Ugaz O.: INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA MÉTODOS EN EL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES. 1ª Edición. 1988. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
22. Mostacero J.; Mejia F.; Gamarra O.: TAXONOMÍA DE LAS FANERÓGAMAS ÚTILES DEL PERÚ. 1ª Edición. 2002. Editorial Normas Legales S.A.C. Perú.

23. Paredes Loayza A.; Salas Grandes E.: EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA RESINA DE *AZORELLA COMPACTA* (YARETA) SOBRE MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE PRODUCIR INFECCIÓN DE HERIDAS. Universidad Católica de Santa María. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2004.
24. Skoog D.; Leary J.: ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 4ª Edición. 1994. Editorial McGraw-Hill.
25. Stuart Walker: MICROBIOLOGÍA. 1ª Edición, 1999. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.
26. Villar del Fresno A. (Editor): FARMACOGNOSIA GENERAL. 1ª Edición 2000. Editorial Síntesis S.A.
27. Virrueta Gómez C.; Zegarra Manrique Y.: DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y ANTIBACTERIANO IN VITRO DE *PIPER ELONGATUM* “MÁTICO” FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI*. Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2008.
28. WAYNE DANIEL: Bioestadística, Bases para el análisis de las Ciencias de la Salud. 4ª Edición, Editorial Limusa SA. 2007.



ANEXO N°1: MEDIOS DE CULTIVO

– AGAR MAC CONKEY

Fundamento:

La presencia de las sales biliares se encuentra en menor concentración que en otros medios, para no inhibir demasiado y servir de enriquecedor en el crecimiento de enterobacterias; por su parte el cristal violeta inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas en especial estafilococos y enterococos. La lactosa presente y el indicador rojo neutro permiten diferenciar los gérmenes fermentadores de azúcar de aquellos que no lo hacen. Las peptonas que están en el medio son la base nutriente del mismo. El cloruro de sodio hace que se mantenga el equilibrio osmótico.

Composición:

Peptona de caseína	7.0 g
Lactosa	10.0 g
Peptona de tejido animal	3.0
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001
Agar-Agar	12.5 g
Agua destilada csp	1000.0 ml

Preparación:

Disolver los ingredientes en B.M. ajustar el pH a 7.0 autoclavar 15 minutos a 121°C. Repartir en placas Petri, 20ml por placa.

Procedimiento:

Sembrar de acuerdo a lo descrito, dejar incubando por 24 horas a 37°C.

Interpretación:

Las bacterias Gram (+) son inhibidas con excepción de los enterococos que crecen dando colonias pequeñas translúcidas y ligeramente rosadas. El grupo de los Gram (-), dan colonias de acuerdo con el comportamiento de las bacterias frente al disacárido lactosa, es así que las lactosa positivos dan colonias rojizas. La bacteria degrada la lactosa y produce ácidos virando al indicador del medio (rojo neutro) a un color rojizo. *Escherichia coli* da colonias rojizas con un precipitado de ácidos biliarés. *Klebsiella* desarrolla colonias mucosas presentando en la parte central un color amarillento. *Proteus* y otras bacterias no fermentadoras de lactosa forman colonias incoloras, pero a medida que transcurren las horas tienen a tomar un color verde azulado debido a la producción de pigmento. Otras bacterias no fermentadoras diferentes a enterobacteria también pueden crecer en este medio, las colonias pueden ser de un tono ligeramente rosado, es el caso de la *Mima* polimorfa, Alkalígenes, etc.

– **CALDO PEPTONADO**

Composición:

Peptona de carne	10.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g

Preparación:

Para preparar un litro se utiliza 15 g del medio.

Procedimiento:

Colocar el medio en un matraz, añadir agua destilada, disolver con ayuda del mechero Bunsen hasta completa transparencia.

Esterilizar el medio en la autoclave por 15 minutos a 121°C.

- **AGAR MUELLER HINTON**

Composición:

Infusión de carne	300.0 g
Peptona acida de caseína.....	17.5 g
Almidón.....	1.5 g
Agar.....	15.0 g
Agua purificada.....	1000 ml

Preparación:

Esterilizar a 121C° durante 15 minutos, enfriar a 45- 50 C° y repartir en placas Petriestériles.

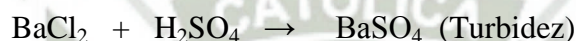
ANEXO N°2: MEDIO DE CONTRASTE

– ESCALA DE MC. FARLAND

Composición:

Cloruro de bario	0.5ml
Ácido sulfúrico	99.5ml

Reacción:



Procedimiento:

Para preparar la suspensión estándar se agrega 0.5ml de una solución de cloruro de bario 0.048 M a 99.5ml de una solución de ácido sulfúrico 0.36 N.

Cálculos

Para 100 ml de cloruro de bario 0.048 M

$$\frac{0.048\text{mol}}{1000\text{ml}} (100\text{ml}) \frac{208.3\text{g Cl}_2\text{Ba}}{1\text{mol}} = 0.99984 \text{ g Cl}_2\text{Ba en 100ml}$$

Para 1000 ml de ácido sulfúrico 0.36N

$$\frac{0.36\text{Equ}}{1000\text{ml}} (1000\text{ml}) \frac{98.08\text{g}/2}{1\text{mol}} \frac{1\text{ml}}{1.84} = 9.59478 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ al 96\%}$$

Para llevar al 100%

$$9.49478 \text{-----} 96\%$$

$$X \text{-----} 100\%$$

$$X=9.99\text{ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ en 1000ml}$$

ANEXO N°3: GALERÍA FOTOGRÁFICA



Inóculos bacterianos



Formación de hoyos en la placa

Fuente: Elaboración propia