

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MEDICO CIRUJANO

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE
PSIDIUM GUAJAVA L.* (guayaba) SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS

AUTOR: VILLANUEVA LEYVA GOLY ZULEMA

ASESOR: DRA. MEJÍA DELGADO ELVA MANUELA

TRUJILLO - PERÚ

2019

~ 1 ~

*A ti señor Padre Eterno por ser el amigo que nunca falla
por haber estado en todo momento conmigo,
porque guiaste mis pasos por el camino seguro y preciso.*

A mi Padre, por tu ejemplo, tu constante estímulo y esfuerzo, gracias porque implantaste en mi el espíritu de superación.

A mi madre, por tu inmenso amor, tu enorme paciencia y comprensión además de contar con tu contante apoyo, gracias por ser esa madre maravillosa que tengo.

*A mi hermano: Franklín por su invaluable sacrificio,
comprensión perenne y por el apoyo brindado.*

Para ti mi admiración y cariño

A las personas que siempre estuvieron a mi lado.

*Lo que deje mi generación...
permítame el progreso de tu generación.*

Con sincero reconocimiento y gratitud a:

MI MAESTRA

Dra. Elva Manuela Mejía Delgado

*Por su valiosa y desinteresada labor de asesoramiento que
permitieron el desarrollo de este trabajo.*

“El sol no espera que se le suplique para derramar su luz y su calor imítalo y haz todo el bien que puedas sin esperar que se te implore”

Con sincero agradecimiento y gratitud a:

Mg. Q.F. Rosa Rea Vásquez

Por tu amistad, apoyo y consejo que siempre me brindas y permitieron la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRAC

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Enunciado del problema.....	6
1.2.	Objetivos.....	6
1.3.	Hipótesis	7
II.	MATERIAL Y METODO.....	8
2.1.	Diseño de estudio	8
2.2.	Población, muestra y muestreo	9
2.3.	Definición operacional de variables	10
2.4.	Procedimientos y técnicas	12
2.5.	Plan de análisis de datos.....	15
2.6.	Aspectos éticos.....	16
III.	RESULTADOS.....	17
IV.	DISCUSION	22
V.	CONCLUSIONES	24
VI.	RECOMENDACIONES	25
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	26
VIII.	ANEXOS	35

Resumen

Objetivo: Demostrar el efecto antibacterial in vitro de las concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Material y Método: Se utilizaron hojas de *Psidium guajava L.* (guayaba). La obtención del extracto se realizó por secado, triturado, maceración y concentración en rotavapor. La actividad antibacterial del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se evaluó mediante la sensibilidad, la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). El análisis estadístico se realizó con la media, la desviación estándar, el análisis de varianza y para comparación múltiple entre los tratamientos se empleó la prueba de DUNCAN.

Resultados: El promedio del diámetro del halo de inhibición: a 42mg/ml presentó el valor de 10.6mm, a 105mg/ml de 11.2mm, a 210 mg/ml de 11.6mm, a 315mg/ml de 11.8mm, a 420mg/ml de 12.5mm y en base a la escala de Duraffourd se obtiene que la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible a todas las concentraciones del extracto alcohólico, siendo la menor utilizada de 42mg/ml la Mínima Inhibitoria (CMI). Al aplicar la prueba de comparación múltiple de Duncan para las UFC se obtiene que entre las concentraciones 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml del extracto alcohólico y la Clindamicina 2µg no hay diferencia significativa entre el uso de uno y otro.

Conclusión: El extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) presenta efecto antibacterial in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Abstrac

Objective: To demonstrate the in vitro antibacterial effect of the alcoholic extract of *Psidium guajava* L. (guava) on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Material and method: Nature leaves of *Psidium guajava* L. (guava) were used. The extract was obtained by drying, crushing, maceration and concentration in a rotavapor. The antibacterial activity of the alcoholic extract of *Psidium guajava* L. (guava) on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was evaluated by the sensitivity, the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (CMB). The statistical analysis was performed with the mean, the standard deviation, the analysis of variance and for multiple comparison between the treatments, the DUNCAN test was used.

Results: The average diameter of the inhibition halo: at 42mg / ml presented the value of 10.6mm, at 105mg / ml of 11.2mm, at 210 mg / ml of 11.6mm, at 315mg / ml of 11.8mm, at 420mg / 12.5mm ml and based on the Duraffourd scale, it is obtained that the strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is sensitive to all concentrations of the alcoholic extract, being the lowest used of 42mg / ml the Minimum Inhibitory (CMI). When applying the Duncan multiple comparison test for CFUs, it is obtained that between the concentrations 105mg / ml, 210mg / ml, 315mg / ml and 420mg / ml of the alcoholic extract and Clindamycin 2µg there is no significant difference between the use of one and other.

Conclusión: El extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) presenta efecto antibacterial in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

I. INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus*, denominado así en 1984 por Rosenbach debido al pigmento amarillo-dorado de sus colonias, es un germen Gram positivo, con reacción positiva a la prueba de la catalasa dispuestos en grupos. Se caracteriza por la producción de coagulasa, proteína A y ácido ribitol teicoico característico de esta variedad. Su patogenicidad se debe a elementos presentes en su estructura que facilitan la unión al huésped evadiendo así ser fagocitado y a varias toxinas (citotoxinas, toxinas exfoliativas, enterotoxinas) y de hidrolasas (coagulasa, hialuronidasa, fibrinolisisina, lipasas, nucleasas).^{1,2}

Las enfermedades integran las producidas por toxinas en intoxicación alimentaria, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada; enfermedades piógenas como el impétigo, foliculitis, forúnculos, ántrax, infecciones de heridas y otras enfermedades sistémicas como bacteriemia, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica. Su epidemiología lo incluye en la microbiota cutánea habitual humana y superficies mucosas siendo el reservorio más importante las fosas nasales anteriores convirtiéndose en factor de riesgo de infecciones intrahospitalarias.

1-3

Esta bacteria puede subsistir en superficies secas por largos lapsos de tiempo por presentar un revestimiento grueso de peptidoglucano y ausencia de membrana externa. La transmisión es por contacto directo, siendo las manos un factor importante de contagio, o por exposición a fómites contaminados. Debido a esto es considerado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas como uno de los 6 microbios de principal relevancia en la práctica diaria médica. La terapia para este microorganismo puede dificultarse por el creciente problema de resistencia a los

antibióticos como es el caso del *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) que es un problema de salud para los países industrializados y subdesarrollados. ¹⁻⁴

La terapia empírica debe utilizar antibióticos efectivos frente a cepas de SARM. El tratamiento oral puede incluir trimetoprima-sulfametoxazol, doxiciclina o minociclina, clindamicina o linezolid; la vancomicina es el fármaco de elección para el tratamiento intravenoso y la daptomicina, la tigeciclina o el linezolid son alternativas. ¹

Desde la antigüedad, la humanidad ha utilizado las plantas como fuente de medicamentos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de esta utiliza la Medicina Tradicional para atender sus necesidades primarias de salud. La terapéutica tradicional se fundamenta en el uso sustancias activas de las plantas medicinales. Las plantas medicinales son reconocidas como potenciales fuentes de nuevos compuestos de valor terapéutico debido a su composición fitoquímica. Varios estudios han documentado el uso de plantas medicinales en diversas partes del mundo incluido los países desarrollados. ^{5,6}

La especie *Psidium guajava* L., conocida popularmente como guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae*. El género *Psidium* comprende aproximadamente 150 especies de pequeños árboles y arbustos en los que sólo 20 especies producen frutos comestibles. *P. guajava* L., es nativa de América del Sur, se cultiva en zonas tropicales y subtropicales del mundo y existe tanto silvestres como cultivadas. En el Perú, crece en: San Martín, Loreto, Huánuco, Junín, Lima, Cuzco, La Libertad y Amazonas. El árbol comienza a tener frutos 1 o 2 años después de la siembra y sigue fructificación después de 30 años. El guayabo es un árbol permanente de 4.9 a 9.9 m de alto de tronco grisáceo-café con corteza llana, con escamas de color rojo, poli dérmica, tallos ramificados con hojas elípticas a oblongas, de 3.9 a 11.9 cm de largo y 2.9 a 4.9 cm de grosor; verticiladas con pecíolo corto y sus márgenes son enteros de color verde-

grisáceo por el haz y verde claro por el envés con destacada venación con 11 a 16 nervaduras; flores diminutas de color blanco, ubicadas en la parte axial de las hojas; el fruto es una baya comestible cuando madura de color amarillo, de 4.9 cm de diámetro, globular, no rugoso, con mesocarpio rosado y abundantes semillas.^{5, 7, 8, 9}

Diversas porciones de la planta se han empleado en la medicina tradicional para manejar enfermedades como malaria, gastroenteritis y algunos síntomas como vómitos, diarrea, disentería, heridas, úlceras, dolor de dientes, tos, dolor de garganta, encías inflamadas y una serie de otras condiciones. Esta planta también se ha utilizado para el control de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y obesidad. Las hojas se utilizan en forma de cataplasma para heridas, úlceras y dolores de dientes, también utilizadas para el tratamiento de la bronquitis y ataques de asma.^{10- 12}

En Perú; las hojas y las raíces se utilizan como estípticos, la decocción de la corteza para el cólico estomacal, el de hojas para la inflamación, el de frutos y hojas para disenterías y diarreas, las semillas se trituran y se mezclan con agua aplicándose vía tópica para el acné.⁵

Las propiedades antimicrobianas, antidiarreicas y otras propiedades biológicas de *P. guajava* son de especial interés para la Industria Farmacéutica y de alimentos.¹³

Estudios fitoquímicos han encontrado que las hojas de esta planta contienen taninos, fenoles, flavonoides (avicularina, quercetina-3-O- β -D glucósido, quercetina-3-O- α -L-ramnósido, quercetina-3-O-gentiobiósido, quercetina-3-O- α -arabinopiranosido =guayaverina y morin-3-O- α -L-arabopiranosido), triterpenoides (ácido guajanoico, obtusinina, ácido gorenshico), esteroides, saponinas, compuestos aminados, aceite esencial, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico ,ácido ursólico , ácido catecólico ,ácido guayavólico, ácido malísnico y ácido elágico.^{9,14,15}

En Egipto, Metwally y cols. Publican en 2010 una investigación sobre los extractos de hojas de *P. guajava L.* y su actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en agar contra *Staphylococcus aureus* y dos bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se demostró que la quercetina (flavonoide) y sus glicósidos tienen una fuerte actividad antibacteriana contra el *S. aureus* mostrando una zona de inhibición de 28mm. ¹⁶

En USA, Biswas y cols. Publican en 2013 una investigación sobre el potencial antimicrobiano de los extractos foliares de *P. guajava L.* (guayaba) contra dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*) y dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*). Las hojas de guayaba fueron extraídas en cuatro disolventes de diferentes polaridades crecientes (hexano, metanol, etanol y agua). La eficacia de estos extractos se probó frente a estas bacterias mediante un método de difusión de pozos empleando 50µl de solución de extracto de hoja por pocillo. De acuerdo con los hallazgos del ensayo antibacteriano, los extractos metanólico y etanólico mostraron actividad inhibitoria solo contra las dos bacterias Gram positivas obteniéndose para el extracto de etanol una zona de inhibición media de 11mm para *Staphylococcus aureus*.¹⁰

En Cuba, Morales publica en 2014 una investigación sobre la composición química y estudios farmacológicos de las hojas de tres especies de Mirtáceas dentro de ellas *P. guajava L.* El estudio se realizó con cuatro cepas de bacterias, dos Gram positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25932) y dos Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922) la evaluación de la actividad antimicrobiana demostró que los extractos de las tres Mirtáceas poseen buenas potencialidades como antimicrobianos, muy superior a los

aceites esenciales obtenidos de estas plantas, contra *Staphylococcus aureus* se obtuvo un halo de inhibición de 11mm .¹⁷

En México, Carrillo y col. Publican en 2015 una investigación sobre análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas que crecen en la Huasteca Potosina entre ellas *P. guajava* L. y establecieron la Concentración Mínima Inhibidora (CMI), que es la mínima concentración de extracto para inhibir el crecimiento bacteriano, para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*., encontrando que el *S. aureus* fue la bacteria más susceptible a los extractos hidroalcohólicos mostrando la CMI de 7.5mg/ml. ¹⁸

En España, Díaz E. y col. publican en 2017 el metaanálisis: Efectos sobre la salud de las hojas de *Psidium guajava* L.: una revisión general de la última década, encontrando que las bacterias Gram-positivas exhibieron mayores zonas de inhibición y mínimas concentraciones inhibitorias que las Gram-negativas y que la maceración en etanol: agua al 70% (volumen / volumen) por 72 horas para el *Staphylococcus aureus* la CMI es de 256mg/ml estudio realizado en Brasil.¹⁹

En la India, Basiriya y col. publican en el 2017: Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* L. contra aislados clínicos de heridas infectadas; el extracto fue probado contra 7 aislados clínicos seleccionados al azar: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* , todos los cuales fueron cepas resistentes a múltiples fármacos y se obtuvo que el extracto tuvo efecto inhibitorio sobre las 7 cepas y para *Staphylococcus aureus* se observa una zona de inhibición de 19-22mm, en la concentración de 150-250mg/ml.²⁰

1.1. Enunciado del problema

El *Staphylococcus aureus*, la más virulenta de las especies de *Staphylococcus*, está asociada con el mayor número de cuadros clínicos que pueden llegar a poner en riesgo la vida de los pacientes tales como la neumonía, la osteomielitis, las bacteriemias y la endocarditis.

El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha provocado un crecimiento del campo de investigación sobre plantas medicinales y su efecto sobre diversos microorganismos y dada la biodiversidad con que cuenta el país se propuso este estudio experimental que analizó el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y sustente su utilización como una alternativa a la medicina convencional, en el tratamiento de las infecciones asociadas a esta bacteria, sin evidencias de efectos adversos y de fácil acceso por lo que podría ser utilizada como principio activo de fitofármacos y ampliar así el arsenal terapéutico. Motivo por el cual planteamos el siguiente problema:

¿Existe efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus*?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Demostrar el efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la sensibilidad in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) a 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Identificar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) a 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Identificar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) a 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Comparar el efecto antibacterial in vitro de las diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) frente a Clindamicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

1.3. Hipótesis

H1: El extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) tiene efecto antibacterial in vitro sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

H0: El extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (*guayaba*) no tiene efecto antibacterial in vitro sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio

Por su orientación es básica , por su diseño de contrastación es experimental, por su direccionalidad es transversal y prospectivo en el tiempo.

Diseño específico

Experimento puro: Diseño con post prueba únicamente y grupo control ²¹

RG1	X	O1
RG2	-	O2

Donde:

RG1: Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

RG2: Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

X: Extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a las concentraciones de 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml.

-: Clindamicina 2µg

O1: Medida de los halos de inhibición

O2: Medida de los halos de inhibición

2.2. Población, muestra y muestreo

Población

Staphylococcus aureus ATCC 25923 en crecimiento.

Muestra

Paca Petri que contiene cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en cultivo.

Unidad de análisis

Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que contenía el extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a determinadas concentraciones y Clindamicina 2µg.

Unidad de muestreo

Hoja de recolección de datos del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tamaño de muestra: Se utiliza la fórmula para estudios de contraste de hipótesis, direccionada a la comparación entre dos medias. ^{21, 22,23}

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Donde

- n = sujetos necesarios en cada una de las muestras
- Z_{α} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado
- Z_{β} = Valor Z correspondiente al riesgo deseado
- S^2 = Varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia.

- d = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos)

$Z_{\alpha} = 1.96$ para confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$ para confianza del 80%

$S = 0.8 ((\bar{X}_1 - \bar{X}_2))$ valor asumido por haber escasos estudios previos. ²⁴

$$n = \frac{2(0.8)^2 (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2 (1.96 + 0.84)^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

$$n = 2(0.8)^2 (2.8)^2$$

n= 10 Repeticiones

Luego: La muestra estuvo conformada por 10 repeticiones para cada tratamiento.

2.3. Definición operacional de variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA	INDICADOR	INDICE
INDEPENDIENTE Extracto alcohólico de <i>Psidium guajava</i> L. (guayaba)	Cuantitativa	Ordinal	Concentración mg/ml	42mg/ml 105mg/ml 210mg/ml 315mg/ml 420mg/ml
DEPENDIENTE Efecto antibacterial in vitro sobre <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923	Cualitativa	Ordinal	Escala de Duraffourd: Nula (N) Sensible (S) Muy sensible (MS) Sumamente sensible SS)	Diámetro de halo de inhibición (mm): < 8mm (N) 8-14mm(S) 14-20mm (MS) <20 mm (SS)
	Cualitativa	Nominal	CMI: Por absorbancia	< 0.1nm: No crecimiento >0.1nm: Crecimiento
	Cualitativa	Nominal	Unidades Formadoras de colonias (UFC)	Efectiva <1.5 x 10 ⁸ UFC No efectiva >1.5 x 10 ⁸ UFC

Definición de variables:

Extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba)

Operacional:

-Extracto cuyo solvente es el etanol y que contiene los principios activos de *Psidium guajava* L. (guayaba), obtenido a partir de la hojas de la planta, por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. En la presente investigación se utilizó el extracto etanólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) en concentraciones de 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml.

-Clindamicina, antimicrobiano presente en disco de sensibilidad con potencia de 2µg.

Efecto antibacterial in vitro sobre *Staphylococcus aureus*

Se evaluó mediante la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 al extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba), la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Sensibilidad

Se valoró mediante la capacidad del extracto de inhibir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación, su valoración fue la medida de zona alrededor del disco (halo de inhibición) de crecimiento bacteriano.^{25,26}

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Operacional: se interpretó como la menor concentración del extracto capaz de inhibir el desarrollo de la cepa bacteriana después de 24 horas de incubación.²⁷

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Operacional: se interpretó como la mínima concentración del extracto capaz de inducir la muerte de la cepa bacteriana luego de 24 horas de incubación.²⁷

2.4. Procedimientos y Técnicas

Recolección de la muestra

En enero del 2018 se recolectaron 2kg de hojas maduras, frescas de color verde brillante de *Psidium guajava* L. (guayaba) del fundo “Los Cocos” en el distrito de Chao, ubicado a 16msnm, con temperatura media anual de 18.8°C, provincia de Virú, departamento de La Libertad, Perú.

Identificación y determinación taxonómica de la muestra

Se alcanzó la muestra de *Psidium guajava* L. (guayaba) al Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo para su determinación taxonómica donde se encuentra registrado con Constancia N° 121- 2018 - HUT.

Preparación de la muestra

Selección de la muestra: El material recolectado fue transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo se seleccionaron para la experimentación hojas verdes.

Preparación del extracto etanólico: Las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) fueron lavadas con agua y desinfectadas con alcohol de 70° y secadas por 4 horas en estufa (BINDER ED 53) a 50°C.

Posteriormente se molieron en un molino manual y se colocaron en un frasco de vidrio de color ámbar a razón de 200g de material triturado por cada 1000ml, de etanol de 70° dejándose macerar por una semana, agitándolo todos los días.

El producto se filtró utilizando el papel Whatman N° 1, el sobrenadante filtrado se colocó en el Rotavapor (BUCHI Heating BathB-491) con el cual se eliminó el solvente. Se obtuvo un producto resultante denominado extracto con concentración de 420mg/ml y a partir de éste, se prepararon las diferentes concentraciones utilizando Tween 80: de 42mg/ml se preparó con 1ml del extracto y 9ml de Tween 80, de 105mg/ml se preparó con 2.5ml de extracto y 7.5ml de Tween 80, de 210mg/ml se preparó con 5ml de extracto y 5ml de Tween 80 y de 315mg/ml se preparó con 7.5ml de extracto y 2.5ml de Tween 80 .(Anexo N° 1)

Cada una de las concentraciones del extracto etanólico se colocaron en frascos ámbar de 20ml y se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización.^{28, 29}

Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus*

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se obtuvo del laboratorio Gen Lab, cepa que viene liofilizada, se la reactivó utilizando caldo nutritivo y luego se conservó en agar soya tripticasa, hasta la realización del trabajo experimental.

Se preparó el inóculo en solución salina (NaCl 0.9%) de las colonias aisladas seleccionadas de una placa de agar después de 24 horas de incubación (en un medio enriquecido, el agar soya tripticasa). Se ajustó la turbidez de la suspensión al equivalente 1.5×10^8 UFC/ml que corresponde al tubo estándar 0,5 de la escala de McFarland cuya absorbancia es de 0.08 a 0.10 nm. ^{25,29}

Prueba de la efectividad antibacteriana mediante la técnica de Kirby Bauer

Se preparó el medio Mueller Hinton que se colocó en placas Petri, luego en cada placa se realizó el sembrado con un hisopo estéril, el cual se sumergió en el tubo del inóculo previamente preparado, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover exceso del inóculo, el cual se sembró en la superficie seca de la placa Muller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar la distribución uniforme del inóculo.

Para la preparación de los discos de inhibición se utilizó papel Whatman N° 1 y se esterilizaron en una placa Petri, luego fueron sumergidos dentro de cada concentración del extracto etanólico de *Psidium guajava* L.(guayaba) :42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml; luego se colocaron con ayuda de una pinza estéril en la superficie de los agares, distribuidos uniformemente a una distancia mínima de 25mm uno del otro ,después las placas se llevaron a incubación a 37 °C por 24 horas , realizándose la lectura de las mismas y la medición del diámetro de cada uno de los halos en (mm) colocando una regla sobre el reverso de la placa, cada diámetro obtenido de los halos de inhibición se clasificó según la escala de Duraffourd: escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio, según el tamaño del diámetro de cada halo.

Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se colocó 1.6 ml del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml respectivamente. Cada concentración en un tubo de ensayo, previamente etiquetado. Después del proceso de dilución se colocó un inóculo de 0,4ml del cultivo preparado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los tubos que contenían las diversas concentraciones del extracto; así como

el control positivo (tubo con Clindamicina) y al control negativo (tubo con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sin ningún tratamiento) obteniéndose un volumen final de 2ml para cada tubo .Se llevó a incubación por un periodo de 24 horas, el crecimiento bacteriano se evaluó a través de la medición de la turbidez por espectrofotometría (Espectrofotómetro BOECO S-20).

Determinación Concentración mínima bactericida (CMB)

De cada tubo de ensayo según la concentración se tomó 0,1ml de las suspensiones y se sembró en placas con Agar Mueller Hinton esparciendo la muestra en toda la placa, mediante el uso del asa Driglasky, se repitió 10 veces este procedimiento con cada concentración y los controles utilizados en la determinación de la CMI. Todas las placas sembradas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Después se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Recolección de Datos

Se midieron los halos de inhibición de los ensayos y se realizó el recuento directo de las UFC crecidas en las placas según el método utilizado. Dichos datos se registraron en un formato diseñado para este fin (Anexo N°2 y N°3)

Se utilizó la técnica de la observación experimental. ²¹

2.5. Plan de análisis de datos

Se procesó la información utilizando la base operativa de Windows 7 el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 24, los que luego se presentan en cuadros de distribución de frecuencia de una entrada con sus valores absolutos.

Estadística Descriptiva: En cuanto a las medidas de tendencia central se calculó la media y en las medidas de dispersión la desviación estándar.

Estadística Inferencial

En el análisis estadístico para determinar si hay diferencia del efecto antibacteriano entre los diferentes tratamientos se hizo uso del análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado. Para las comparaciones múltiples entre los tratamientos se empleó la prueba estadística paramétrica de DUNCAN. Ambas pruebas con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$).

2.6. Aspectos éticos:

Se cumplió con lo establecido en el manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud y en el Perú por el manual de bioseguridad para laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos del Ministerio de Salud del Instituto Nacional de Salud y estipulado en la Ley General de Salud N° 26842 capítulo VI Art.99 para el manejo y tratamiento de desechos de residuos infecciosos, el cual se realizó mediante la esterilización en autoclave.³⁰⁻³²

Este trabajo cumplió con lo reglamentado en el código de ética para la investigación de la Universidad Privada Antenor Orrego capítulo II artículo 6 de principios específicos para los investigadores ya que no se utilizó el trabajo de otros investigadores como si fueran propios, se citó adecuadamente las fuentes que se han incluido en el presente estudio y se reconoció apropiadamente las contribuciones de todos los participantes en la presente investigación.³³

El presente trabajo presenta información genuina, original no incurriendo en falsificación ni plagio, para su posterior publicación respetando así el código de ética del Colegio Médico del Perú según el capítulo 6 del trabajo de investigación Art. 48°.³⁴

III. RESULTADOS

El presente estudio de tipo experimental "in vitro", se realizó en los ambientes de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, con el propósito de determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se utilizaron concentraciones de 42mg/ml, 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml y grupos control. Los resultados obtenidos fueron: el promedio del diámetro del halo de inhibición a 42mg/ml presentó el valor de 10.6mm, a 105mg/ml de 11.2mm, a 210mg/ml de 11.6mm, a 315mg/ml de 11.8mm, a 420mg/ml de 12.5mm y el Control (Clindamicina 2µg) de 25mm y en base a la escala de Duraffourd la cepa es sensible a todas las concentraciones del extracto. (Tabla N° 1)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es 42mg/ml. (Tabla N° 2).

Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) obtenidas con el extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 0 UFC para 420mg/ml y para Clindamicina 2µg. (Tabla N°3)

Al aplicar la prueba de comparación múltiple de Duncan para las UFC se encontró que las concentraciones de 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) y la Clindamicina 2µg el efecto es semejante. (Tabla N°4)

Tabla N° 1: Sensibilidad in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en base a la escala de Duraffourd

Tamaño promedio de los halos de inhibición (en mm) según grupo de tratamiento					
Grupo de tratamiento	n	Promedio	Escala de Duraffourd Sensible (S) 8-14 mm	Desv. Estándar	Análisis de Varianza
Ext. Alcohólico Guayaba 42mg/ml	10	10.6	S	0.84	F=303.13 p<0.001
Ext. Alcohólico Guayaba 105mg/ml	10	11.2	S	0.79	
Ext. Alcohólico Guayaba 210mg/ml	10	11.6	S	0.84	
Ext. Alcohólico Guayaba 315mg/ml	10	11.8	S	1.48	
Ext. Alcohólico Guayaba 420 mg/ml	10	12.5	S	1.35	
Clindamicina 2µg	10	25		0	

Fuente: Datos recogidos por el investigador, año 2018

Se muestra que la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible a todas las concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) en base a la escala de Duraffourd.

Tabla N° 2

Concentración mínima inhibitoria (CMI) in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Grupo de tratamiento	Absorbancia en nanómetros (nm)
Ext. Alcohólico Guayaba 42 mg/ml	0.052
Ext. Alcohólico Guayaba 105 mg/ml	0.032
Ext. Alcohólico Guayaba 210 mg/ml	0.028
Ext. Alcohólico Guayaba 315 mg/ml	0.01
Ext. Alcohólico Guayaba 420mg/ml	0
Bacteriano sin tratamiento	0.1

Fuente: Datos recogidos por el investigador, año 2018

Se determinó que la CMI del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de 42mg/ml.

Tabla N° 3

Concentración mínima bactericida (CMB) in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 medido en UFC

Unidades Formadoras de Colonias (UFC) según grupo de tratamiento				
Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	Análisis de varianza
Ext. Alcohólico Guayaba 42mg/ml	10	356.6	67.66	
Ext. Alcohólico Guayaba 105mg/ml	10	0.5	0.71	
Ext. Alcohólico Guayaba 210mg/ml	10	0.3	0.67	F=4.9141x10 ¹³
Ext. Alcohólico Guayaba 315mg/ml	10	0.1	0.32	p<0.001
Ext. Alcohólico Guayaba 420 mg/ml	10	0	0	
Clindamicina 2µg	10	0	0	
Bacteriano sin Tratamiento	10	1.5x10 ⁸	0	

Fuente: Datos recogidos por el investigador, año 2018

Se determinó que la concentración de 420mg/ml tiene efecto bactericida, sin embargo, todas las concentraciones del extracto alcohólico tuvieron efecto comparado con la concentración del inóculo.

Tabla N° 4

Comparación del efecto antibacterial del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) en UFC con Clindamicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Prueba de comparación múltiple (Duncan) para las UFC según grupo de tratamiento				
Grupo de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$		
		1	2	3
Ext. Alcohólico Guayaba 420 mg/ml	10	0		
Clindamicina 2 μ g	10	0		
Ext. Alcohólico Guayaba 315mg/ml	10	0.1		
Ext. Alcohólico Guayaba 210mg/ml	10	0.3		
Ext. Alcohólico Guayaba 105mg/ml	10	0.5		
Ext. Alcohólico Guayaba 42mg/ml	10		356.6	
Bacteriano sin Tratamiento	10			1.5 x 10 ⁸

Fuente: Datos recogidos por el investigador, año 2018

Las concentraciones al 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml del extracto son semejantes al efecto obtenido con la Clindamicina 2 μ g.

IV. DISCUSION

En la práctica clínica las infecciones causadas por el *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. Teniendo impacto sobre la salud por la resistencia que la bacteria puede presentar a múltiples antibióticos, incrementando así la tasa de morbilidad y siendo la utilización de las plantas medicinales una alternativa eficaz.

En el presente estudio se planteó evaluar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la literatura se ha reportado que la guayaba posee efecto antibacteriano. Así Valdez S. y Toledo J. (2015) , Diaz E y col. (2017) , Hira S y col.(2018) y Ortega J. y Madrigal J.(2018) reportan que todos los extractos alcohólicos de *Psidium guajava L.* mostraron actividad antibacteriana altamente efectiva en dosis dependiente para *Staphylococcus aureus*, corroborando los resultados obtenidos en el presente estudio y en el que se demuestra que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible a todas las concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) en base a la escala de Duraffourd y que al aplicar el análisis de varianza se obtiene un valor de $p < 0.001$ lo que da validez y significancia estadística a los resultados. Asimismo, el control utilizado Clidamicina $2\mu\text{g}$ presenta halos de inhibición que según la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para esta bacteria está catalogado como sensible; mientras que el blanco Tween 80 no presenta halos de inhibición, lo que indica la inocuidad del solvente frente a este microorganismo. (Tabla N° 1, Anexo N° 4, Foto N° 6).^{8, 19, 35, 36}

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue la mínima utilizada de 42mg/ml similar a lo encontrado por Orue Cl. y Rebaza F. (2013) que reportaron CMI de 50mg/ml y que difiere de lo encontrado por Gitika y Manoj K. (2016) que reportaron CMI de 25mg/ml probablemente porque estos investigadores realizaron el estudio empleando la técnica de dilución en tubo. (Tabla N° 2) ^{15, 37}

Se encontró que a la concentración de 420mg/ml del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 0 UFC; según Biswas B. y col. (2013), Artero G. (2015) y Beulah y col. (2018) los responsables de este efecto son los flavonoides que están presentes en las hojas de guayaba (Tabla N° 3) ^{10, 38, 39,40}

Al comparar el efecto del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) con la Clindamicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mediante la comparación múltiple (Duncan) para las UFC, se encontró que entre las concentraciones del extracto de 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml y la Clindamicina 2µg no hay diferencia significativa entre el uso de uno y otro; el efecto antibacteriano se debería según Biswas B y Col (2013) a que las bacterias Gram positivas tienen en su pared celular un peptidoglicano similar a una malla, haciendo más accesible la penetración del extracto y a su capacidad de formar complejos con la pared bacteriana.(Tabla N° 4) ^{8,10,39}

Finalmente, lo antes expuesto nos lleva a aceptar la hipótesis propuesta porque de acuerdo a los resultados podemos afirmar que el extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) tiene efecto antibacterial in vitro sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

V. CONCLUSIONES

- El extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) 25923 a todas las concentraciones tiene efecto antibacterial sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- El extracto de *Psidium guajava L.* (guayaba) presenta sensibilidad sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a todas las concentraciones utilizadas.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de 42mg/ml.
- La concentración bactericida del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de 420mg/ml.
- Al comparar el efecto del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) a 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml y 420mg/ml con la Clindamicina 2µg de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan se obtiene que no hay diferencia entre el uso de uno y otro.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) reduciendo los intervalos entre las concentraciones.
- Realizar estudios in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* (guayaba) con concentraciones menores de 42mg/ml.
- Realizar el análisis fitoquímico del extracto alcohólico de *Psidium guajava L.* para encontrar el metabolito secundario responsable del efecto antibacterial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica 7a ed. España: Elsevier; 2014.p. 176-180.
2. Sejas A, Zurita BI, Rodriguez MX, Espinoza JB, Sejas M. Prevalencia de *staphylococcus aureus* en portadores nasales del personal de enfermería - Hospital Viedma. Rev Cient Cienc Med.2016;19(1): 29-33
Disponibile en:
http://www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v19n1/v19n1_a06.pdf
3. Becerra DJ, Cabrera JC, Solano M. Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *staphylococcus aureus*. Rev Cient Cienc Med.2016;19(2): 38- 42
Disponibile en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332016000200007
4. Duquesne A, Castro N, Monzote A, Paredes I. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* comunitarios en muestras purulentas. Rev Cubana Med Gen Integr. 2015; 31(3):295-307
Disponibile en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252015000300004
5. Ruiz JR .Actividad Antifungica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis grado] .Lima: Universidad Mayor de San Marcos;2013
Disponibile en:

<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2590>

6. Bisi-Johnson MA, Chikwelu LO, Babatunde BS, Jacobus NE, Okoh AI. Antibacterial activity of crude extracts of some South African medicinal plants against multidrug resistant etiological agents of diarrhea. Bisi-Johnson et al. BMC Complementary and Alternative Medicine.2017; 17:321

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28629407>

7. Comas RE. Contribución a estandarización del proceso de obtención a escala de laboratorio de un extracto de las hojas de *Psidium guajava* L. [Tesis maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014

Disponible en:

<http://bdigital.unal.edu.co/37668/1/192563.2014.pdf>

8. Valdez S, Toledo J. Eficacia Antimicrobiana del extracto de *Psidium guajava* L. Paraguay Oral Research.2015; 4 (2): 113-123

Disponible en:

<http://www.paraguayoral.com.py/revista/a4n2/A4N2.pdf>

9. Rodríguez R, Lafourcade A, Pérez L. Hojas de *Psidium guajava* L. Rev Cub Far 2013;47(1):127-135

Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152013000100014

10. Biswas B, Rogers K, McLaughlin F, Daniels D, Yadav A. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria.Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology. 2013; 746165 :7

Disponible en:

<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2013/746165/>

11. Camarena JC, Rocha NE, Gallegos JA, González RF, Pedraza FE, López P. Chemical composition of biomass generated in the guava tree pruning. *Excli Journal*. 2015; 14:204-212

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553883/>

12. Shittu OB, Ajayi OL, Bankole SO, Popoola TOS. Intestinal ameliorative effects of traditional Ogi-tutu, *Vernonia amygdalina* and *Psidium guajava* in mice infected with *Vibrio cholera*. *African Health Sciences*. 2016; 16 : 2

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605980>

13. Ashrafa A, Sarfraz RA, Rashida MA, Mahmoodc A, Shahida M, Noor N. Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts *Pharmaceutical biology*. 2016;54(10): 1971–1981

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26841303>

14. Byalakere CS, Nagarajappa R, Singh R, Suma S, Rupesh T. Antimicrobial efficacy of the combinations of *Acacia nilotica*, *Murraya koenigii* (Linn.) Sprengel, *Eucalyptus*, and *Psidium guajava* on primary plaque colonizers: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*. 2016;27(4):15-20

Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/266946186_Antimicrobial_efficacy_of_the_combinations_of_Acacia_nilotica_Murraya_koenigii_L_sprengel_Eucalyptus_hybrid_and_Psidium_guajava_on_primary_plaque_colonizers

15. Orue CI, Rebaza F. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanolico de frutos y hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 [Tesis grado]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013

Disponible en:

<https://core.ac.uk/download/pdf/54221103.pdf>

16. Metwally AM, Omar AA, Harraz FM, El Sohafy SM. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacogn Mag.* 2010;6(23): 212–218

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950385/>

17. Morales Y. Composición química y estudios farmacológicos de las hojas de tres especies de Mirtáceas. [Tesis maestría]. Cuba: Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas; 2014

Disponible en:

<http://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/3128>

18. Carrillo M, Reyes A, Carranza C. Análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas que crecen en la Huasteca Potosina. *Rev Csc Nat. & Agrop.* 2015; 2(3):387-391

Disponible en:

http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/vol2num3/Ciencias%20Naturales%20y%20Agropecuarias%20Vol%202%20Num%203%20Final_6.pdf

19. Díaz E, Verardo V, Gómez AM, Fernández A, Segura A. Health Effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An Overview of the Last Decade Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 897

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28441777>

20. Basiriya R, Anuswedha A, Kalaiselvam M. Evaluation of antibacterial activity of ethanol leaf extracts of *Psidium guajava* Linn. against clinical isolates from wound infections World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 6, Issue 05, 2017

Disponible en:

<http://www.wjpps.com/download/article/1493456163.pdf>

21. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 6ta ed. México: McGraw-Hill; 2014. p. 40,142,189,190,387

22. García JA, Reding A, López JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Inv Ed Med 2013;2(8):217-224

Disponible en:

<http://www.elsevier.es/es-revista-investigacion-educacion-medica-343-articulo-calculo-del-tamano-muestra-investigacion-S2007505713727157>

23. Fistera.com, Atención primaria en la red [Internet]. La Coruña: Fistera.com; 1990 [recuperado 5 Nov. 2017; citado 7 Nov. 2017]. Disponible en:

<http://www.fistera.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp#Tabla 2>

24. Barreto MO .Efecto Antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Fragaria vesca* L sobre *Streptococcus mutans* ATCC25175. [Tesis grado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2016
- Disponible en:
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7526>
25. Picasso JJ, Métodos básicos para estudio de sensibilidad de antimicrobianos España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [citado 20 Oct. 2018]
- Disponible en:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
26. Forbes BA, Sahm DE, Weissfeld AS. Diagnostico Microbiologico .12ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2009
27. Ramirez LS, Marin D. Metodologias para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal Scientia et Technica Año XV, No 42, Agosto de 2009
- Disponible en:
http://www.academia.edu/28313103/METODOLOGIAS_PARA_EVALUAR_IN_VITRO_LA_ACTIVIDAD_ANTIBACTERIANA_DE_COMPUESTOS_DE_ORIGEN_VEGETAL
28. Chero DA. Efecto Antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajaba* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [Tesis grado]. Pimentel: Universidad Señor de Sipan;2016
- Disponible en:
<http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/422>

29. Centurión JA. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “Laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC25923. [Tesis grado]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego;2017
- Disponible en:
<http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/2580>
30. Organización Mundial de la Salud .Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra: Organización Mundial de la Salud ; 2005
- Disponible en:
https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
31. Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud .Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. Perú: Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud ;2005
- Disponible en:
http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/normatividad/norref/MAN-INS-001%20Ed03%20BIOSEGURIDAD_%20IJL%2016_08_05.pdf
32. Perú .Congreso de la Republica Ley General de Salud N° 26842 por la cual se dictan De las sustancias y productos peligrosos para la salud. Diario oficial ,1997.
- Disponible en:
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/LEYN26842.pdf>
33. Universidad Privada Antenor Orrego. Código de Ética para la Investigación. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2016
- Disponible en:

http://www.upao.edu.pe/investigacion/pdf/CODIGO_%C3%89TICA_para_LA_I_NVESTIGACI%C3%93N.pdf

34. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología .Perú; 2007
Disponible en :
http://medicina.unmsm.edu.pe/etica/images/Postgrado/Instituto_Etica/Codigo_etica_cmp_OCT-2007.pdf
35. Hira S ,Rejila H, Shilpa S, y col. Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria TUJM Vol. 5, No. 1, 2018
Disponible en:
<https://www.nepjol.info/index.php/tujm/article/view/22292/18991>
36. Ortega JA, Madrigal JA. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de la hoja de guayaba (*Psidium guajava*). [Tesis grado].Ecuador Escuela de Ciencias Químicas, Huayaquil Ecuador ;2018
37. Gitika , Manoj K. Antibacterial activity of *Psidium guajava* L. leaves extracts against some gram-positive and gram-negative bacteria ejpmr, 2016,3(10), 261-266
38. Artero GJ. Elaboración de jugo funcional de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de mermas y coproductos de la producción de guayaba en El Salvador.[Tesis grado].Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras;2015
Disponible en:
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4539/1/AGI-2015-007.pdf>
39. Beulah E, Sony P, Iyanar k. Antibacterial activity of *Psidium guajava* L. against certain multidrug resistant gram-negative and gram-positive bacteria JMSCR Volume 06 Issue 09 September 2018

Disponible en:

<http://jmscr.igmpublication.org/v6-i9/29%20jmscr.pdf>

40. Soto MR, Soto K, Serrano A. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. (Polemoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas”. *Arnaldoa* 21 (1): 81 - 90, 2014

Disponible en:

<http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/download/107/104>.

VIII. ANEXOS

Anexo N° 1

Preparación del Extracto alcohólico de *Psidium Guajava L.* (guayaba)

Volumen de Extracto	Volumen de Tween 80	Volumen final	Concentración (mg/ml)	Porcentaje
1 ml	9 ml	10 ml	42 mg/ml	10%
2.5 ml	7.5 ml	10 ml	105 mg/ml	25%
5 ml	5 ml	10 ml	210 mg/ml	50%
7.5 ml	2.5 ml	10 ml	315 mg/ml	75%
10 ml	-	10 ml	420 mg/ml	100%

Anexo N° 2

Ficha de recolección de datos

Efecto antibacterial in vitro del extracto alcohólico de *Psidium Guajava L.*
(guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Repeticiones	HALOS DE INHIBICION (mm)					
	Extracto alcohólico de <i>Psidium Guajava L.</i> (guayaba)					Control
	42 mg/ml	105 mg/ml	210 mg/ml	315 mg/ml	420 mg/ml	Clindamicina 2µg
1	10	12	12	10	14	25
2	12	12	12	11	14	25
3	10	12	11	12	12	25
4	11	11	13	12	11	25
5	10	12	12	14	14	25
6	10	11	12	13	11	25
7	10	10	11	13	12	25
8	11	11	12	13	14	25
9	12	11	11	10	12	25
10	10	10	10	10	11	25

Anexo N° 3

Ficha de recolección de datos

Efecto antibacterial in vitro del extracto alcohólico de *Psidium Guajava L.* (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Repeticiones	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)						
	Extracto alcohólico de <i>Psidium Guajava L.</i> (guayaba)					Control	Control
	42 mg/ml	105 mg/ml	210 mg/ml	315 mg/ml	420 mg/ml	Clindamicina 2µg	Bacteriano sin Tx
1	405	0	2	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
2	364	0	0	1	0	0	1.5 x 10 ⁸
3	409	1	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
4	288	1	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
5	475	0	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
6	313	0	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
7	331	0	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
8	238	1	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
9	360	0	1	0	0	0	1.5 x 10 ⁸
10	383	2	0	0	0	0	1.5 x 10 ⁸

Anexos N° 4

Patrones estándar del halo de inhibición para *Staphylococcus* spp, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetros del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29	β-lactamasa ^d	≤0.1	26-37
	Oxacilina ^d (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
	(<i>Estafilococos coagulasa -</i>)	1	≤17	--	≥18	>0.5	<0.25	--
B	Vancomicina ^e	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	21-26
	Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	>8/152	<2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	25-30
	Cloranfenicol ^e	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{e,f}	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^g	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.

b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen β-lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinas.

c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los β-lactámicos (la sensibilidad a β-lactámicos puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).

d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estidados para determinar la CMI de la vancomicina.

e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.

f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

Según ^{25,29}

Ane`xo N° 5

Foto N° 1: Determinación de la sensibilidad del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba)



Foto N° 2: Sembrado de placas con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Foto N° 3: Lectura de halos de inhibición

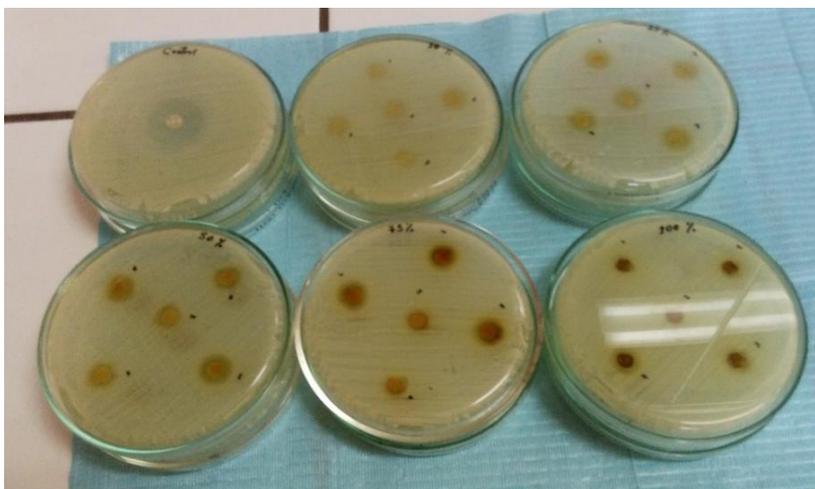


Foto N° 4: Halo de inhibición del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 105mg/ml (25%)

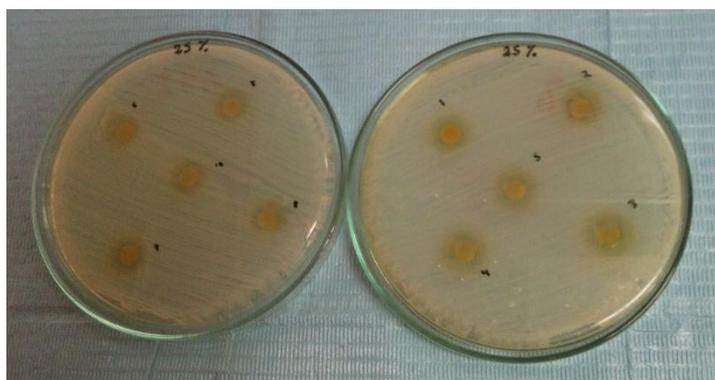


Foto N° 5: Halo de inhibición del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 315mg/ml (75%)

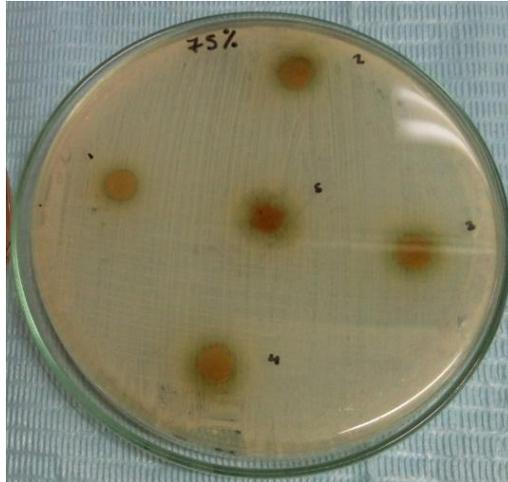


Foto N° 6: Halo de inhibición del Tween 80



Foto N° 7: Determinación de la CMI y CMB

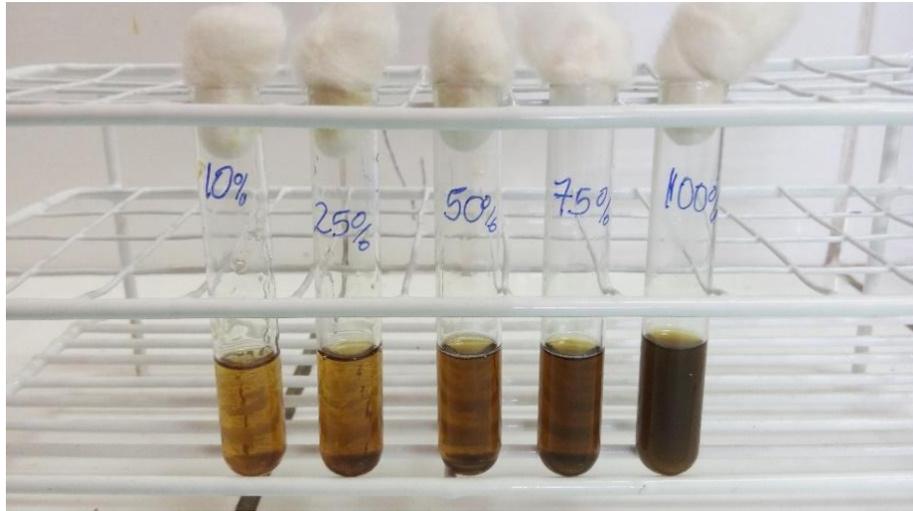


Foto N° 8: Lectura de la turbidez



Foto N° 9: Espectrofotómetro



Foto N° 10: Lectura de UFC del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 42mg/ml (10%)

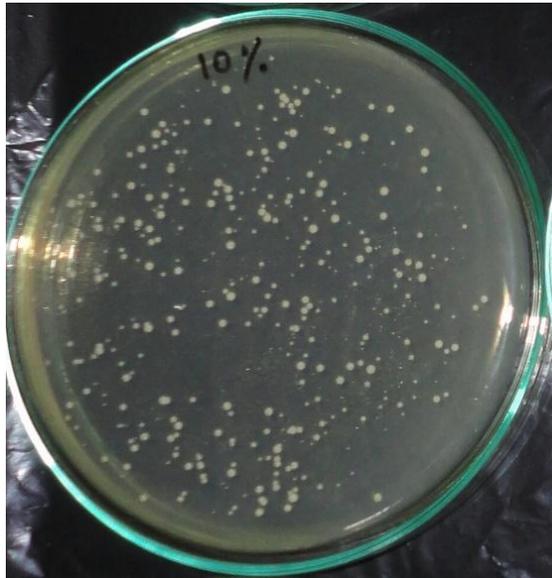


Foto N° 11: Lectura de UFC del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 105mg/ml (25%)

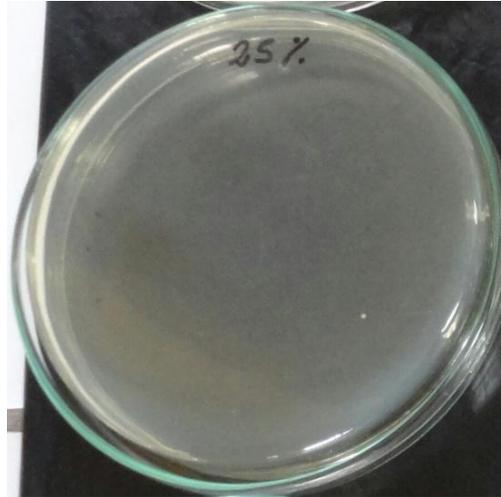


Foto N° 12 Lectura de UFC del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 210mg/ml (50%)

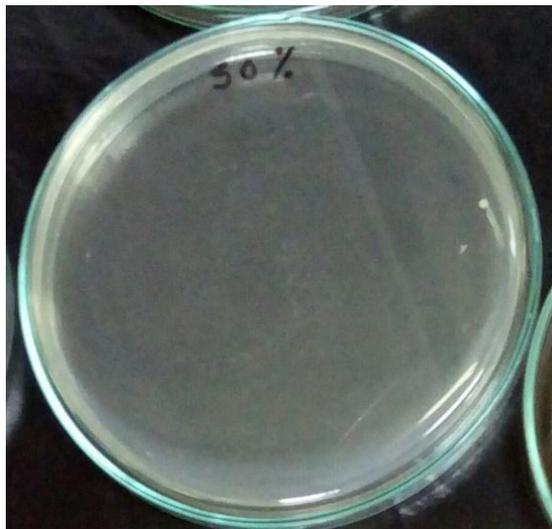


Foto N° 13: Lectura de UFC del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. (guayaba) a 420mg/ml (100%)

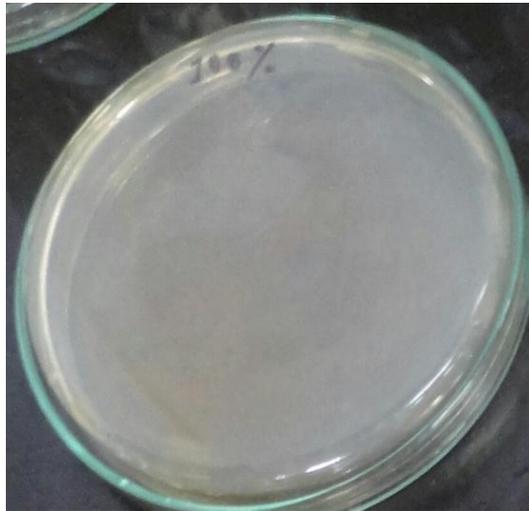


Foto N° 14: UFC de cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sin Tx (1.5×10^8)



Anexo N° 6

Constancia Taxanómica de *Psidium guajava* L. (guayaba)



Herbarium Truxillense (HUT)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo - Perú



Constancia N° 121 – 2018- HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da Constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- Clase: Equisetopsida
- Subclase: Magnoliidae
- Superorden: Rosanae
- Orden: Myrtales
- Familia: Myrtaceae
- Género: *Psidium*
- Especie: *P. guajava* L.
- Nombre común: "guayaba"

Muestra alcanzada a este despacho por VILLANUEVA LEYVA GOLY ZULEMA, con ID: 121603, identificado con DNI N° 18149991, con domicilio legal Jr. Madre de Dios 232 4ta Etapa, Urb. Palermo-Trujillo; estudiante de la Facultad de Medicina Humana de La Universidad Privada Antenor Orrego; cuya determinación taxonómica servirá para el proyecto tesis titulado: "Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* L. "guayaba" sobre *Staphylococcus aureus*"

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 08 de enero del 2018



Dr. JOSE MOSTACERO LEON
Director del Herbario HUT

cc. Herbario HUT

E- mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com