

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS, QUÍMICAS, FÍSICA Y  
MATEMÁTICAS  
CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE CEPAS ATCC Y CEPAS AISLADAS DE *Escherichia coli* Y *Pseudomona aeruginosa*, Y DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD SUBAGUDA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE LA ESPECIE VEGETAL *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

**TESIS PRESENTADO POR:**

**Br. JAIME ARMANDO QUISPE TAPIA  
Br. DANNY JOSEPH QUIROGA ZANABRIA  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**ASESORA: M.Cs. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ  
CO-ASESORA: Mgt. YANET MENDOZA MUÑOZ**

**CUSCO-PERÚ  
2012**

**TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC**

## DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO PRODUCTO DE MI ESFUERZO A LA PERSONA MÁS IMPORTANTE DE MI VIDA, MI MADRE LIDIA ZANABRIA CAMA; LE DEDICO ESTE TRABAJO YA QUE NO SOLO REPRESENTA LA CULMINACION DE MI CARRERA PROFESIONAL, SINO QUE TAMBIEN REPRESENTA EL INICIO DE LA MISMA; LE DEDICO ESTE TRABAJO Y TODOS LOS LOGROS QUE TENGA EN LA VIDA PUES SIEMPRE ME DIO SU COMPRESION, AMOR, FUERZAS, CONFIANZA PACIENCIA Y APOYO EN CADA UNA DE LAS COSAS QUE DECIDI HACER Y A PESAR QUE YA NO PUEDO VERLA NI OIR SU VOZ, ELLA SIEMPRE ESTA PRESENTE PUES ESTOY SEGURO DE QUE NUNCA ME DEJO SOLO.

DEDICO TAMBIEN ESTE TRABAJO A MIS HERMANOS SHEILA QUIROGA ZANABRIA Y MIGUEL QUIROGA ZANABRIA QUE ME APOYARON SIEMPRE Y NUNCA ME DEJARON SOLO A PESAR DE LAS ADVERSIDADES Y PROBLEMAS QUE LA VIDA NOS PUSO ELLOS SIEMPRE ME AYUDARON Y CONFIARON EN MI; PUES NO LOS DECEPCIONARE, ELLOS SON MIS EJEMPLOS DE TRABAJO DURO ASI COMO TAMBIEN DE FUERZA, LES AGRADEZCO MUCHO TODA LA AYUDA QUE ME BRINDARON Y AHORA ME TOCA DEMOSTRARLES QUE TODO SU ESFUERZO PARA CONMIGO DARA FRUTOS.

FINALMENTE DEDICO ESTE TRABAJO A MI ENAMORADA LIZ INDIRA OLIVERA DELGADO QUE SE VOLVIO PARTE DE MI ALEGRIA Y FORTALEZA, BRINDANDOME SU AMOR, COMPRESION, APOYO Y AYUDA EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS.

DANNY JOSEPH QUIROGA ZANABRIA

## DEDICATORIA

A MI MADRE HILDA. POR SU APOYADO EN TODO MOMENTO, POR SUS CONSEJOS, POR SU EJEMPLO DE PERSEVERANCIA Y CONSTANCIA, POR SUS VALORES, POR LA MOTIVACIÓN CONSTANTE QUE ME HA PERMITIDO SER UNA PERSONA DE BIEN, POR SER LA PERSONA QUE ME ENSEÑO A SER QUIEN SOY, PERO MÁS QUE NADA, POR SU AMOR INCONDICIONAL.

A MI PADRE MARIANO. POR LOS EJEMPLOS DE PERSEVERANCIA Y CONSTANCIA QUE LE CARACTERIZAN Y QUE ME HA INFUNDADO SIEMPRE, POR EL VALOR MOSTRADO PARA SALIR ADELANTE, POR SER MI GUÍA Y POR TODO SU AMOR.

A MIS HERMANOS HENRY Y FRANK POR SU CONSTANTE ALIENTO PARA MI SUPERACIÓN PERSONAL Y PORQUE SIEMPRE ME HAN APOYADO INCONDICIONALMENTE.

A MIS ABUELOS, DOROTEA, EUGENIO, ASUNTA Y JOSE POR SER FUENTE DE MOTIVACIÓN Y POR DEJARME LA HERENCIA MÁS IMPORTANTE: LA FAMILIA Y LA EDUCACIÓN.

A MIS FAMILIARES TIOS, TIAS, PRIMOS, PRIMAS, POR SU APOYO INCONDICIONAL.

ATENTAMENTE.

JAIME ARMANDO QUISPE TAPIA

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco, por recibirnos en sus aulas y apoyarnos en la conclusión de nuestra profesión.

A la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica por facilitarnos sus laboratorios y así poder finalizar con nuestra investigación.

A los Docentes de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica por brindarnos sus conocimientos, que el día de hoy forman parte de nuestro desarrollo personal y profesional.

A Nuestra asesora M. Cs. Carla Del Carpio Jiménez por brindarnos su ayuda, aliento y apoyo en todo momento durante la realización de nuestra tesis.

A Nuestra Co-Asesora Mgt. Yanet Mendoza Muñoz, por su apoyo ayuda en el análisis hematológico y bioquímico.

Al Departamento de Farmacia del Hospital Regional del Cusco, que nos dio su ayuda incondicional proporcionándonos materiales de trabajo así como valiosos consejos.

A Nuestros Amigos Edson Huayhua y Cintya Olvea, sin ellos no hubiera sido posible la recolección de la especie vegetal.

Y a todos los amigos que nos apoyaron y dieron aliento para finalizar con este trabajo, muchas gracias a todos por su tiempo y ánimos de colaboración desinteresada.

## ABREVIATURAS

- ATCC: American Type Culture Collection.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- BHI: Brain Heart Infusion.
- CB: Contracciones basales.
- cm: Centímetro.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria.
- dL: decilitro.
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- D.O.: Densidad óptica.
- et al.: y otros (et alli).
- FDA: Food and Drug Administration.
- g: Gramo.
- IgA: Inmunoglobulina A
- I M: Intramuscular.
- i.p.: Intra peritoneal.
- IV: intravenosa.
- Kg: Kilogramo.
- L: Litro.
- m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar.
- mg: Miligramo.
- mL: Mililitro.
- nm: Nanómetro.
- p.c.: peso corporal.
- pH: potencial de hidrogeno.
- PMID: PubMed Unique Identifier.
- ppm: partículas por millón.
- PudMed: base de datos Medline.
- Q.P.: Químicamente puro.
- rpm: Revoluciones por minuto.
- s.c.: sub cutánea.
- sp.: especie.

- UI: Unidades internacionales.
- $\mu\text{g}$ : Microgramo.
- $\mu\text{L}$ : Microlitro.

## INDICE GENERAL

<b>CAPITULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ASPECTOS GENERALES</b> .....	<b>2</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA .....	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION .....	3
1.3.1. OBJETIVOS GENERALES .....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	3
1.4 LIMITACION DE LA INVESTIGACION .....	4
1.5 JUSTIFICACION .....	4
1.6 HIPOTESIS .....	5
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>6</b>
<b>2. MARCO TEORICO CONCEPTUAL</b> .....	<b>7</b>
2.1 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Psidium guajava</i> "SAHUINTO" .....	7
2.1.1 ESTADO DE LA CUESTION .....	7
2.1.2 ANTECEDENTES ETNOBOTANICOS .....	7
2.1.3 ANTECEDENTES FITOQUIMICOS .....	9
2.1.4 ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	12
2.1.5 ANTECEDENTES TOXICOLÓGICOS .....	13
2.2 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS .....	15
2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Psidium guajava</i> .....	15
2.2.1.1 CLASIFICACION TAXONÓMICA .....	15
2.2.1.2 SINONIMIAS DE NOMBRES DE ESPECIES CONOCIDAS Y NOMBRES COMUNES DE LA PLANTA .....	15
2.2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....	16
2.2.1.4 USOS MEDICINALES .....	17
2.2.1.5 METABOLITOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	17
2.2.2 INFECCIONES URINARIAS .....	19
2.2.2.1 DEFINICIÓN .....	19
2.2.2.2 EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGOS .....	19
2.2.2.3 PATOGENIA .....	20
2.2.2.4 PATOGENOS URINARIOS .....	21
2.2.2.5 TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES DEL URINARIO .....	21

2.2.3. DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO.....	22
2.2.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.2.3.2. <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	24
2.2.4. CRECIMIENTO BACTERIANO.....	25
2.2.4.1 CURVA DE CRECIMIENTO.....	27
2.2.4.2 EL CEPARIO.....	29
2.2.4.3 CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	30
2.2.4.4. MEDICION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	32
2.2.5. DEFINICION DE RESISTENCIA BACTERIANA.....	33
2.2.6 RESISTENCIA A LOS FARMACOS ANTIMICROBIANOS.....	34
2.2.7 DESCRIPCIÓN DEL ANTIBIÓTICO USADO COMO PATRÓN COMPARATIVO EN EL PRESENTE ESTUDIO (AMIKACINA) .....	35
2.2.8 TOXICIDAD.....	40
2.2.8.1 DEFINICION .....	40
2.2.8.2 CLASIFICACION DE ESTUDIOS DE TOXICIDAD.....	40
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>43</b>
<b>3 MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS.....	44
3.1.1 MATERIAL VEGETAL.....	44
3.1.2 MATERIAL MICROBIANO .....	44
3.1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	44
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	44
3.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	47
3.3.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	47
3.3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	47
3.4. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	52
3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS .....	52
3.4.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE.....	52
3.4.1.2 VARIABLE DEPENDIENTE.....	52
3.4.2. VARIABLES NO IMPLICADAS .....	57
3.4.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES .....	57
3.4.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	61
3.4.3.1 DEL MATERIAL VEGETAL .....	61

3.4.3.2 DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	61
3.5 PROCEDIMIENTO .....	61
3.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	61
3.5.2 DETERMINACION DE LA HUMEDAD .....	62
3.5.3 OBTENCION DEL EXTRACTO .....	62
3.5.3.1 PORCENTAJE DE EXTRACCION .....	64
3.5.3.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD .....	64
3.5.3.3 ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO .....	64
3.5.3.4 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHOLICO AL 70% DE <i>Psidium guajava</i> "Sahuinto" .....	65
3.5.4 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUB AGUDA .....	66
3.5.4.1 METODOLOGIA .....	66
3.5.4.2 ANÁLISIS TOXICOLÓGICO .....	67
3.5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	70
3.5.5.1 PRIMERA FASE .....	70
3.5.5.2 SEGUNDA FASE .....	74
3.6 PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN .....	76
CAPITULO IV .....	78
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	79
4.1 DE LOS ENSAYOS FITOQUÍMICOS PRELIMINARES DE <i>Psidium guajava</i> .....	79
4.1.1 PORCENTAJE DE HUMEDAD .....	79
4.1.2 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN .....	80
4.1.3 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD .....	81
4.1.4 PRUEBAS FITOQUÍMICAS CUALITATIVAS .....	82
4.1.5 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i> .....	83
4.2. DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	84
4.2.1 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO .....	84
4.2.1.1 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> .....	84
4.2.1.2 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	86
4.2.2 DEL ENSAYO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA .....	91

4.2.2.1. DE LA PRUEBA PILOTO .....	91
4.2.2.2. DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ANTIBACTERIANAS .....	92
4.2.2.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA USANDO LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ESTANDARIZADAS .....	95
4.2.2.3.1 DE LA CEPA ATCC Y CEPAS AISLADAS DE <i>Escherichia coli</i> .....	95
4.2.2.3.2 DE LA CEPA ATCC Y CEPA AISLADA DE <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	104
4.3 DE LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUB-AGUDA .....	114
4.3.1 DEL PESO DE LAS RATAS .....	114
4.3.2 DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS .....	118
4.3.2.1 DETERMINACION DEL HEMATOCRITO .....	118
4.3.2.2 DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA .....	120
4.3.2.3 DETERMINACION DEL RECUENTO DE GLOBULOS ROJOS .....	122
4.3.2.4 DETERMINACION DEL RECUENTO DE GLOBULOS BLANCOS .....	124
4.3.2.5 DETERMINACION DEL RECUENTO DIFERENCIAL DE GLOBULOS BLANCOS .....	126
4.3.3 DE LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS HEPATICOS .....	128
4.3.3.1 DETERMINACION DE TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALACETICA .....	128
4.3.3.2 DETERMINACION DE LA TRANSAMINASA GLUTAMICO PIRUVICA .....	129
4.3.3.3 DETERMINACION DE LA FOSFATASA ALCALINA .....	131
4.3.4 DE LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS RENALES .....	133
4.3.4.1 DETERMINACIÓN DE LA CREATININA .....	133
4.3.4.2 DETERMINACIÓN DE UREA .....	134
4.3.5 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS DE LAS RATAS .....	137
 CONCLUSIONES .....	 140
RECOMENDACIONES .....	143
REFERENCIAS BIBLIOGRAFIAS .....	145
ANEXOS .....	152

## LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 3.1 Resumen de variables de la actividad antibacteriana .....	59
CUADRO N° 3.2 Resumen de variables de la toxicidad subaguda .....	60
CUADRO N° 3.1 Análisis Fitoquímico cualitativo .....	64
CUADRO N° 3.3 Análisis microbiológico .....	65
CUADRO N° 3.4 grupos de experimentación para la toxicidad subaguda .....	66
CUADRO N° 4.1 Determinación del porcentaje de humedad .....	79
CUADRO N° 4.2 Determinación del porcentaje de extracción .....	80
CUADRO N° 4.3 Pruebas de solubilidad .....	81
CUADRO N° 4.4 Resultados del análisis fitoquímico .....	82
CUADRO N° 4.5 Resultados del control microbiológico .....	83
CUADRO N° 4.6 Absorbancias para la curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	84
CUADRO N° 4.7 Absorbancias para la curva de crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	86
CUADRO N° 4.8 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico al 70% de las hojas de <i>Psidium guajava</i> (Sahuinto) obtenidas en la prueba piloto .....	91
CUADRO N° 4.9 Concentraciones estandarizadas para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de <i>Psidium guajava</i> "Sahuinto" .....	94
<b>DE LAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i></b>	
CUADRO N° 4.10 Halos de inhibición de la cepa ATCC de <i>Escherichia coli</i> .....	95
CUADRO N° 4.11 Halos de inhibición para AMIKACINA .....	96
CUADRO N° 4.12 Halos de inhibición de las cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> .....	97
CUADRO N° 4.13 Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de los halos de inhibición producidos a diferentes concentraciones del extracto de <i>Psidium guajava</i> "Sahuinto" .....	98
CUADRO N° 4.14 Anova unifactorial .....	100
CUADRO N° 4.15 Agrupación en sub conjuntos .....	101
CUADRO N° 4.16 Prueba t-test (Test de Student) .....	102
CUADRO N° 4.17 Comparación entre halos de inhibición producidos por el	

fármaco patrón Amikacina .....	103
<b>CUADRO N° 4.18</b> Concentraciones de extracto con actividad antibacteriana similar .....	104
<b>DE LAS CEPAS DE <i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	
<b>CUADRO N° 4.19</b> halos de inhibición de la cepa ATCC de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	104
<b>CUADRO N° 4.20</b> Halos de inhibición para AMIKACINA .....	105
<b>CUADRO N° 4.21</b> Halos de inhibición de la cepa aislada de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	106
<b>CUADRO N° 4.22</b> Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de los halos de inhibición producida a diferentes concentraciones del extracto de <i>psidium guajava</i> "sahuinto" .....	107
<b>CUADRO N° 4.23</b> Anova unifactorial .....	108
<b>CUADRO N° 4.24</b> Agrupación en sub conjuntos hecha a partir de la prueba post-hoc o post test sheffe .....	109
<b>CUADRO N° 4.25</b> Prueba t-test (test de student) .....	110
<b>CUADRO N° 4.26</b> Comparación entre halos de inhibición producidos por el fármaco patrón Amikacina .....	111
<b>CUADRO N° 4.27</b> Concentraciones de extracto con actividad antibacteriana similar .....	111
<b>CUADRO N° 4.28</b> Recolección de peso de las ratas para el estudio de la toxicidad subaguda .....	114
<b>CUADRO N° 4.29</b> Cuadro Anova para comparación de pesos .....	116
<b>CUADRO N° 4.30</b> Prueba post-hoc o post-test scheffe .....	117
<b>CUADRO N° 4.31</b> Resultados de hematocrito .....	118
<b>CUADRO N° 4.32</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de hematocrito de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	119
<b>CUADRO N° 4.33</b> Resultados de hemoglobina .....	120
<b>CUADRO N° 4.34</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de hemoglobina de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	120
<b>CUADRO N° 4.35</b> Prueba Post-Hoc o Post Test Scheffe para la comparación múltiple de la hemoglobina de las ratas de acuerdo a las distintas	

concentraciones del extracto y grupo control .....	121
<b>CUADRO N° 4.36</b> Resultados del Recuento de Glóbulos Rojos .....	<b>122</b>
<b>CUADRO N° 4.37</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación del recuento de glóbulos rojos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>123</b>
<b>CUADRO N° 4.38</b> Resultados del Recuento de Glóbulos Blancos .....	<b>124</b>
<b>CUADRO N° 4.39</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación del recuento de glóbulos blancos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>124</b>
<b>CUADRO N° 4.40</b> Resultados del recuento diferencial de glóbulos blancos .....	<b>126</b>
<b>CUADRO N° 4.41</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de Neutrófilos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>127</b>
<b>CUADRO N° 4.42</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación del linfocitos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>127</b>
<b>CUADRO N° 4.43</b> Resultados de Transaminasa Glutámico Oxalacética .....	<b>128</b>
<b>CUADRO N° 4.44</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>128</b>
<b>CUADRO N° 4.45</b> Resultados de transaminasa glutámico piruvica .....	<b>129</b>
<b>CUADRO N° 4.46</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>130</b>
<b>CUADRO N° 4.47</b> Prueba Post-Hoc o Post Test de Scheffé para la comparación múltiple de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) de las ratas de acuerdo a las distintas concentraciones del extracto y grupo control .....	<b>130</b>
<b>CUADRO N° 4.48</b> Resultados de Fosfatasa Alcalina .....	<b>131</b>
<b>CUADRO N° 4.49</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la fosfatasa alcalina de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	<b>132</b>
<b>CUADRO N° 4.50</b> Resultados de Creatinina .....	<b>133</b>
<b>CUADRO N° 4.51</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la creatinina de las ratas sometidas a distintas dosis por	

kilogramo de peso y grupo control .....	133
<b>CUADRO N° 4.52</b> Resultados de Urea .....	134
<b>CUADRO N° 4.53</b> Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de urea de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control .....	135
<b>CUADRO N° 4.54:</b> Prueba Post-Hoc o Post Test de Scheffé para la comparación múltiple de Urea de las ratas de acuerdo a las distintas concentraciones del extracto y grupo control .....	135
<b>CUADRO 4.55</b> Resultados del análisis histopatológico .....	137

### LISTA DE GRAFICAS

<b>GRAFICA N° 1.1</b> Halos de inhibición de Extractos de <i>Psidium guajava</i> y distintos Flavonoides aislados de la misma .....	9
<b>GRAFICA N° 1.2</b> Estructura química de la Quercetina .....	10
<b>GRAFICA N° 1.3</b> Estructura química del Lupeol y el Acido Betulinico .....	11
<b>GRAFICA N° 2.1</b> <i>Psidium guajava</i> L. ....	16
<b>GRAFICO N° 2.2</b> <i>Escherichia coli</i> .....	22
<b>GRAFICO N° 2.3</b> <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	24
<b>GRAFICO N° 2.4</b> Curva de crecimiento .....	27
<b>GRAFICO N° 2.5</b> Métodos para el crecimiento bacteriano en placas .....	31
<b>GRAFICO N° 2.6</b> Medidas en el espectrofotómetro para la determinación de la curva de crecimiento .....	32
<b>GRAFICO N° 2.7</b> Estructura de los aminoglucosidos .....	35
<b>GRÁFICO N° 4.1</b> Curva de crecimiento de las cepas ATCC y cepas aisladas de <i>Escherichia coli</i> .....	85
<b>GRÁFICO N° 4.2</b> Curva de crecimiento de la cepa ATCC y cepa aislada de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	87
<b>GRAFICO N° 4.3</b> Límite inferior y límite superior de los halos de inhibición .....	99
<b>GRAFICO N° 4.4</b> pesos de las ratas en el transcurso de la experimentación .....	115

## RESUMEN

Esta investigación tiene como objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* L. "SAHUINTO", sobre cepas ATCC y cepas aisladas a partir de urocultivos positivos de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y determinar la toxicidad subaguda del mismo extracto en ratas Holtzman.

Se usaron las hojas de *Psidium guajava* y el extracto se obtuvo por maceración, la actividad antibacteriana se determinó por el método de pozos excavados empleando como antibiótico patrón la Amikacina a una concentración de 30ug/100uL; para la toxicidad subaguda se utilizó 20 ratas macho Holtzman empleando el Protocolo estándar 28 días (a la cual se le realizó algunas modificaciones) que consiste en la administración del extracto a diferentes dosis por vía oral a los grupos de experimentación durante 28 días procediendo finalmente a su sacrificio, análisis sanguíneo e histopatológico de corazón riñón e hígado.

Respecto a la cepa ATCC de *Escherichia coli*, el fármaco patrón Amikacina presentó un halo de inhibición de 28 mm, mientras que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* presentó el halo de inhibición mayor (de 15mm) a una concentración de 248.4mg/100uL; En cuanto a las cepas aisladas de *Escherichia coli* se tuvo un halo de inhibición de 27.8 mm por parte del fármaco patrón Amikacina y por parte del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* se tuvo un halo de inhibición de 29.90 mm a la concentración de 276mg/100uL. Respecto a la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa*, el fármaco patrón Amikacina presentó un halo de inhibición de 26 mm, mientras que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* presentó el halo de inhibición mayor (de 28mm) a una concentración de 219.2mg/100uL; En cuanto a la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* se tuvo un halo de inhibición de 22 mm por parte del fármaco patrón Amikacina, y por parte del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* se tuvo el mayor halo de inhibición (de 11.66 mm) a la concentración de 54.8 mg/100uL. De la determinación de la toxicidad subaguda del extracto, se observó necrosis renal media y un proceso de regeneración celular a nivel de hepatocitos en los animales de experimentación tratados con una dosis de 200mg/Kg de extracto.

Se concluye que el extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* L. presenta actividad antibacteriana elevada frente a cepas aisladas de *Escherichia coli* y frente a la

cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa*, así como también presenta toxicidad subaguda a la dosis de 200mg/Kg en animales de experimentación.

**Palabras clave:**

*Psidium guajava*, Actividad Antibacteriana, Toxicidad Subaguda, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*.

## SUMMARY

This research aims to determine the in-vitro antibacterial activity of 70% Hydroalcoholic dry extract of *Psidium guajava* L. "SAHUINTO" against *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa* ATCC strains and isolated strains from urine cultures of patients treated at "Hospital Regional del Cusco" and also determine the subacute toxicity of the extract in Holtzman rats.

*Psidium guajava* leaves were used and the extract was obtained by maceration, antibacterial activity was determined by the method of wells drilled using Amikacin as the standard antibiotic at a concentration of 30ug/100uL; for subacute toxicity was used 20 Holtzman male rats using the "28 days standard protocol", which involves the administration of the extract at different oral doses to experimental groups for 28 days, proceeding finally to slaughter, blood test and histopathological analysis of heart kidney and liver.

In regard to *Escherichia coli* ATCC strain, Amikacin showed an inhibition halo of 28 mm, while the 70% hydroalcoholic dry extract of *Psidium guajava* showed the greatest inhibition zone (15mm) at a concentration of 248.4mg / 100uL; As regards *Escherichia coli* isolated strains they showed an inhibition halo of 27.8 mm by the standard drug amikacin and the 70% hydroalcoholic dry extract of *Psidium guajava* showed inhibition zone of 29.90 mm at a concentration of 276mg/100uL. Regarding the *Pseudomona aeruginosa* ATCC strain, Amikacin showed an inhibition zone of 26 mm, while the 70% hydroalcoholic dry extract of *Psidium guajava* presented the largest inhibition zone (28 mm) at a concentration of 219.2mg / 100uL; with respect to *Pseudomona aeruginosa* isolated strain, it showed an inhibition halo of 22 mm by standard amikacin drug, while the 70% hydroalcoholic dry extract of *Psidium guajava* showed the largest inhibition zone (11.66 mm) at a concentration of 54.8 mg/100uL. In regard to subacute toxicity, renal necrosis and cell regeneration process was observed at the level of hepatocytes in experimental animals treated with a dose of 200mg/Kg of extract.

It is concluded that 70% hidroalcohólic dry extract of *Psidium guajava* L. has high antibacterial activity against *Escherichia coli* isolated strains and against *Pseudomona aeruginosa* ATCC strain and subacute toxicity occurs at the dose of 200mg/Kg in experimental animals.

**Key words:** *Psidium guajava*, *Antibacterial activity*, *Subacute Toxicity*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*.

## INTRODUCCION

El uso exagerado e inapropiado de los antibióticos ha favorecido un aumento importante en la prevalencia de microorganismos patógenos resistentes a múltiples fármacos (55); es por esto que la investigación de plantas medicinales es muy importante.

La especie vegetal *Psidium guajava* L. contiene una serie de compuestos químicos como compuestos fenólicos (taninos y flavonoides), terpenos (triterpenoides) y quercetina que según distintas investigaciones poseen actividad antibacteriana, antidiarreica, antituberculosa, antidiabética, antipalúdica, citotóxica y antioxidante. (2), sus hojas tienen una larga historia de usos tradicionales en Egipto y a nivel mundial como antitusígeno, antidiarreico, en el control de la hipertensión, obesidad, y el control de la diabetes mellitus. También se encontró que el extracto de las hojas posee actividad anticestodal, analgésica, propiedades antiinflamatorias, antimicrobiana, hepatoprotectora y antioxidante. (56)

Existen estudios sobre la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Psidium guajava* que demuestran su eficacia frente a distintas cepas bacterianas (2), (4), (9), (18), (56) pero en este caso se intenta determinar la eficacia de dicha especie frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC y *Pseudomona aeruginosa* ATCC y también frente a cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* aisladas a partir de urocultivos positivos obtenidos de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco; teniendo en cuenta el aumento de la resistencia bacteriana con el pasar de los años; esta investigación también contribuye proporcionando y actualizando datos que puedan ser aplicables a nuestra realidad. No han sido encontradas investigaciones respecto a la toxicidad subaguda de la especie vegetal en estudio, siendo probablemente esta investigación la primera en aportar información de este tipo con el fin de demostrar si la administración continua durante 28 días por vía oral del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" produce algún tipo de toxicidad realizando análisis hematológicos e histopatológicos.

# ***CAPÍTULO I***

## CAPITULO I

### 1. ASPECTOS GENERALES

#### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La especie vegetal *Psidium guajava* L. se ha usado como antidiarreico en muchos países de América así como también en África (1) por sus propiedades antiespasmódicas y antimicrobianas (2).

La etiología de la diarrea aguda puede deberse a infección por virus o bacterias; entre las bacterias más comunes que producen diarreas tenemos a *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campilobacter*, y especies de *Yersinia* (3); en cuanto a los agentes más frecuentes que producen infecciones del tracto urinario tenemos a *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomona aeruginosa* y *Proteus sp.* En el Perú son pocos los estudios realizados, pero se tiene como agente causal más frecuente a *Escherichia coli* con un 53.3% (4).

Como vemos la Infección del Tracto Urinario y la Diarrea tienen en común como agente etiopatológico a *Escherichia coli*, es por esta razón que se decidió determinar la actividad antibacteriana in-vitro en bacterias aisladas a partir de urocultivos positivos; el estudio de toxicidad subaguda nos ayuda a ampliar la información sobre la especie vegetal en estudio, este tipo de datos es muy importante en especial para futuros investigadores que deseen realizar más estudios sobre *Psidium guajava* L.

La especie vegetal *Psidium guajava* cuenta con estudio de toxicidad aguda con dosis únicas de 250, 500, 1000 y 2000 mg/kg/p.c. en los cuales se encuentran ausencia de toxicidad en el ensayo clásico de toxicidad aguda y en el ensayo de clases tóxicas aguda (CTA) con una única dosis 2000 mg/kg/p.c. (6), la DL<sub>50</sub> de los Extractos Secos Hidroalcohólicos al 70% de las Hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" está por encima de 5000mg/kg por lo que carece de interés práctico. (9) Como en ninguno de los estudios de toxicidad aguda se encontró indicios de que el extracto de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" sea tóxico en dosis únicas nos pareció importante realizar un estudio de toxicidad subaguda que complemente y que corrobore que el extracto de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" no produce ningún tipo de toxicidad.

Esta investigación tiene como fin determinar la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Psidium guajava* (recolectada en la ciudad de Abancay-Apurímac) contra cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* ATCC y también sobre cepas aisladas a partir de urocultivos positivos de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco. Además de determinar la toxicidad sub aguda de la especie vegetal *Psidium guajava* en ratas Holtzman debido al amplio uso que esta especie vegetal tiene a nivel mundial.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

- 1.- ¿Presentará el extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" actividad antibacteriana frente a cepas ATCC y cepas aisladas de bacterias gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*?
- 2.- ¿Presentará el extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" toxicidad subaguda sobre ratas albinas?

## **1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.3.1. OBJETIVOS GENERALES**

1. Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" frente a cepas ATCC y cepas aisladas de bacterias gram negativas causantes de infecciones del tracto urinario (*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*).
2. Determinar la toxicidad subaguda del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" sobre ratas albinas.

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Obtener el extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO".
2. Obtener los resultados de la prueba de solubilidad, análisis fitoquímico cualitativo, porcentaje de humedad y porcentaje de extracción del extracto seco hidroalcohólico de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto"
3. Determinar las curvas de crecimiento bacteriano de las cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y compararlas con las curvas de crecimiento de las cepas ATCC de dichas especies.

4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" frente a cepas ATCC de: *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.
5. Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" versus un antibacteriano patrón (Amikacina).
6. Determinar los parámetros hematológicos bioquímicos e histopatológicos luego de la administración por vía oral del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" durante un periodo de 28 días en ratas de experimentación para determinar la toxicidad subaguda

#### 1.4 LIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1. En todo el periodo de experimentación solo se obtuvo una cepa de *Pseudomona aeruginosa* aislada a partir de un urocultivo positivo de un paciente atendido en el Hospital Regional.
2. Respecto al estudio de toxicidad sub aguda, no se pudo determinar los valores iniciales de los parámetros hematológicos y bioquímicos de las ratas de experimentación debido a que el volumen de sangre obtenido fue insuficiente para realizar dichas pruebas.
3. El análisis histopatológico solo se realizó en tres órganos de las ratas sacrificadas al concluir el estudio debido al elevado costo.

#### 1.5 JUSTIFICACIÓN

El aumento inevitable de la resistencia bacteriana y la preferencia en el uso de plantas medicinales por gran parte de la población nos llevan a la realización de esta investigación que aporta información sobre la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Psidium guajava* sobre cepas bacterianas que producen infecciones del tracto urinario (*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*); y ya que en este estudio se realiza la comparación entre cepas bacterianas aisladas a partir de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco y cepas ATCC, esto nos permite ver las diferencias que existen entre este tipo de cepas, siendo el aporte de información no solo para el ámbito microbiológico sino que también para la comunidad médica. El estudio Toxicológico, amplía la información en cuanto a los efectos tóxicos que podría producir

el consumo del extracto de *Psidium guajava* por un periodo prolongado, esto con el fin de proveer información para posibles investigadores que deseen continuar con los estudios de esta especie vegetal.

#### **1.6 HIPOTESIS**

1. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" presenta actividad antibacteriana in vitro frente a cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* principales causantes de las infecciones urinarias.
2. El extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto", no presenta toxicidad subaguda.

# ***CAPÍTULO II***

## **2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL**

### **2.1 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

#### **2.1.1.- ESTADO DE LA CUESTIÓN**

El estudio de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO", a nivel mundial es muy amplio abarcando diversas propiedades que posee esta especie vegetal además de estudios que buscan optimizar la producción de los frutos, debido al alto contenido de vitamina C que esta posee. Investigaciones farmacológicas indican que la corteza, fruto y hojas poseen actividad antibacteriana, hipoglucemiante, anti-inflamatoria, analgésica, antipirética, espasmolítico y depresor del Sistema Nervioso Central. (8)

Se determino la actividad antibacteriana in-vitro de *Psidium guajava* contra cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*, dicha especie fue recolectada en la Provincia de "Abancay ", en el Departamento de Apurimac, a 2377 m.s.n.m. (9), a continuación mostramos mas antecedentes:

#### **2.1.2.- ANTECEDENTES ETNOBOTANICOS**

**NUBILDE MARTÍNEZ, Las Plantas Medicinales, Boletín de Nutrición Infantil "CANIA" Nº8, VENEZUELA 2003**

De esta planta (*Psidium guajava* L.) se utiliza la corteza del tallo, hojas y frutos, los cuales contienen un flavonoide, la quercetina, que podría ser el responsable del efecto anticolinérgico gastrointestinal lo cual le confiere una actividad antidiarreica inespecífica.

Según el uso popular, es un fruto con alta concentración de potasio y de vitamina C. Su exceso puede producir dolor de cabeza y sus hojas quitan la diarrea. Tiene efecto astringente, afrodisíaco, antiespasmódico, emenagogo, antiescorbútico y se recomienda su uso en caso de diarrea, malestar estomacal, faringitis, impotencia, malestar de la menstruación, quemaduras, sudoración excesiva y várices.

**CALIXTO COTOS MARIA ROSARIO; Plantas Medicinales Usadas en Odontología; Volumen 3; N° 2; Facultad de Odontología USMP; Producción Científica, Perú 2006**

Menciona que las hojas de *Psidium guinensis* (Guayaba) son utilizadas como analgésicos dentales en nuestro país. Previa masticación de estas mismas.

**GUTIERREZ RM, MITCHEL, SOLIS RV.; *Psidium guajava*: Una revisión de los usos tradicionales, su fotoquímica y farmacología; J Ethnopharmacol. 2008 Mexico; 117(1):1-27, Citado en PubMed PMID: 18353572**

Un estudio de la literatura muestra que *P. guajava* es conocido principalmente por sus propiedades antiespasmódicas y antimicrobianas en el tratamiento de la diarrea y la disentería. También se ha utilizado ampliamente como un agente hipoglucemiante.

### 2.1.3 ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

METWALLY AM, OMAR AA, HARRAZ FM, EL SOHAFY SM; Investigación Fitoquímica y Actividad Antimicrobiana de Hojas de *Psidium guajava*; PharmacognMag. 2010 Egipto; 6(23):212-8.; Citado en PubMed PMID: 20931082

Las hojas de *Psidium guajava* L. fueron sometidas a extracción, fraccionamiento y aislamiento de flavonoides, cinco flavonoides fueron aislados los cuales son: Quercetina, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosido, quercetina-3-O- $\beta$ -D-arabinopiranosido, quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucosido y quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosido. Quercetina-3-O- $\beta$ -D-arabinopiranosid fue aislado por primera vez de las hojas. Se probó la actividad antimicrobiana de estos componentes contra cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* teniendo los siguientes resultados:

**GRAFICA Nº1.1 Halos de inhibición de Extractos de *Psidium guajava* y distintos Flavonoides aislados de la misma**

Dry extract/isolate	Inhibition zone (IZ) in mm	
	Bacteria	
	Gram negative	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Aq. ext.	16	15
16% ethan.	17	15
50% ethan.	17	16
95% ethan.	17	15
P.E.	19	—
Chloroform.	20	—
Et. Ac.	15	—
But.	—	—
Quercetin	17	18
Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	17	—
Quercetin-3-O- $\beta$ -D-arabinopyranoside	20	—
Ampicillin (10 $\mu$ g/disk)	11	—

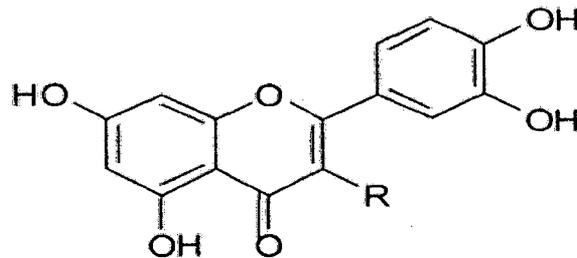
FUENTE: METWALLY AM et al. 2010

Como vemos la determinación de la actividad antimicrobiana se realizó con distintas concentraciones del extracto de *Psidium guajava* L. y también con los flavonoides aislados. Se usó el método de pozos excavados realizando pozos de 8mm de diámetro; doce miligramos de cada extracto fue diluido en 1ml de dimetilformamida.

Los resultados muestran que la Quercetina y sus glicosidos tienen fuerte actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*; pero solo la Quercetina tiene actividad contra ambas cepas bacterianas.

Esto explica el uso tradicional de esta especie vegetal como bactericida, en tos, diarrea y para aliviar úlceras orales y encías inflamadas.

**GRAFICA N°1.2 Estructura química de la Quercetina**



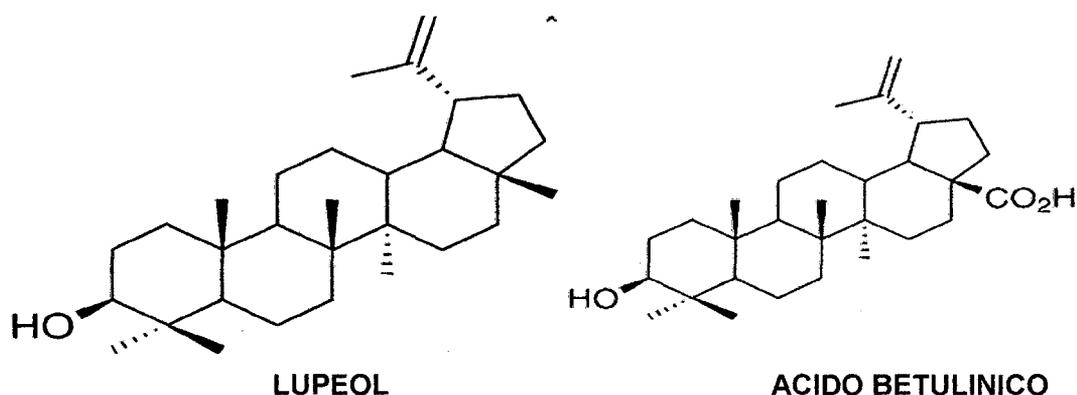
**QUERCETINA: R=OH**

**FUENTE: METWALLY AM, et al. 2010**

P. GHOSH, A. MANDAL, P. CHAKRABORTY, M. G. RASUL, MADHUMITA CHAKRABORTY, Y A. SAHA.; Triterpenoides de *Psidium guajava* con actividad biocida; Indian J Pharm 2010;72(4): 504–507; Citado en PubMed PMID: 21218065

Se presenta aquí, el aislamiento de dos triterpenoides, el ácido betulínico y el lupeol del extracto de hojas de *Psidium guajava* y sus posibles actividades antimicrobianas y fitotóxicas. Todas las estructuras de los compuestos aislados fueron confirmados por espectros (IR, RMN) el análisis y la comparación con los informes de la literatura.

### GRAFICA N°1.3 Estructura química del Lupeol y el Acido Betulinico



FUENTE: P. GHOSH, A. *et al*, 2010

MARQUINA V, ARAUJO L, RUÍZ J, RODRÍGUEZ-MALAVÉ A, VIT P. "Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.)" Volumen 58; Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad de los Andes, VENEZUELA 2008 [acceso 19 diciembre 2011]; Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n1/art14.pdf>

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es una fruta tropical de gran aceptación en los trópicos, donde se consume fresca y procesada. En este trabajo se comparó la acidez libre, el pH, el contenido de cenizas, nitrógeno y la humedad, junto con el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de la piel, el casco y la pulpa de la fruta fresca, y de la pulpa procesada y la mermelada de guayaba. El mayor contenido de polifenoles fue encontrado para la piel de la guayaba (10,36 g/100 g piel) y el menor en la mermelada (1,47g/ 100g mermelada), expresados en base seca. Se encontró que la

capacidad antioxidante de la piel fue diez veces superior a la de la pulpa, y la de la mermelada el doble que la del casco.

#### 2.1.4 ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

**ADRIANA M. NEIRA-GONZÁLEZ, MARTHA B. RAMÍREZ-GONZÁLEZ. Actividad Antibacteriana de Extractos de dos Especies de Guayaba Frente A *Streptococcus mutans* Y *Escherichia coli*"; Actual Biol. Colombia 2005**

Se evaluó la actividad antimicrobiana de varios extractos de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* Sw contra las bacterias *Streptococcus mutans* ATCC 31089, aislada de paciente y *Escherichia coli* 011-A8. Los resultados obtenidos indican alta actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos crudos y las fracciones acetato de etilo a una concentración de 400 ug/ul.

**BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, MEXICO 2009 [acceso 15 enero 2012]; Disponible en:**

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7651>

Se ha confirmado la actividad antiespasmódica de extractos acuosos y liposolubles de las hojas de guayaba en íleon de cobayó, inhibiéndose el peristaltismo. Probada in vivo, en el ratón, esta planta disminuye de manera significativa el tránsito intestinal. También se ha demostrado que un extracto etanólico (al 80%) y la fracción liposoluble del extracto metanólico de las hojas administrados por vía oral, el primero y por vía intraperitoneal en segundo, ejercen una actividad sedante en ratón. Así mismo se ha detectado la actividad antibacteriana in vitro contra *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* y los extractos liposoluble y metanólico de las hojas inhiben el crecimiento in vitro a *Plasmodium falciparum*.

DHIMAN A, NANDA A, AHMAD S, NARASIMHAN B.; **Actividad antimicrobiana in-vitro del extracto metanólico de hojas de *Psidium guajava***; J PharmBioalliedSci. 2011 India; **3(2):226-9**; Citado en PubMed PMID: 21687350

El extracto metanólico mostro actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* a una concentración mínima inhibitoria de 0,78ug/ml y una concentración mínima bactericida de 50ug/ml.

PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON AT EL.; **Contenido y actividad antibacteriana de flavonoides extraídos de las hojas de *Psidium guajava***; Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de UbonRatchathani Tailandia; JOURNAL DE PLANTAS MEDICINALES, 2010; 393-396

Se aislaron 4 flavonoides con actividad antibacteriana (**morin-3-O-lyxoside, morin-3-O-arabinoside, quercetin, y quercetin-3-O-arabinoside**) de las hojas frescas y secas de *Psidium guajava*. Entre ellos el quercetin y el morin-3-O-arabinoside fueron el mas y el menos abundante respectivamente. Los estudios contra el deterioro y bacterias patógenas transmitidas por alimentos revelo que poseen un modo de acción bacteriostático contra todas las bacterias patógenas en estudio que incluyen a *Bacilluss tearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*.

#### 2.1.5 ANTECEDENTES TOXICOLÓGICOS.

LIC. MARÍA JULIA MARTÍNEZ, LIC. MARISOL LÓPEZ, DR. JOSÉ BETANCOURT BADELL, DR. HÉCTOR BARCELÓ PÉREZ, LIC. MARÍA ELENA MONTE Y DRA. ROSAURA REGO “Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba)” REVISTA CUBANA DE PLANTAS MEDICINALES (2):56-61; CUBA 2001

Este estudio toxicológico preclínico se realizó con hojas secas de *Psidium guajava* L.

A este material vegetal se le efectuó un estudio toxicológico agudo por 2 métodos: 1) dosis letal media LD50 en ratones suizos (OF1) y 2) toxicología alternativa (clases tóxicas agudas) en ratas *Wistar*. También se realizó la evaluación genotóxica de 2 extractos, uno acuoso y otro hexánico en un sistema *in vitro* de ensayo de inducción de segregación somática a corto plazo en el hongo *Aspergillus nidulans*, y un ensayo *in vivo* de la droga seca en el *test* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón.

Los resultados toxicológicos no arrojaron muertes en ninguno de los 2 modelos experimentales en el rango de dosis empleando hasta 2 000 mg/kg de peso y los resultados histológicos no sugieren daños atribuibles a toxicidad del material vegetal probado. En el estudio *in vitro* con *Aspergillus nidulans* D-30, los resultados demuestran la ausencia de efecto genotóxico de estos extractos, así como en el sistema de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón.

**DEODELSY BERMÚDEZ TOLEDO “Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo”. Revista Electrónica de Veterinaria volumen VIII N°3 Cuba 2007**

En este estudio se evaluaron la toxicidad a dosis única de seis extractos de plantas medicinales, entre estos *Psidium guajava* L. (guayaba) mediante un método alternativo e internacionalmente validado y aceptado (procedimiento de dosis fijas) en ratas Sprague Dawley. El grupo tratado recibió por vía oral una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal y el control negativo cloruro de sodio 0,9%. En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales. Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados. La DL50 de los extractos de estudio se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose éstos, según el Sistema Global Armonizado, como “No clasificadas” (“No tóxicas”).

## 2.2 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS:

### 2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE VEGETAL *Psidium guajava*.

#### 2.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

<b>Reino</b>	: Plantae
<b>División</b>	: Magnoliophyta
<b>Clase</b>	: Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	: Rosidae
<b>Orden</b>	: Myrtales
<b>Familia</b>	: Myrtaceae
<b>Género</b>	: <i>Psidium</i>
<b>Especie</b>	: <i>Psidium guajava</i> L.
<b>N. vulgar</b>	: Sahuinto, guajava

**Fuente:** Herbario Vargas (CUZ-UNSAAC).

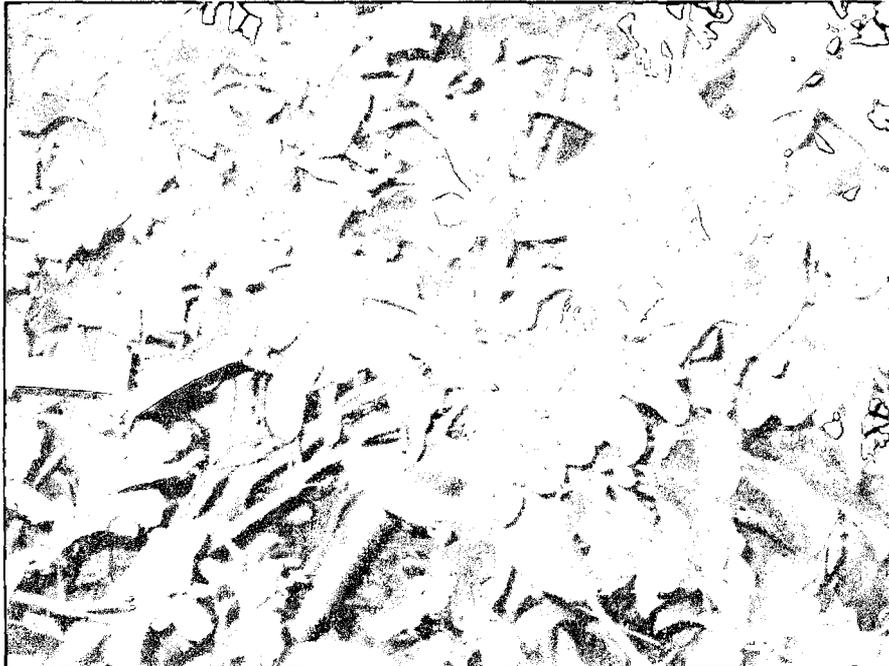
#### 2.2.1.2 SINONIMIAS DE NOMBRES DE ESPECIES CONOCIDAS Y NOMBRES COMUNES DE LA PLANTA

Guayaba, Arazá, Hurapo, Luma, Parcha, Piche, Sahuinto. (10)

Guava, Goyav, Guayabo. (11)

### 2.2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

GRAFICO N° 2.1 *Psidium guajava* L.



FUENTE: PROPIA

- **Forma:** Un pequeño árbol de 10 metros de altura, con ramas extendidas; la guayaba es fácil de reconocer por su fina y lisa corteza de color cobrizo, que se descascara, mostrando la capa de color verde debajo y también por el atractivo aspecto de su tronco, que con el tiempo puede alcanzar un diámetro de 10 pulgadas (25 cm). (12)
- **Hojas:** Las hojas, aromáticos cuando se estrujan, son perennes, opuestas, pecioladas, ovales u oblongo-elípticas, 7-15 cm de largo, 3-5 cm de ancho, con visibles venas paralelas y más o menos suaves en la parte inferior. (12)
- **Flores:** Ligeramente fragantes, de color blanco, crecen solas o en pequeños grupos en las axilas de las hojas, 2,5 cm de ancho, con 4 o 5 pétalos blancos, y un mechón prominente de tal vez 250 estambres blancos con la punta pálida, anteras de color amarillo. (12)

- **Fruto:** Esférico, ovoide o piriforme de 3-10 cm de diámetro, amarillo con la pulpa blanca, rosada, o rojiza, algo ácida con olor a almizcle. Según las diversas variedades, la guayaba puede tener forma redondeada semejante a un limón o parecida a una pera. Su cáscara es cerosa; en algunas variedades de piel lisa, otras rugosa y de un color, de verde a amarillento según la especie y su grado de maduración. Bajo la cáscara se encuentra una primera capa de pulpa, consistente y firme. La capa interior es más blanda, jugosa y cremosa albergando un gran número de semillas de constitución leñosa y dura. La pulpa puede ser color beige en ocasiones y en otras de color rosado. (13)

#### **2.2.1.4 USOS MEDICINALES:**

La planta tiene las siguientes propiedades y acciones: febrífuga, antisecretoria, antibacteriana, cicatrizante, emenagoga, hipoglicémica, laxante, nutritiva, espasmolítica. Es utilizada con frecuencia en enfermedades gastrointestinales como diarrea, mediante la infusión de las hojas tres veces al día, también puede tomarse con leche, bicarbonato, azúcar y hojas de hierba buena, también la cocción de las hojas se usa para la disentería y cólicos. Se recomienda para la caries, hinchazón, escarlatina, hemorragia vaginal, heridas y deshidratación. Las hojas estrujadas se usan para curar heridas, úlceras y masticadas para curar las heridas en la boca; los extractos fenólicos de hojas y flores han demostrado actividad antibiótica contra *Escherichia coli*, *salmonella enteriditris*, *shigella flexneri*. La corteza se usa para cicatrizar heridas de la piel. El té de hojas y/o corteza se usa como un tratamiento efectivo para desordenes gastrointestinales (disentería, dispepsia, diarrea, dolores de estómago), vértigo, náusea y para regular los períodos menstruales. La raíz, corteza, hojas y frutos verdes son muy astringentes y se emplean contra disenterías atónicas y también como remedio para la sarna y la picazón. Raíz: para curar hidropesía. El fruto fresco es laxante y tiene propiedades hipoglicémicas. (14)

#### **2.2.1.5 METABOLITOS IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:**

##### **COMPUESTOS FENOLICOS:**

Los compuestos fenólicos son probablemente las sustancias con mayor actividad antimicrobiana presentes en las plantas. (15)

Los ácidos como el ácido cafeico, ferulico y p-cumarico, inhiben *E. coli*, *S. aureus* y *B. Cereus*; otros compuestos fenólicos que han demostrado tener actividad antimicrobiana son los taninos y el ácido tánico. (16)

#### **A) TANINOS:**

Conforman un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de precipitar gelatina en solución, una propiedad conocida como astringente.

Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. (17)

#### **B) FLAVONOIDES:**

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos los flavonoides; estos compuestos intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la protección frente a la radiación ultravioleta, en la defensa durante la interacción planta-patógeno y posiblemente modificando la acción de distintas hormonas vegetales. (7)

Las hojas de *Psidium guajava* contienen flavonoides, principalmente derivados de la Quercetina, los cuales son hidrolizados en el cuerpo para producir Quercetina la cual es responsable de la actividad espasmolítica de las hojas. Quercetina tiene muchas acciones farmacológicas, inhibe el tránsito intestinal, reduce la permeabilidad capilar en la cavidad abdominal y posee propiedades antioxidantes dosis dependientes, actividad antiinflamatoria, antiviral y antitumoral. (5)

La Quercetina y sus glicosidos (Flavonoides) tienen fuerte actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*; pero solo la Quercetina tiene actividad contra ambas cepas bacterianas a una concentración de 12 mg/ml. (5)

Los siguientes flavonoides fueron aislados a partir de hojas de *Psidium guajava*: morin-3-O-lixosido, morin-3-O-arabinosido, quercetin-3-O-arabinosido. Se demostró su

actividad antibacteriana obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias de 72, 70 y 70 ug/ml respectivamente. **(18)**

## **2.2.2 INFECCIONES URINARIAS**

### **2.2.2.1 DEFINICIÓN**

Es una respuesta inflamatoria del urotelio contra la invasión de una bacteria que es usualmente asociado con bacteriuria o piuria. **(19)**

En las infecciones agudas suele encontrarse un microorganismo simple, mientras que en las infecciones crónicas se observan con mayor frecuencia 2 o más patógenos. **(20)**

Las localizaciones más comunes de las infecciones de las vías urinarias son la vejiga (cistitis), uretra (uretritis), también se pueden localizar en la próstata (prostatitis) y afectar a los riñones (pielonefritis). **(21)**

La vía urinaria, desde los riñones a la vejiga, es estéril en circunstancias normales, pese a la gran probabilidad de contaminación por las bacterias colónicas a través de la uretra distal. Entre los mecanismos que mantienen la esterilidad de la vía urinaria se encuentran la acidez de la orina y el flujo libre, un mecanismo de vaciamiento normal, esfínteres ureterovesical y uretral intactos y las barreras inmunitaria y mucosa. Las alteraciones de cualquiera de estos mecanismos y la estasis de la orina son factores importantes que predisponen a la Infecciones Urinarias. **(22)**

### **2.2.2.2 EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGOS**

La naturaleza del huésped determina la epidemiología de una infección del tracto urinario.

Del 1 al 2% de los recién nacidos desarrollan infecciones urinarias, con una relación varón: mujer de 5:1. En los varones, las infecciones suelen ser bacteriémicas. Entre los factores predisponentes están las malformaciones y las obstrucciones de la vía urinaria, la prematuridad, la sonda permanente y la falta de circuncisión; el 20-40% de los recién nacidos con infección urinaria presentan alteraciones renales importantes. **(22)**

Tras el período neonatal, las infecciones urinarias afectan al 2 a 5% de los niños pequeños y al 5% de los que se encuentran en edad escolar. A partir de los 4 años, la relación mujer : varón es >10:1. En las niñas, las infecciones suelen ser ascendentes y no se asocian a bacteriemia. El notable predominio del sexo femenino es atribuible a la

menor longitud de la uretra. Otros factores predisponentes en este grupo de edad son las sondas permanentes, el estreñimiento, la enfermedad de Hirschsprung y las anomalías anatómicas de la vía urinaria (p. ej., obstrucciones, vejiga neurógena, duplicaciones ureterales). Otros factores de riesgo son la deficiencia de IgA, la diabetes, los traumatismos y, en los adolescentes, las relaciones sexuales. Del 5 al 15% de los niños en edad escolar con infección urinaria tienen anomalías de la vía urinaria que requieren un tratamiento quirúrgico y del 30 al 40% presentan un reflujo vesicoureteral que obliga a establecer una profilaxis con antibióticos. La incidencia de reflujo es inversamente proporcional a la edad a la que se produce el primer episodio de infección urinaria. **(22)**

En la mujer la prevalencia de las infecciones del tracto urinario pasa del 1% en la edad escolar al 5% a la edad de 20 años, epidemiológicamente asociado con el inicio de las relaciones sexuales. El uso de diafragma y espermicidas también se ha relacionado con una mayor incidencia de infecciones del tracto urinario en la población mencionada.

A partir de los 20 años la prevalencia de las infecciones del tracto urinario en la mujer va en aumento, a razón de 1-2% por cada década de vida, de modo que a los 70 años más del 10% de las mujeres tienen bacteriuria asintomática. En la mujer postmenopáusica existe una mayor predisposición a la infección urinaria, como resultado del incremento del pH vaginal y la subsecuente alteración de la flora endógena. **(23)**

El embarazo es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de infecciones urinarias, con una prevalencia de bacteriuria del 4-10% de las mujeres gestantes. **(23)**

### **2.2.2.3 PATOGENIA**

Las infecciones del tracto urinario son resultado de la interacción del uropatógeno y el hospedador, una infección exitosa del tracto urinario está determinada en parte por los factores de virulencia de la bacteria, el tamaño de la inoculación, y los inadecuados mecanismos de defensa del hospedador. Se tiene 3 rutas de infección las cuales son: infección ascendente, diseminación hematológica y diseminación linfática.

#### **2.2.2.4 PATOGENOS URINARIOS.**

*Escherichia coli* es por lejos la causa más común de infecciones del tracto urinario, lo que representa el 85% de la adquirida en la comunidad y el 50% de las infecciones nosocomiales. Otras bacterias gram-negativas Enterobacteriaceae, incluyendo *Proteus* y *Klebsiella*, y grampositivas *E. faecalis* y *S. saprophyticus* son responsables por el resto de la mayoría de las infecciones adquiridas en la comunidad. Las infecciones nosocomiales son causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia*, *E. faecalis* y *S. epidermidis*. (23)

#### **2.2.2.5. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES URINARIAS**

El tratamiento varía dependiendo del tipo de infección urinaria:

En infecciones del tracto urinario bajo se recomienda un tratamiento empírico con Sulfametoxazol /Trimetoprim 800mg/160mg cada 12 horas por 7 días, otra elección son las fluoroquinolonas de segunda generación como Ciprofloxacino 500 mg cada 12 horas por 7 días, sin embargo esto cambia en casos de infecciones intrahospitalarias donde influyen muchos factores, como el uso de catéter vesical, higiene de la entidad de salud, en casos de pielonefritis donde el paciente presente vómitos y náuseas se recurre a tratamientos por vía parenteral con cefalosporinas de tercera generación, o fluoroquinolonas de segunda generación o en todo caso ampicilina más un aminoglucosido. (3)

## 2.2.3 DESCRIPCION DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

### 2.2.3.1 *Escherichia coli*

GRAFICO N°2.2 *Escherichia coli*



FUENTE: LERNER, 2003

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que está formado por un gran grupo de heterogéneo de bastoncillos gramnegativos, se presenta como bacilos gruesos, cortos de extremos redondeados, sueltos en parejas pudiendo ser móviles e inmóviles y carecen o no de esporas, colonias circulares convexas y lisas de bordes definidos, cuyo hábitat natural es el tubo intestinal de hombres y animales.(22)

El género *Escherichia* consiste de cinco especies, de las cuales la más aislada es la *Escherichia coli*. En el tracto gastrointestinal existen gran número de *Escherichia coli*, y estas son las *Enterobacteriaceae* asociadas más frecuentemente con sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infecciones del tracto urinario y gastroenteritis en viajeros a países con higiene deficiente.

Bacilo gramnegativo habitual del intestino. Pero puede causar enfermedades en cualquier otra parte del organismo incluyendo su Hábitat normal.

*Escherichia coli* es la causa más común de las infecciones urinarias y representa casi el 90% de las infecciones primarias de vías urinarias en mujeres jóvenes.

Produce de manera típica pruebas positivas al indol, descarboxilasa de la lisina y fermenta la glucosa, lactosa y maltosa producen ácidos, gases y endotoxinas. Se desarrollan con gran facilidad en el medio de cultivo Mac conkey donde forma colonias grandes, rosadas, redondeadas con bordes definidos y con un manto característico. El microorganismo aislado de la orina se puede identificar con rapidez como *Escherichia coli* porque produce hemólisis en agar sangre. En agar sangre no existe el manto

rosado y las colonias son blanquecinas, ligeramente mucosas y presenta un olor fecaloide.

*Escherichia coli* puede clasificarse en diferentes grupos según su relación antigénica.

**O:** Antígeno somático, termoestable se conocen 148 tipos.

**K:** Antígeno superficial de cobertura o capsular llamados L, A y B su presencia hace inaglutinable el antígeno O; se conocen 80 tipos.

**H:** Antígeno flagelar, por sus propiedades generales se parecen a los de *Salmonella* y *Proteus*, pero son monofásicos se conocen 49 tipos.

La virulencia del microorganismo está asociada con su capacidad para unirse al lugar de la infección y colonizarlo, con las subsiguientes alteraciones en el huésped causadas normalmente por la producción de toxinas. La virulencia está promovida por agresinas que interfieren con la defensa del huésped. Los factores de virulencia de *Escherichia coli* son esencialmente complejos, pueden variar con el lugar y la naturaleza de la infección.

Dentro de las determinantes relacionadas directamente con la virulencia se conocen:

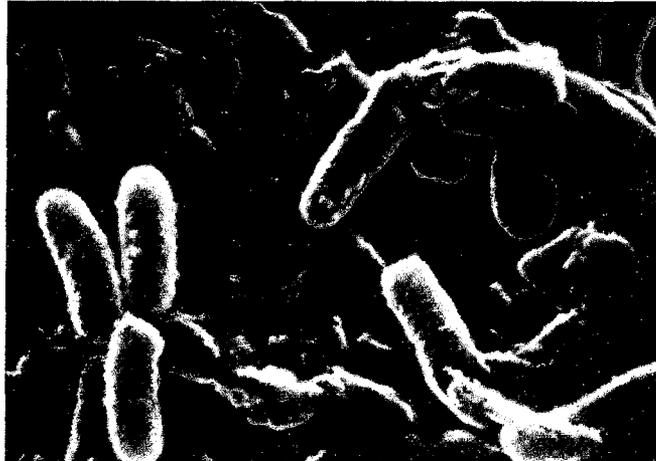
- a) **Adhesinas:** antígenos K de las fimbrias y adhesinas superficiales no fimbricas.
- b) **Toxinas:** enterotoxinas termoestable y enterotoxinas termolábiles.
- c) **Agresinas:** antígenos capsulares, factores séricos de resistencias.

Además de estos existen varios asociados con la capacidad agresiva del microorganismo, por la producción de hemolisina.

La adherencia de la *Escherichia coli* a las células epiteliales esta mediada por una o varias adhesinas, en su mayoría de naturaleza fimbrial, actúan con los receptores específicos en las células huésped que determina su susceptibilidad a la colonización, por ejemplo, la adherencia de la *Escherichia coli* a los fagocitos esta mediada por las adhesinas de pared celular. (26)

### 2.2.3.2. *Pseudomona aeruginosa*

GRAFICO N°2.3 *Pseudomona aeruginosa*



FUENTE: LERNER, 2003

Son organismos que se encuentran en el suelo, la materia orgánica en descomposición de la vegetación y el agua, es saprofito de la piel y del aparato digestivo, no obstante también se encuentra dentro del medio ambiente hospitalario en reservorios húmedos como alimentos , flores cortadas, sumidero, bayetas del suelo, equipo de terapia respiratoria e incluso soluciones desinfectadas.

La amplia distribución ambiental de *Pseudomona aeruginosa* esta favorecida por sus requerimientos simples para el crecimiento. Estos gérmenes pueden usar más de 30 sustancias orgánicas como fuente de carbono y nitrógeno y algunas cepas son incluso capaces de crecer en el agua destilada, mediante el empleo de nutrientes vestigiales.

La *Pseudomona aeruginosa* crece bien en temperaturas que oscilan entre los 37 a 42°C; su crecimiento a temperaturas de 42°C ayuda a distinguirlo de otras especies de *Pseudomonas*; en el cultivo puede producir muchos tipos de colonias, y da la impresión de un cultivo de especies mixtas. (26)

*Pseudomona aeruginosa*, posee también un número de factores estructurales y toxinas que aumentan la virulencia potencial del germen y lo hacen más resistentes a la mayoría de los antibióticos empleados de modo habitual. (27)

*Pseudomonas aeruginosas* de tipos diferentes de colonias puede tener también actividades bioquímicas y enzimáticas distintas y distintos patrones de sensibilidad a los agentes antimicrobianos, *Pseudomona aeruginosa* es patógena solo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales, por ejemplo, cuando se alteran

mucosas y piel por lesión tisular directa, cuando se aplican catéteres intravenosos o urinarios o cuando hay neutropenia, como en el caso de la terapia del cáncer... En estado fresco adopta la forma de bastoncillo rectilíneo a veces encorvado de 3µm de longitud, móvil por la presencia de un cilio polar único; son aerobios estrictos oxidasa positiva. Poseen una acción bacteriostática e incluso bactericida sobre otras especies y la propiedad de producir la lisis de su propia especie. (26)

Casi todas las especies de *Pseudomona aeruginosa* producen piocianina, un pigmento de finazina hidrosoluble azul no fluorescente, solubles en cloroformo. Es la única especie de *Pseudomona* o bacilo gram negativo conocido que excreta piocianina. Las cepas que producen piocianina y pioverduras amarillentas imparten a menudo un color verdoso a los medios de cultivo. (28)

Las sustancias extra celulares incluyen dos hemolisinas una de las cuales es una fosfolipasa y el otro un glucolípido no tiene actividad letal pero en la neumonía puede destruir el tejido pulmonar causando destrucción total de los eritrocitos además *Pseudomona aeruginosa* produce por lo menos dos tipos de proteasas que pueden ser responsables de las lesiones cutáneas hemorrágicas en algunas infecciones. A una de ellas se le llama endotoxina A, esta es una enzima producida por bacterias que tienen mayor mortalidad, está formada por una fracción A y otra fracción B, esta última se fija en las células receptoras y la fracción A como proenzima se activa e inhibe la síntesis de proteínas por inactivación del factor de elongación.

El principal órgano blanco de esta toxina es el hígado. Se ha identificado otra exotoxina S que cataliza la transferencia de ADP- Ribosa del Dinucleotido de Nicotinamida Adenina (NAD) a cierto número de proteínas diferentes de las células eucariotas, se sabe que inhibe la síntesis proteica pero el mecanismo aun no está bien aclarado. (21), (29).

#### **2.2.4 CRECIMIENTO BACTERIANO**

Crecimiento bacteriano es el incremento ordenado en todos los componentes de un microorganismo. Por lo tanto, el aumento de tamaño que resulta cuando una célula capta agua o deposita lípidos o polisacáridos, no es un crecimiento verdadero. La multiplicación celular es una consecuencia del crecimiento; en microorganismos unicelulares, la multiplicación conduce a un aumento en el número de individuos dando lugar a una población o cultivo. (26)

Una población de bacterias en un medio líquido se denomina como una cultura (25)

Los cultivos en crecimiento equilibrado mantienen una composición química constante.

La medida de cualquier componente basta para determinar la velocidad de crecimiento.

Un cultivo en crecimiento equilibrado imita una reacción química autocatalítica de primer orden.

El crecimiento explosivo de las bacterias no puede continuar para siempre en las condiciones de cierre de un frasco de medio de crecimiento. Los nutrientes empiezan a agotarse, la cantidad de oxígeno se reduce, los cambios de pH, y productos de desechos tóxicos de la actividad metabólica comienzan a acumularse. El número de bacterias que crecen y se dividen es igualado por el número de bacterias que se están muriendo. Por último, las condiciones en la cultura siguen deteriorándose, la proporción de la población que se muere se convierte en dominante. (25)

Las pruebas de sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se realizan debido a que las bacterias a veces pueden adaptarse a los antibióticos que se utilizan contra ellos. Adaptación, que puede implicar cambios estructurales o la producción de enzimas que hacen que el antibiótico sea inútil. Por otra parte, una especie bacteriana suele mostrar un espectro de susceptibilidad a los antibióticos, algunos antibióticos, son muy efectivos y otros totalmente ineficaces; para otra especie bacteriana, el patrón de los antibióticos, la sensibilidad y la resistencia será diferente. Por lo tanto, para el diagnóstico de una infección y para las decisiones clínicas en relación con el mejor tratamiento, las pruebas de la respuesta de un organismo a los antibióticos son esenciales. Un método estándar de pruebas de resistencia a los antibióticos implica el crecimiento de las bacterias en la presencia de varias concentraciones de los antibióticos de interés. Normalmente, esta prueba se realiza en un plato de plástico especialmente diseñado que se pueden rellenar de agar (una placa de Petri). La contaminación del agar, que echaría a perder los resultados, está garantizada por la esterilidad de la placa y la tapa que se ajusta sobre el agar. Una placa es lo suficientemente grande para albergar a seis discos de sensibilidad.

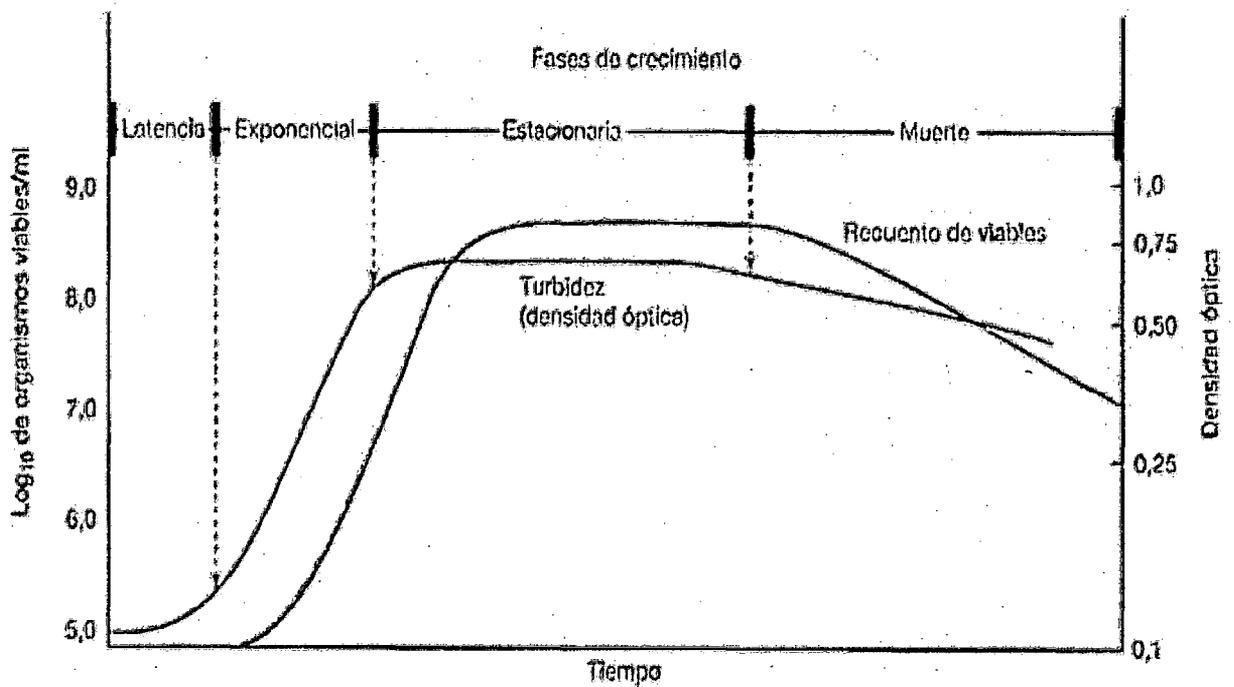
Cada disco se ha empapado en una concentración conocida y diferente de la misma o de diferentes antibióticos. Como el crecimiento de las bacterias se produce, los antibióticos difunden de cada disco en el agar. Si la concentración del antibiótico es letal, no hay crecimiento de la bacteria. Por último, la difusión de los antibióticos estará por debajo de la concentración letal, de modo que el crecimiento de bacterias puede ocurrir. (25)

### 2.2.4.1. CURVA DE CRECIMIENTO

El crecimiento de la población es estudiado analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano, cuando microorganismos son cultivados en un medio liquido ellos normalmente crecen en un sistema cerrado ya que no se administra cultivo fresco durante la incubación, la concentración de nutrientes disminuye y la concentración de desechos aumenta, el crecimiento de microorganismos que se reproducen por fisión binaria puede ser interpretado como el logaritmo del numero viable de células versus el tiempo de incubación, la curva obtenida tiene 4 fases importantes.(30)

Si se inocula un medio liquido con células microbianas, tomadas de un cultivo que previamente ha crecido hasta la saturación, en el cual periódicamente se ha determinado el número de células viables, por mililitro, y trazado una grafica de él, por lo general se obtiene una curva como la siguiente.(26)

GRAFICO N°2.4 Curva de Crecimiento



FUENTE: MADIGAN, 2003

## **FASES DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO:**

- **Fase de latencia o de retraso:** representa un periodo durante el cual las células empobrecidas en metabolitos y enzimas como resultado de las condiciones desfavorables producidas al final del cultivo previo, se adaptan a su nuevo ambiente. Se forman enzimas y metabolitos intermedios que se acumulan hasta alcanzar concentraciones que permiten que el crecimiento se reinicie. **(26)**

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, el crecimiento no comienza inmediatamente sino solo tras un periodo de tiempo que constituye la fase de latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. La fase de latencia también ocurre cuando se transfiere una población de un medio rico a otro más pobre. **(29)**

- **Fase exponencial:** las células se encuentran en una fase sostenida. Se sintetiza nuevo material celular a velocidad constante, pero este es en sí catalítico y la masa aumenta en forma exponencial. Esto continúa hasta que sucede una de dos cosas, uno o más de los nutrientes del medio se agoten, o que acumulen productos tóxicos e inhiban el crecimiento. **(26)**

Las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano. Las velocidades de crecimiento son muy variables. Las velocidades de crecimiento están influenciadas por las condiciones ambientales (temperatura, medio de cultivo, etc.), así como por las características genéticas del organismo, por lo general los organismos procariontes crecen más rápido que los eucariotes y los eucariotes de menor tamaño lo hacen más rápido que los de mayor tamaño. **(31)**

- **Fase estacionaria:** En sistema de cultivo cerrado o monofásico, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de manera indefinida, en esta fase no hay incremento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria muchas de las funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. **(29)**

Finalmente, el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos hacen que el crecimiento cese por completo. Sin embargo en la fase estacionaria, hay una pérdida lenta de células por muerte, lo cual es compensado exactamente por la formación de nuevas células, a través de crecimiento y división. Cuando este fenómeno se presenta, el número total de

las células aumenta lentamente, aunque la cuenta de células viables permanece constante. (26)

- **Fase de declinación o de muerte:** Después de un tiempo en fase estacionaria, que varía con el microorganismo y las condiciones de cultivo, la velocidad de mortalidad aumenta hasta alcanzar un nivel sostenido, frecuentemente después de que la mayoría de las células han muerto, la velocidad de mortalidad disminuye en forma drástica, de tal manera que un pequeño número de sobrevivientes pueden persistir por meses o aun años. En algunos casos esta persistencia puede indicar recambio celular, creciendo unas cuantas células a expensas de los nutrientes liberados por las células que se mueren y se lisan. (26), (29)

#### 2.2.4.2. EL CEPARIO

Los procesos de validación son los procesos que se requieren para asegurar que los parámetros de funcionamiento de los test, tanto comerciales como los de uso domésticos, son los esperados y las pruebas pueden ser utilizadas como medio de diagnóstico en el laboratorio. La mayoría de los procedimientos en microbiología clínica, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean capaces de mantener sus características morfológica, fisiológicas y que sean típicas y reproducibles. Para ayudar en este control, las cepas estándar de control son componente esencial de un proceso de validación.

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad. Algunos ejemplos son:

- **ATCC:** American Type Culture Collection - Rockville, USA.
- **NCIC:** National Collection of Industrial Bacteria - survey, Inglaterra.
- **JFCC:** Japanese Federation of Culture Collection of Microorganism Japon.
- **CCTM:** Collection National – Lille, Francia.
- **RIA:** USSR Research Institute for Antibiotics – Moscú, Rusia.
- **NCBI:** Colección Nacional Industrial – Aberdeen, Escocia.
- **DCM:** Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen – Guttinger, Alemania.

Es así por ejemplo. La *Escherichia coli* ATCC 25922 es igual a la DSM 1103 y a la NCIB 12210, que son los organismos que van a ser utilizados en el control de equipos o sistemas de identificación. Generalmente se utilizan de referencia como las ATCC, es

necesaria una historia del organismo que incluye nombre, área de aislamiento, reacciones bioquímicas y patrón de sensibilidad a antibióticos, forma de almacenaje, fecha del último trasplante, etc.

En todo caso las cepas de referencia deben tener requisitos específicos:

- Características típicas.
- Características estables.
- Reproducibilidad.

#### **CEPAS ATCC:**

Las cepas ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION), constituyen la colección más grande e importante del mundo estas cepas bacterianas pueden ser utilizadas como control en una gran variedad de utilidades, lo cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio.

#### **MANTENIMIENTO DEL CEPARIO**

Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento del cepario ya que el mismo constituye una ayuda importante en la validación de equipos, materiales reactivos y habilidad del personal. Debe existir un plan metódico de trasplante de cepas, archivo de cada uno de los cultivos, características bioquímicas, sensibilidad a los antibióticos, origen de la cepa, método de identificación, fecha de siembra y de próximo trasplante, etc. (27)

#### **2.2.4.3 CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO**

Para seguir el crecimiento microbiano es necesario realizar mediciones cuantitativas; de modo que para determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier propiedad de la biomasa. Por comodidad son habitualmente la masa celular o el número de células.

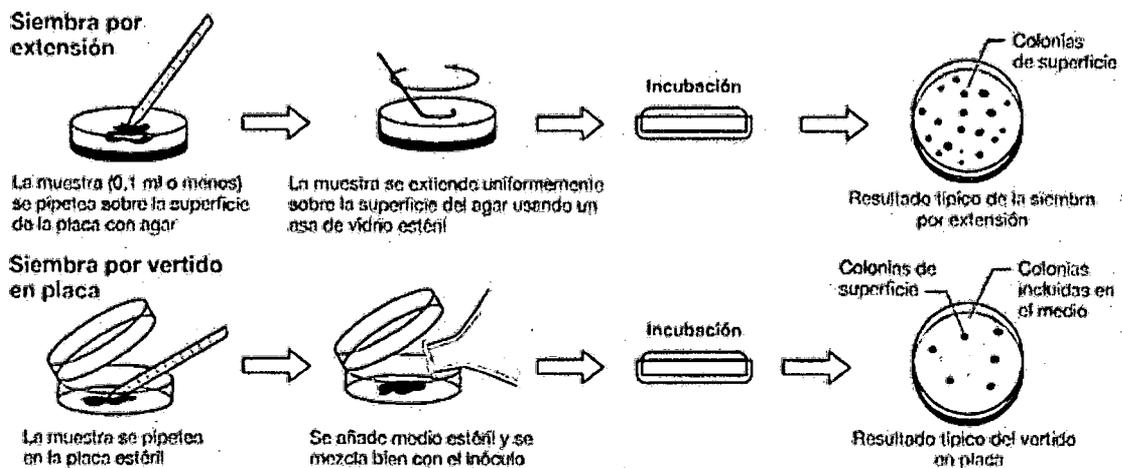
##### **a) MEDIDAS DIRECTAS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: Recuento de células viables.**

El recuento de células viables es el método más sensible para la determinación del número de bacterias ya que permite detectar incluso una sola célula viva viable en suspensión. Una célula viable se define como aquella célula que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia, y el método usual para

determinar el número de células viables se basa en contar el número de células de las muestras que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado... En este procedimiento se supone que cada célula puede formar una colonia.

Hay dos maneras de realizar un recuento en placa para viables, el método de extensión en placa y el método de vertido en placa.

### GRAFICO N°2.5 Métodos para el Crecimiento Bacteriano en Placas



FUENTE: MADIGAN, 2003

Para la siembra por extensión se debe utilizar muestras diluidas que no suele ser superior a 0.1 ml. Mientras que en la siembra por vertido se pipetea un volumen conocido (normalmente entre 0.1-1.0 ml), para este cultivo el microorganismo debe ser capaz de resistir temperaturas de 45°C. (29)

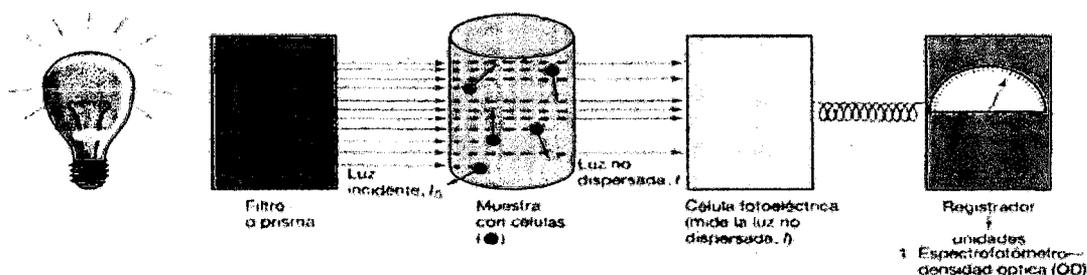
#### b) MEDIDAS INDIRECTAS DEL CRECIMIENTO MICROBIANO: Turbidez.

Un método muy rápido y útil de obtener estimaciones del número de células son las medidas de turbidez. Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Mientras más células estén presentes mayor será la luz dispersada, y por tanto, mayor la turbidez.

La turbidez puede medirse con aparatos como el fotómetro o espectrofotómetro, que hace pasar la luz a través de las suspensiones celulares y detectan la cantidad de luz emergente no dispersada.

En el caso de organismos unicelulares, las unidades fotométrica o de densidad óptica son proporcionales (dentro de ciertos límites) al número de células, por consiguiente las lecturas de turbidez pueden utilizarse como un sustituto de los métodos directos. (29) La turbiedad del cultivo medida por métodos fotoeléctricos; puede vincularse con la cifra viable en forma de curva estándar. A veces es posible efectuar una estimación visual aproximada: la suspensión apenas turbia de *Escherichia coli* contiene cerca de  $10^7$  células por mililitro y la suspensión bastante turbia contiene  $10^8$  células por mililitro. (26)

**GRAFICO N°2.6 Medida en el Espectrofotómetro para la Determinación de la Curva de Crecimiento**



FUENTE: MADIGAN, 2003

#### 2.2.4.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana se mide por la determinación de la concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento de una bacteria en prueba.

Uno de los métodos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), es utilizando las pruebas de sensibilidad, el cual servirá para orientar un mejor tratamiento con respecto a los antibióticos para la determinación de la sensibilidad bacteriana existen diferentes procedimientos siendo las más utilizadas:

#### MÉTODO TURBIMÉTRICO

Consiste en tener diluciones dobles y progresivas de un antibiótico (1,2,4,8,16,..... etc.)  $\mu\text{g/ml}$ , al cultivar una suspensión bacteriana sobre estos medios, en un momento se presentara una turbidez en aquellos medios en los cuales el antimicrobiano se encuentra en una concentración insuficiente para inhibir el crecimiento, mientras que en los otros medios de cultivo donde el antimicrobiano se encuentra en mayor

concentración no se presenta ninguna turbidez lo que indica que la bacteria no se ha desarrollado.

La dilución menor del antimicrobiano, en la cual no hay crecimiento bacteriano constituye el parámetro más importante, ya que es este el índice de la cantidad mínima del antimicrobiano que impide el crecimiento bacteriano (que se indica por la ausencia de la turbidez visible).

Los instrumentos sensibles como un espectrofotómetro o un colorímetro pueden servir en turbimetría que permite que mida la densidad del cultivo a medida que crece. La turbidez se expresa en unidades de absorbancia. Para los organismos unicelulares, la absorbancia es proporcional a la cantidad de células. **(32)**

### **MÉTODO DE KIRBY-BAUER**

Es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos.

Mediante este sistema se proba la acción de un antimicrobiano o más a partir de una siembra en superficie sobre un medio sólido (Agar MullerHinton) que contiene una suspensión bacteriana, depositando a continuación sobre ella discos de papel filtro impregnado con los antimicrobianos a diferentes concentraciones. **(32)**

### **2.2.5 DEFINICIÓN DE RESISTENCIA BACTERIANA**

Una cepa bacteriana se considera resistente cuando no es posible detener su desarrollo utilizando la concentración máxima de antibiótico tolerada por el huésped. Existen varios mecanismos responsables de esa resistencia. Dicha resistencia incluye la producción de enzimas que modifiquen o destruyan la estructura química del antibiótico; la alteración de las proteínas receptoras de antibióticos; la alteración de la permeabilidad de la pared celular microbiana frente a la penetración del antibiótico y el cambio en la rapidez con que el antibiótico se elimina hacia el exterior de las células bacterianas. **(33)**

### 2.2.6 RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Los microorganismos poseen muchos mecanismos diferentes para desarrollar la resistencia a los fármacos:

1.- Producen enzimas que destruyen al fármaco activo. Ejemplo: los estafilococos resistentes a la penicilina G producen una b-lactamasa que destruye el fármaco. Los bacilos gramnegativos producen otras b-lactamasas. Las bacterias gram negativas resistentes a los aminoglucósidos producen enzimas adenilantes, fosforilantes y acetilantes que destruyen el fármaco.

2.- Cambian su permeabilidad al fármaco. Ejemplos: las tetraciclinas se acumulan en las bacterias susceptibles, pero no en las bacterias resistentes. La resistencia a la polimixina también se vincula con un cambio en la permeabilidad al fármaco. Los estreptococos poseen una barrera natural de permeabilidad a los aminoglucósidos, que puede superarse parcialmente al administrar simultáneamente un fármaco activo contra la pared celular, La resistencia a la Amikacina y a otros aminoglucósidos a veces depende de la ausencia de permeabilidad a estos fármacos aparentemente por un cambio en la membrana interna que reduce el transporte activo al interior de la célula.

3.- Alteran estructuralmente el blanco del fármaco. Ejemplo: los microorganismos resistentes a la Eritromicina muestran alteración del receptor sobre la subunidad 50S del ribosoma. La resistencia a algunas penicilinas y cefalosporinas puede ser función de la pérdida o alteración de las proteínas que se unen a penicilinas que se encuentran en la pared celular.

4.- Desarrollan una vía metabólica diferente que pasa por alto la reacción inhibida por el fármaco. Ejemplo: algunas bacterias resistentes a la sulfonamida no requieren PABA extracelular y al igual que las células de mamífero pueden usar ácido fólico preformado.

5.- Desarrollan un enzima diferente que todavía puede ejecutar su función metabólica pero es mucho menos afectada por el fármaco. Ejemplo: en bacterias resistentes al Trimetoprim, la ácido dihidrofólico reductasa se inhibe con mucha menor eficiencia que en bacterias susceptibles al Trimetoprim. **(26)**

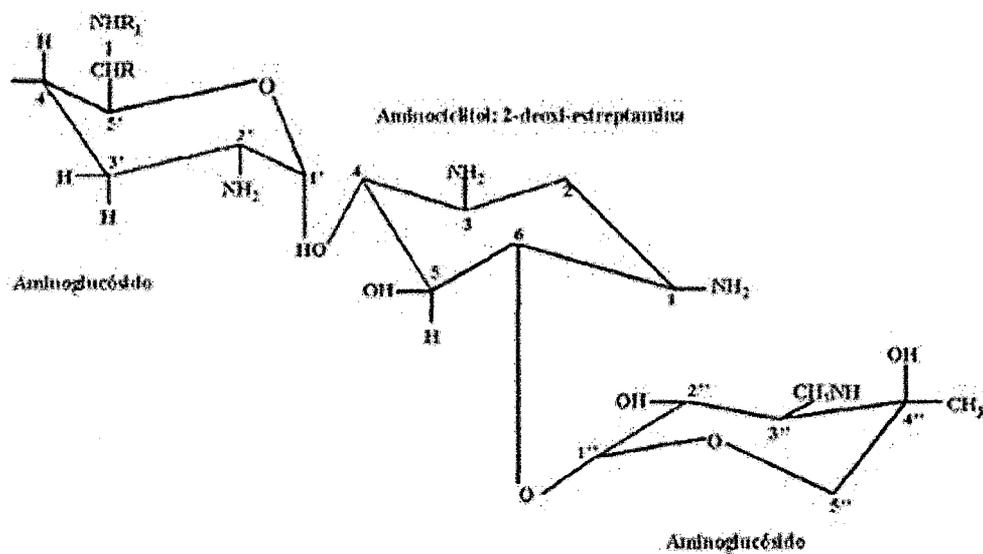
## 2.2.7 DESCRIPCIÓN DEL ANTIBIÓTICO USADO COMO PATRÓN COMPARATIVO EN EL PRESENTE ESTUDIO (AMIKACINA).

### 1. PROPIEDADES QUIMICAS

La Amikacina es un antibiótico, perteneciente a la familia de los aminoglucósidos es un derivado semisintético de la kanamicina, los aminoglucósidos están constituidos por un núcleo de hexosa denominado aminociclitol al que se unen dos o más aminoazúcares mediante enlaces glucosídicos. El núcleo hexosa presente en la Amikacina es la 2-desoxiestreptamicina, que también se encuentra en la Gentamicina, Kanamicina y tobramicina, mientras que solo para la estreptomina el núcleo hexosa es la estreptidina.

Químicamente la familia de los aminoglucósidos se diferencia por los aminoazúcares unidos al aminociclitol, además los aminoglucósidos son policationes que poseen radicales amino e hidroxilo, importantes para la actividad antibacteriana y que, además constituyen el sitio de inactivación por las enzimas bacterianas. (34)

GRAFICO N°2.7 Estructura de los Aminoglucósidos(31)



FUENTE: LITTER, 1994

## 2. MECANISMO DE ACCIÓN.

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan uniéndose en forma irreversible a la sub unidad 30-S del ribosoma con lo cual inhibe la síntesis proteica de bacterias. El complejo de iniciación se puede formar, pero después no pasa a etapas ulteriores y la síntesis proteica se interrumpe (son bactericidas y activos incluso sobre bacterias en fase estacionaria).

Otro efecto de los aminoglucósidos es la capacidad de inducir a lecturas equivocadas del modelo del ARN mensajero. El resultado es una disminución en la tasa de síntesis de proteína y producción de proteínas defectuosas. Este efecto es variable entre los aminoglucósidos. Así la amikacina, tobramicina y gentamicina producen más falsas lecturas que la estreptomícina.

El mecanismo por el cual los aminoglucosidos alcanzan su sitio de acción es un proceso de transporte activo que incluye varios pasos:

### a) INTERACCIÓN IÓNICA:

Los aminoglucósidos (que poseen carga positiva), se ligan electrostáticamente a los residuos de carga negativa presente en lo lipopolisacáridos en las cabezas de los fosfolípidos y en las proteínas anionicas presentes en la membrana externa de las bacterias gram negativas. Desplazan competitivamente de la pared celular al magnesio y al calcio que normalmente se ligan a los lipopolisacáridos adyacentes. El resultado es un re-arreglo molecular con la consecuente modificación de la membrana externa, formación de agujeros temporales en la pared celular y la alteración en la permeabilidad.

### b) INGRESO DEL AMINOGLUCÓSIDO:

El aminoglucósido ingresa al citoplasma, esto se realiza en dos fases:

- **Fase 1 dependiente de energía:** proceso inicial, lento, que consume O<sub>2</sub> y representa el paso limitante del mecanismo de acción pues puede ser inhibido por la anaerobiosis, reducción del pH hiperosmolar y por cationes divalentes (Ca y Mg)
- **Fase 2 independiente de energía:** proceso consecutivo durante el cual se acelera el ingreso del aminoglucósido al citoplasma bacteriano. Esta fase estaría condicionada por el deterioro que experimenta la membrana citoplasmática de la bacteria debido al efecto inicial del aminoglucósido sobre la síntesis proteica.(33), (34)

### 3. FARMACOCINETICA:

#### ➤ VIA DE ADMINISTRACIÓN:

Al ser moléculas policationicas altamente polares (no liposolubles) los aminoglucosidos se absorben muy poco por el tracto gastrointestinal (menos del 1% de una dosis oral). Para alcanzar niveles terapéuticos debe administrarse por vía parenteral, intramuscular o endovenoso.

#### ➤ ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN:

Los aminoglucósidos se absorben con rapidez después de una inyección intramuscular. Las concentraciones máximas se alcanzan después de 30 a 90 minutos.

Por vía endovenosa se logran niveles séricos máximos después de 30 minutos de completar una infusión intravenosa.

Los aminoglucósidos circulan unidos a las albuminas en una proporción despreciable. Por su naturaleza polar cruzan pobremente las barreras biológicas; alcanzando bajas concentraciones a nivel intracelular, en el sistema nervioso central y en el ojo. En cambio se distribuyen bien en los líquidos extracelulares excepto en el líquido cefalorraquídeo donde la penetración es escasa, aun con meninges inflamadas.

La distribución tisular es pobre con excepción del riñón (corteza renal) y en el oído. Solo se encuentran niveles elevados en la corteza renal y en la endolinfa y perilinfa del oído interno, lo cual puede explicar su gran potencial de nefrotoxicidad y ototoxicidad.

#### ➤ METABOLISMO Y EXCRECIÓN:

No se metabolizan en el organismo y en presencia de función renal normal, tienen un tiempo de vida promedio de 2 horas.

La eliminación de los aminoglucósidos es casi por completo mediante filtración glomerular y se alcanzan concentraciones de 50 a 200 ug/ml en la orina, (80%-90%) de la dosis administrada. **(33), (34)**

#### 4. MECANISMOS DE RESISTENCIA:

Se han establecido tres mecanismos principales:

- 1) Producción de una o varias enzimas transferasas que inactivan al aminoglucósido por adenilación, acetilación y fosforilación. Este es el tipo principal de resistencia que se encuentra en la clínica
- 2) Alteración de la entrada del aminoglucósido a la célula, lo que pudiese ser genotípico por ejemplo: resultante de mutación o delección del gen de una porina o las proteínas vinculadas en el transporte y mantenimiento del gradiente electroquímico; o fenotípico por ejemplo: resultante de condiciones de proliferación bajo las cuales el proceso dependiente de oxígeno (por el cual el fármaco se transporta en forma activa a través de la membrana hasta el citoplasma) no es funcional.
- 3) Se puede alterar o eliminar la proteína del receptor en la subunidad ribosómica 30S como resultado de una mutación. (55)

#### 5. INDICACIONES TERAPEUTICAS:

Resistente a muchas enzimas que inactivan a la gentamicina y tobramicina y, por tanto, que se puede usar contra algunos microorganismos resistentes a esos fármacos; muchas bacterias intestinales gram negativas, incluidas cepas múltiples de *Proteus*, *Pseudomona*, *Enterobacter* y *Serratia* son inhibidas por la Amikacina a razón de 1 a 20 ug/ml (55)

Los aminoglucosidos mantienen su vigencia para tratar infecciones por bacilos aerobios gram negativos, muchos estafilococos y ciertas micobacterias, en especial las adquiridas en el ambiente hospitalario.

Con frecuencia estos antibióticos se usan en combinación con una penicilina o cefalosporina para infecciones graves causadas por gram negativos, en especial *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*.

- ITU. Son muy útiles como monoterapia en estos casos, aun contra gérmenes multiresistentes, pues la orina es el único líquido corporal en el que los aminoglucósidos alcanzan niveles mayores que los séricos. No son útiles en infecciones prostáticas.
- Endocarditis bacteriana. Suelen utilizarse los aminoglucósidos en combinación con penicilinas para aprovechar su efecto sinérgico.

- Infecciones intraabdominales y pélvicas. Los aminoglucósidos son muy efectivos para tratar infecciones mixtas intraabdominales y pélvicas, pues penetran adecuadamente el peritoneo.
- Infecciones óseas y articulares. Son eficaces en estos casos aunque en un tiempo prolongado.
- Infecciones respiratorias. Son poco útiles en estos casos, debido quizás al bajo pH de las secreciones bronquiales y a la poca concentración que alcanza el antibiótico a ese nivel. **(31), (34)**

#### **6. REACCIONES ADVERSAS:**

Todos los aminoglucósidos tienen la capacidad de producir la toxicidad reversible e irreversible de tipo vestibular, coclear y renal; estos efectos adversos complican el empleo de tales compuestos y dificultan su administración precisa.

Todos los aminoglucósidos son capaces de afectar las funciones coclear y vestibular, la estreptomycinina y gentamicina originan efectos vestibulares en tanto la kanamicina afecta la función del nervio auditivo. **(31)**

## **2.2.8 TOXICIDAD**

### **2.2.8.1 DEFINICIÓN:**

Se denomina toxicidad a la actividad nociva concreta y específica vinculada a la estructura química de una sustancia exógena al organismo (xenobiotico) por su interacción con moléculas endógenas (receptor). Precisamente, esta actividad biológica es la que permite juzgar acerca de la capacidad que posee una sustancia para poder actuar como nociva para un organismo vivo bajo unas determinadas condiciones. **(35)**

También se define no como un evento molecular único, sino más bien como una cascada de eventos que se inician con la exposición, procesos de distribución y metabolismo, y terminando con las interacciones con macromoléculas celulares (por lo general ADN o proteínas), con la expresión de un punto final tóxico. **(36)**

El veneno es un concepto cuantitativo, casi cualquier sustancia dañina en alguna dosis pero, al mismo tiempo, quede sin efecto nocivo en alguna dosis más baja. Entre estos dos límites hay una gama de posibles efectos, de sutil crónica a largo plazo toxicidad para la letalidad inmediata. El cloruro de vinilo puede ser tomado como un ejemplo. Se trata de un hepatotóxico potente en dosis altas, un carcinógeno con un período de latencia más bajos, y sin aparente efecto a dosis muy bajas. **(36)**

### **2.2.8.2 CLASIFICACION DE ESTUDIOS DE TOXICIDAD:**

#### **A) TOXICIDAD AGUDA:**

La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50 (DL50), que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar. La determinación de la DL50 se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (i.v., i.m. ip. s.c. y oral). En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce unos severos efectos adversos. **(37)**

## **B) TOXICIDAD SUBAGUDA:**

En estos test, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales Administraciones Sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad subaguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia. **(38)**

Durante el estudio se controlan diariamente un buen número de parámetros y al final los animales son sacrificados y autopsiados. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico. Esta prueba tiene la intención de investigar los efectos de una variedad muy amplia de potenciales objetivos de toxicidad. Proporciona información sobre los riesgos de salud que puede provocar una exposición continuada durante un período relativamente limitado de tiempo. **(37)**

### **B.1 PROTOCOLO ESTÁNDAR DE 28 DÍAS:**

El protocolo completo se detalla en el **Anexo N°1**.

#### **PRINCIPIOS DEL TEST**

La sustancia en estudio es oralmente administrada diariamente en dosis graduadas a muchos grupos de animales de experimentación, un nivel de dosis por grupo por un periodo de 28 días. Durante el periodo de la administración el animal es observado de cerca cada día por signos de toxicidad. Al concluir el test los animales sobrevivientes son sacrificados y sometidos a una autopsia, Un estudio de 28 días proporciona información sobre los efectos de la exposición oral repetida y puede indicar la necesidad de más estudios a largo plazo. También puede proporcionar información sobre la selección de las concentraciones para los estudios a largo plazo. **(39)**

#### **ADMINISTRACIÓN DE DOSIS**

Los animales son administrados con la dosis de ensayo diariamente, los 7 días de la semana por un periodo de 28 días. Cuando la sustancia se administra por sonda, esto

debe realizarse en una sola dosis a los animales con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. (39)

## OBSERVACIONES

- **PESO:** los animales deben ser pesados al menos una vez por semana. (39)
- **HEMATOLOGIA:** Los exámenes hematológicos siguientes deben practicarse al final del período de ensayo: hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos, totales y recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria. (39)
- **BIOQUIMICA CLÍNICA:** Determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos y, en concreto, los efectos sobre los riñones y el hígado, se debe realizar con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes o como parte del procedimiento del sacrificio de los animales (aparte de los moribundos y / o sacrificados antes de la terminación del estudio) Las investigaciones de plasma o suero se incluyen urea, creatinina, proteínas totales y albúmina, por lo menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares. (39)
- **HISTOPATOLOGICO:** Un examen histopatológico completo debe llevarse a cabo en los órganos y tejidos conservados de todos los animales del grupo control y altas dosis. Todas las lesiones deben de ser examinadas. (39)

## C) ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBCRONICA Y CRONICA

Básicamente, estos estudios tienen características similares a los anteriores en cuanto al número de animales, número de dosis, observaciones, etc. Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar 3 meses, mientras que los de toxicidad crónica suelen durar 6 meses o un año, según el uso terapéutico que vaya a tener la sustancia. Si, por ejemplo, la sustancia es un antihipertensivo o antidiabético oral, cuya administración en el hombre se prevé dure años, la toxicidad crónica durará un año. En el caso de un antibiótico, usado en el hombre durante periodos de 8-10 días, bastará con estudios de 6 meses. (37)

Es importante decidir la forma de administrar la sustancia a los animales durante estos períodos tan largos. Si la administración con una sonda gástrica no suele ocasionar problemas en tratamientos cortos, el estrés o la posibilidad de accidentes con el sondaje deben ser considerados frente a la mayor imprecisión y otros problemas que conlleva el administrar el fármaco mezclado con el alimento (rechazo del alimento, dilución de la dosis en el tiempo, absorción diferente, etc.) (37)

# ***CAPÍTULO III***

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS**

##### **3.1.1 MATERIAL VEGETAL**

- Parte aérea (hojas) de la especie *Psidium guajava* (Sahuinto).

##### **3.1.2 MATERIAL MICROBIANO**

- Cepas ATCC de *Escherichia coli*.
- Cepas ATCC de *Pseudomona aeruginosa*.
- Cepas aisladas de *Escherichia coli*
- Cepas aisladas de *Pseudomona aeruginosa*

##### **3.1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

- Ratas albinas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, obtenidos del Instituto Nacional de Salud, Lima-Peru

#### **3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO**

##### **A.- MATERIALES DE CAMPO**

- Dos bolsas de tamaño adecuado para la recolección.
- Bolsas de papel y de polietileno.
- Tijeras podadoras.
- Cámara fotográfica.
- Cuaderno de campo.
- Papel kraft.
- Lapiceros.

##### **B.- MATERIALES DE LABORATORIO**

- Tubos de ensayo 5, 10 y 20 ml.
- Vasos de precipitado de 100 y 200ml.
- Placas petri.
- Baguetas.
- Pipetas 1, 5, 10ml.
- Embudos.

- Matraz de 100, 200 y 500ml.
- Probetas de 100 y 250ml.
- Goteros.
- Piezas de metal: soporte, espátula, etc.
- Papel filtro
- Láminas cobre y porta objetos
- Algodón
- Botellas de vidrio de color oscuro de 4 a 5 litros de capacidad
- Micro-pipetas
- Asas de siembra.
- Mecheros.
- Pinzas.
- Gradillas.

#### **C. EQUIPOS DE LABORATORIO**

- Balanza analítica
- Rotavapor BUCHI Labortechnik R-215
- Estufa eléctrica
- Autoclave Vertical AV Plus Phoenix
- Incubadora H.W. Kessel
- Espectrofotómetro Genesys 20
- Balanza analítica AND GR-200, 210gr-1mg
- Refrigeradora

#### **D. SOLVENTES Y REACTIVOS:**

- Etanol de 96°, 70°, 60°, 50°, 40°.
- Agua destilada
- Éter etílico. Q.P.
- Cloroformo Q.P.
- Acetona Q.P.
- Metanol Q.P.
- Bencina Q.P.
- Hexano Q.P.

- Reactivo de Felhing.
- Reactivo Cloruro Férrico al 1%
- Reactivo de Draguendorf
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo Borntrager.
- Reactivo de Baljet.
- Reactivo de *Drabkin*.
- Reactivo de Turk.
- Cloruro férrico al 1%.
- Ácido Clorhídrico (c)
- Ácido sulfúrico (c)
- Hidróxido de sodio al 1%.
- Solución de Gelatina – NaCl al 1%.

#### **E. MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar Mueller Hinton.
- Caldo BHI. (Caldo: infusión Cerebro corazón).
- Mc Conkey
- Agar SS
- Agar saburaud

#### **F. OTROS MATERIALES**

- Mandil o guardapolvo
- Gorra
- Barbijos o mascarillas
- Guantes
- Lápiz marcador.
- Molino
- Vernier.
- Jaulas

### 3.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

#### 3.3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

##### 3.3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo cuasi-experimental (por el análisis y el alcance de los resultados), prospectivo (por el tiempo de ocurrencia de los hechos), transversal (por el periodo y secuencia del estudio); orientado a demostrar la probable actividad antibacteriana en cepas estándar y cepas aisladas.

#### ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para determinar la CMI de la actividad antibacteriana de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de *Psidium guajava* "Sahuinto", se seguirá el diseño de Post Prueba y Grupo control de la siguiente manera:

***Escherichia coli:***

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>7</sub>	O <sub>7</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>8</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>9</sub>	X <sub>9</sub>	O <sub>9</sub>
G <sub>10</sub>	X <sub>10</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>11</sub>	X <sub>11</sub>	O <sub>11</sub>
G <sub>12</sub>	X <sub>12</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>13</sub>	X <sub>13</sub>	O <sub>13</sub>
G <sub>14</sub>	--	O <sub>14</sub>

**Donde:**

- **G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>,... G<sub>12</sub>, G<sub>13</sub>, G<sub>14</sub>:** Cepas de *Escherichia coli* que serán sembradas en las placas petri por triplicado.
- **X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>,X<sub>3</sub>,...X<sub>12</sub>:** Son las diferentes concentraciones en mg/ml del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Psidium guajava* "Sahuinto".
- **X<sub>13</sub>:**Concentración del fármaco patrón "Amikacina"
- **--:** Solución que será usado como blanco.
- **O<sub>1</sub>,O<sub>2</sub>,O<sub>3</sub>... O<sub>12</sub>:** Observación y medición de los halos de inhibición que se observarán.
- **O<sub>13</sub>:** Observación de los halos de inhibición representada por el grupo del fármaco patrón.
- **O<sub>14</sub>:** Observación de los halos de inhibición representada por el grupo control

***Pseudomona aeruginosa*:**

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>7</sub>	O <sub>7</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>8</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>9</sub>	X <sub>9</sub>	O <sub>9</sub>
G <sub>10</sub>	X <sub>10</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>11</sub>	X <sub>11</sub>	O <sub>11</sub>
G <sub>12</sub>	X <sub>12</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>13</sub>	X <sub>13</sub>	O <sub>13</sub>
G <sub>14</sub>	--	O <sub>14</sub>

**Donde:**

- G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>,... G<sub>12</sub>, G<sub>13</sub>, G<sub>14</sub>: Cepas de *Pseudomona aeruginosa* que serán sembradas en las placas petri por triplicado.
- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>,... X<sub>12</sub>: Son las diferentes concentraciones en mg/ml del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Psidium guajava* "Sahuinto".
- X<sub>13</sub>: Concentración del fármaco patrón "Amikacina"
- --: Solución que será usado como blanco.
- O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>,... O<sub>12</sub>: Observación y medición de los halos de inhibición que se observarán.
- O<sub>13</sub>: Observación de los halos de inhibición representada por el grupo del fármaco patrón.
- O<sub>14</sub>: Observación de los halos de inhibición representada por el grupo control

**NOTA:** El modelo de ensayo de la actividad antibacteriana para el extracto de las hojas de *Psidium guajava* "Sahuinto", se aplicará de igual forma a las cepas aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional del Cusco.

#### **ENSAYO DE LA TOXICIDAD SUBAGUDA:**

El presente estudio es un experimento puro, (ya que los sujetos de experimentación fueron asignados al azar) de series cronológicas múltiples con post-prueba (ya que se tiene dos o más grupos y la administración del extracto es diaria y se realizó un análisis final para determinar algún cambio en los grupos), prospectivo (por el tiempo de ocurrencia de los hechos), transversal (por el periodo y secuencia del estudio); orientado a demostrar la probable toxicidad en animales de experimentación en un periodo de 28 días administrando por vía oral diferentes dosis del extracto a distintos grupos de trabajo.

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMIENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>MEDICIÓN DE LA PRUEBA</b>
RG <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
RG <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
RG <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
RG <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
RG <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
RG <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>
RG <sub>7</sub>	X <sub>7</sub>	O <sub>7</sub>
RG <sub>8</sub>	X <sub>8</sub>	O <sub>8</sub>
RG <sub>9</sub>	X <sub>9</sub>	O <sub>9</sub>
RG <sub>10</sub>	X <sub>10</sub>	O <sub>10</sub>
RG <sub>11</sub>	X <sub>11</sub>	O <sub>11</sub>
RG <sub>12</sub>	X <sub>12</sub>	O <sub>12</sub>
RG <sub>13</sub>	X <sub>13</sub>	O <sub>13</sub>
RG <sub>14</sub>	X <sub>14</sub>	O <sub>14</sub>
RG <sub>15</sub>	X <sub>15</sub>	O <sub>15</sub>
RG <sub>16</sub>	X <sub>16</sub>	O <sub>16</sub>
RG <sub>17</sub>	X <sub>17</sub>	O <sub>17</sub>
RG <sub>18</sub>	X <sub>18</sub>	O <sub>18</sub>
RG <sub>19</sub>	X <sub>19</sub>	O <sub>19</sub>
RG <sub>20</sub>	X <sub>20</sub>	O <sub>20</sub>

**DONDE:**

- **R** : Aleatorización o Randomización
- **G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>**: Grupo control que recibió solo el vehículo (agua destilada)
- **G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub>, G<sub>8</sub>, G<sub>9</sub>, G<sub>10</sub>**: Grupo que recibió 50mg/kg de peso de extracto seco hidroalcohólico de Psidium guajava
- **G<sub>11</sub>, G<sub>12</sub>, G<sub>13</sub>, G<sub>14</sub>, G<sub>15</sub>**: Grupo que recibió 100mg/kg de peso de extracto seco hidroalcohólico de Psidium guajava
- **G<sub>16</sub>, G<sub>17</sub>, G<sub>18</sub>, G<sub>19</sub>, G<sub>20</sub>**: Grupo que recibió 200mg/kg de peso de extracto seco hidroalcohólico de Psidium guajava
- **X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub>, X<sub>15</sub>, X<sub>16</sub>, X<sub>17</sub>, X<sub>18</sub>, X<sub>19</sub>, X<sub>20</sub>, X<sub>21</sub>, X<sub>22</sub>, X<sub>23</sub>, X<sub>24</sub>**: Dosis de extracto seco hidroalcohólico que fue administrado a las ratas todos los días durante 28 días.
- **O<sub>1d</sub>, O<sub>2d</sub>, O<sub>3d</sub>, O<sub>4d</sub>, O<sub>5d</sub>, O<sub>6d</sub>, O<sub>7d</sub>, O<sub>8d</sub>, O<sub>9d</sub>, O<sub>10d</sub>, O<sub>11d</sub>, O<sub>12d</sub>, O<sub>13d</sub>, O<sub>14d</sub>, O<sub>15d</sub>, O<sub>16d</sub>, O<sub>17d</sub>, O<sub>18d</sub>, O<sub>19d</sub>, O<sub>20d</sub>, O<sub>21d</sub>, O<sub>22d</sub>, O<sub>23d</sub>, O<sub>24d</sub>**: Pruebas hematológicas que fueron realizadas el día 29, con su posterior sacrificio para realizar el estudio histopatológico.

### 3.4. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

#### 3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS.

##### 3.4.1.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

“Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Psidium guajava* “

**Definición conceptual:** es el preparado concentrado de los constituyentes activos de la droga cruda, obtenidas mediante extracción por maceración. **(40)**

##### Definición operacional

- **Naturaleza:** *Cuantitativa*
- **Medición:** *Directa*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *Balanza analítica y micropipeta.*
- **Procedimiento de medición:** *Se pesa el extracto seco (mg) luego se realiza su dilución en agua destilada (ml) y se toma una cantidad adecuada con una micropipeta.*
- **Indicadores:** *Cantidad de extracto disuelto /Cantidad de agua.*
- **Expresión final:** *mg/ml*

##### 3.4.1.2 VARIABLE DEPENDIENTE

“Actividad antibacteriana sobre los cultivos de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*”

**Definición conceptual:** se define como la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar a las bacterias. **(41)**

**Definición operacional:**

- **Naturaleza:** *Cuantitativa*
- **Medición:** *Directa*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *Vernier*
- **Procedimiento de medición:** *Se mide los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por las diferentes concentraciones del extracto usando el vernier*
- **Indicadores:** *Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano*
- **Expresión final:** *mm.*

“Toxicidad subaguda en ratas albinas”

**Definición conceptual:** Efectos adversos que ocurren como resultado de una dosis diaria repetida de una sustancia química, o exposición a una sustancia química durante parte del ciclo de vida de un organismo (generalmente, no excede 10%). Con animales experimentales, el período de exposición puede variar de unos pocos días a seis meses. (38)

**Definición operacional:**

**Sub Variables:**

- a) **Hemoglobina:** compuesto de proteína y hierro de la sangre que transporta oxígeno a las células desde los pulmones y dióxido de carbono desde las células a los pulmones. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro*
- **Procedimiento de medición:** *Se toma 20µL de sangre obtenida de los animales de experimentación y se depositan en un tubo con 5mL de solución Drabkin y se lleva al espectrofotómetro.*
- **Expresión final:** *gramos/decilitro (g/dL)*

b) **Hematocrito:** Porcentaje del volumen de eritrocitos en la sangre total. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa*
- **Medición:** *Indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *Regla milimetrada para conteo de glóbulos rojos*
- **Procedimiento de medición:** *Se usa tubos de hematocrito (capilares) heparinizados a los cuales se agrega sangre de los animales de experimentación; los capilares se llevan a centrifugar y finalmente se usa la regla milimetrada para hallar el número de glóbulos rojos.*
- **Expresión final:** *porcentaje ( % )*

c) **Recuento total de leucocitos:** Recuento en el que se ofrece la cifra global de leucocitos. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *directa.*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *cámara de Newbawer.*
- **Procedimiento de medición:** *se toma 20µL de sangre obtenida a partir de los animales de experimentación que se mezclan con 380µL de solución de Turk; se deposita una gota de la mezcla a una cámara de newbawer donde se realiza la lectura.*
- **Expresión final:** *células/mililitro.*

d) **Recuento diferencial de leucocitos:** Recuento en el que, junto a la cifra global de leucocitos, se ofrece el porcentaje de cada una de sus variedades. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *directa.*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *microscopio.*
- **Procedimiento de medición:** *se realiza tinción con el reactivo de Wright y luego se lleva al microscopio para su conteo diferencial.*
- **Expresión final:** *porcentaje (%).*

e) **Fosfatasa alcalina:** Enzima presente en el hueso, los riñones, el intestino, el plasma y los dientes. Pueden encontrarse niveles séricos elevados en algunas enfermedades óseas y hepáticas y en algunos otros trastornos. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro*
- **Procedimiento de medición:** *las muestras se preparan siguiendo las instrucciones del kit para determinación de Fosfatasa alcalina y se llevan a un espectrofotómetro para su lectura*
- **Expresión final:** *unidades/litro ( UI/L )*

f) **Transaminasa glutámico oxalacética (TGO):** Enzima catalítica encontrada en varias partes del cuerpo, especialmente corazón, hígado y tejido muscular. Se encuentran cantidades elevadas de esta enzima en el suero en casos de infarto de miocardio y de hepatopatía aguda, con el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células. (42)

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro*
- **Procedimiento de medición:** *las muestras se preparan siguiendo las instrucciones del kit para determinación de Transaminasa glutámico oxalacética y se llevan a un espectrofotómetro para su lectura*
- **Expresión final:** *unidades/litro (UI/L)*

g) **Transaminasa glutámico pirúvica (TGP):** Enzima catalítica que se encuentra normalmente en concentraciones elevadas en el hígado. Cantidades por encima de lo normal en suero indican lesión hepática. **(42)**

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro*
- **Procedimiento de medición:** *las muestras se preparan siguiendo las instrucciones del kit para determinación de Transaminasa glutámico pirúvica y se llevan a un espectrofotómetro para su lectura.*
- **Expresión final:** *unidades/litro ( UI/L )*

h) **Urea:** Compuesto que se forma a partir del amoniaco, en el hígado. Es el principal catabolito del metabolismo de proteínas. **(42)**

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro.*
- **Procedimiento de medición:** *las muestras se preparan siguiendo las instrucciones del kit para determinación de Urea y se llevan a un espectrofotómetro para su lectura*
- **Expresión final:** *gramos/Litro (gr/L)*

i) **Creatinina:** Producto final del metabolismo de creatina. Se encuentra en el musculo y en la sangre y se elimina por la orina. **(42)**

- **Naturaleza:** *Cuantitativa.*
- **Medición:** *indirecta*
- **Escala:** *de razón o proporción.*
- **Instrumento de medición:** *espectrofotómetro.*
- **Procedimiento de medición:** *las muestras se preparan siguiendo las instrucciones del kit para determinación de creatinina y se llevan a un espectrofotómetro para su lectura.*
- **Expresión final:** *miligramos/decilitro ( mg/L )*

j) **Estudio histopatológico:** Estudio con el microscopio, de los tejidos y de los órganos enfermos. (42)

- **Naturaleza:** *cualitativa.*
- **Medición:** *directa*
- **Escala:** *nominal.*
- **Instrumento de medición:** *microscopio.*
- **Procedimiento de medición:** *se sacrifica a las ratas con el fin de examinar macroscópicamente y microscópicamente los siguientes órganos: cerebro, hígado y riñones.*
- **Expresión final:** *Alteraciones celulares y tisulares*

### 3.4.2. VARIABLES NO IMPLICADAS:

#### 3.4.2.1. VARIABLES INTERVINIENTES:

##### a) De la Planta:

- **Estado de crecimiento.** La planta de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" al momento de la recolección se encontraba en estado joven de crecimiento.
- **Lugar de recolección.** Se eligió para la recolección de la especie en estudio la provincia de la Convención del departamento de cusco.
- **Altitud de la recolección.** La especie vegetal Sahuinto se recolecto a los 2377 msnm aproximadamente
- **Temporada de recolección.** La especie vegetal Sahuinto se recolecto entre los meses de marzo y abril.
- **Parte de la planta a usar.** Se uso las hojas de la especie vegetal Sahuinto.

##### b) De las bacterias:

- **Bacterias aisladas.** Cepas bacterianas viables previamente identificadas que se observaran en las placas petri.
- **Medio de cultivo.** Se usaran los medios de Cultivo Caldo Cerebro Corazón, Mueller Hinton preparados de acuerdo a las especificaciones del fabricante en condiciones asépticas.

**c) De las ratas:**

**Raza:** se usaron para las pruebas de toxicidad aguda ratas Holtzman.

**Edad:** la edad será ratas es aproximadamente 4 - 6 semanas de vida.

**Sexo:** se usó ratas macho.

**Peso:** las ratas deberán tener un peso promedio de 285 gramos

CUADRO Nº3.1: RESUMEN DE VARIABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

DEFINICIÓN OPERACIONAL	VARIABLES IMPLICADAS	
	INDEPENDIENTE	DEPENDIENTE
	Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de <i>Psidium guajava</i> "sahuinto"	Actividad antibacteriana sobre los cultivos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>
DEFINICIÓN CONCEPTUAL	Concentración es Relación que existe entre la cantidad de una sustancia disuelta y la del disolvente en una disolución. Extracto Hidroalcohólico, se define como aquella sustancia extraída por Etanol, que posee una composición química que le proporciona una acción farmacológica útil en terapéutica y que no ha sufrido otro tratamiento que el necesario para su limpieza y desecación.	Acción de una sustancia o agente el cual destruye o suprime el crecimiento o reproducción de las bacterias
NATURALEZA	Cuantitativa	Cuantitativa
MEDICIÓN	Directa	Directa
ESCALA	Razón o proporción	Razón o proporción
INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	Balanza Analítica de precisión 0.001g.	Vernier
PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	Se pesa el extracto seco (mg) luego se realizará su dilución en agua destilada (ml) y se tomara una cantidad adecuada con una micropipeta.	Se mide los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por las diferentes concentraciones del extracto así como los producidos por los fármacos.
EXPRESIÓN FINAL	mg/ml	mm

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N°3.2: RESUMEN DE VARIABLES DE LA TOXICIDAD SUBAGUDA:  
VARIABLES IMPLICADAS**

INDEPENDIENTE	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INSTRUMENTO DE MEDICION	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESIÓN FINAL
Concentración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de las hojas de <i>Psidium guajava</i> "Sahuinto".	Cuantitativa	Directa	Razón o proporción	Balanza	Se peso y se diluyo el extracto seco con agua destilada y se tomo una cantidad adecuada con una micro pipeta.	mg/ml

DEPENDIENTE	SUB VARIABLES	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO
<b>TOXICIDAD SUBAGUDA EN RATAS ALBINAS</b>	Hemoglobina	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro
	Hematocrito	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Regla de hematocrito
	Recuento total de leucocitos	Cuantitativa	Directa	Razón	Cámara de Newbawer
	Recuento diferencial de leucocitos	Cuantitativa	Directa	Razón	Microscopio
	Pruebas de función hepática	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro
	Urea	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro
	Creatinina	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro
	Estudio histopatológico	Cualitativa	Directa	Nominal	Microscopio
	<b>VARIABLES NO IMPLICADAS</b>				
	<b>INTERVINIENTES</b>				
<b>DE LA PLANTA</b>	Estado de crecimiento, parte de la planta a estudiar, lugar, altitud y temporada de recolección				
<b>DE LAS RATAS</b>	Raza, edad, sexo, peso, alimentación				

FUENTE: Elaboración propia

### **3.4.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN.**

#### **3.4.3.1. DEL MATERIAL VEGETAL.**

**Se incluirán:**

Hojas sanas y homogéneas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto"

**Se excluirán:**

Hojas dañadas, parásitos o contaminadas por insecticidas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto".

#### **3.4.3.2. DE LAS CEPAS BACTERIANAS.**

**Se incluyen:**

Cepas bacterianas ATCC y cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* aisladas a partir de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco.

**Se excluirán:**

Las cepas bacterianas que no estén en buenas condiciones (contaminación)

### **3.5. PROCEDIMIENTO**

#### **3.5.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

➤ **Recolección de la planta de estudio.**

Se recolecto las partes aéreas (hojas) de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto" en la provincia de la Abancay, del departamento de Apurímac situado a 2377 msnm aproximadamente

➤ **Selección y secado de muestra.**

Una vez obtenidas las muestras se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares de las hojas de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto", luego se extendió las hojas seleccionadas de la especie vegetal en papel Kraff para su secado el cual se realizo en un lugar fresco limpio ventilado en sombra y a temperatura ambiente durante 30 días.

### 3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD:

La determinación de la humedad de la especie *Psidium guajava* "Sahuinto" se realizó por triplicado, en placas petri con 10 gramos de muestra fresca (hojas de la planta), las mismas que fueron introducidas a la estufa a la temperatura de 40°C hasta peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación. (46):

$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

Donde:

%H = Porcentaje de humedad

M1 = Peso de la muestra fresca

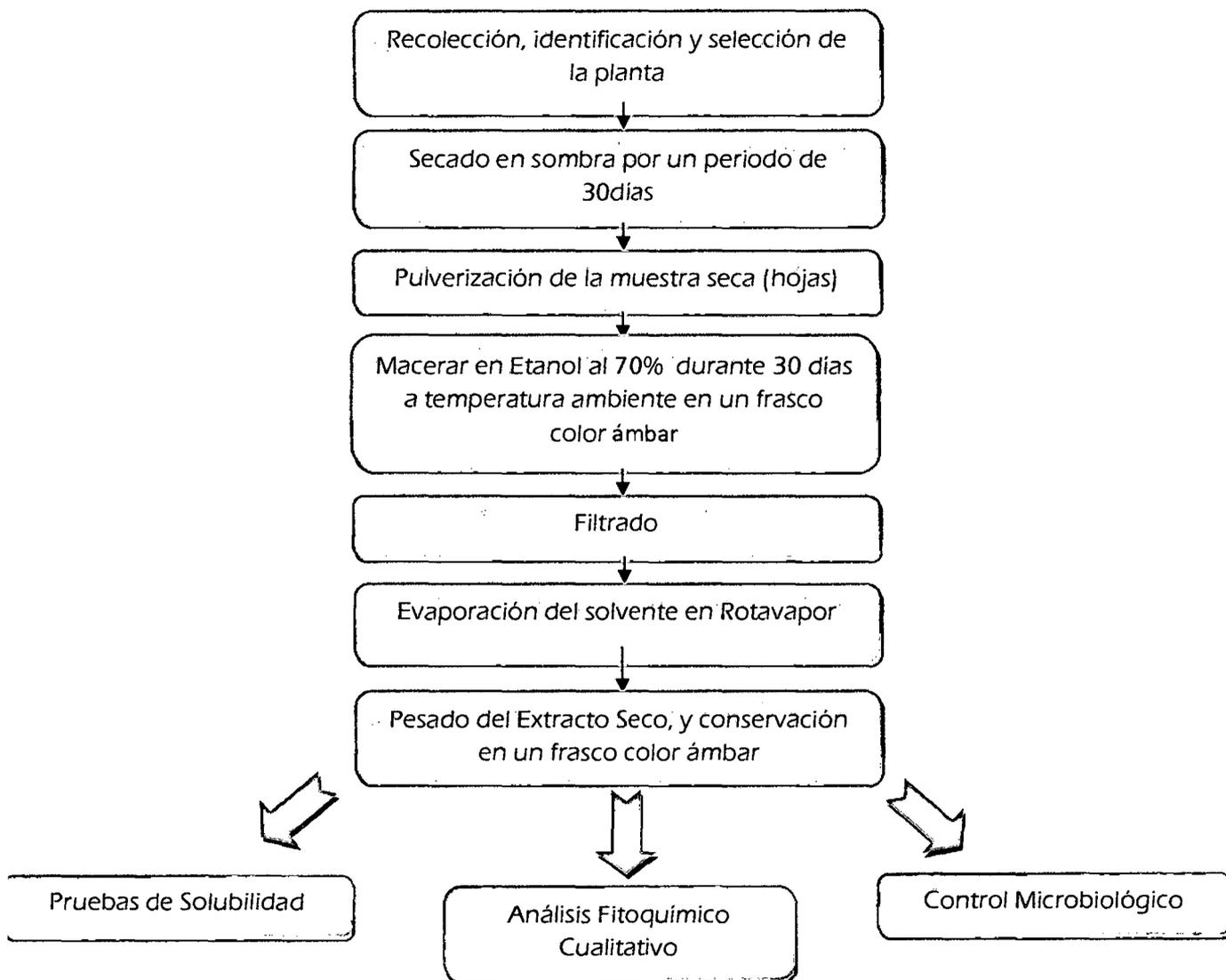
M2 = Peso de la muestra seca

### 3.5.3. OBTENCION DEL EXTRACTO:

Para el proceso de extracción hidroalcohólica al 70% se usó 850 gr de las hojas de la planta *Psidium guajava* "Sahuinto" molida (muestra seca), que fueron maceradas con 4 litros de solución hidroalcohólica al 70% en frascos de vidrio color ámbar debidamente etiquetados y agitándolos diariamente por un periodo de 30 días a temperatura ambiente. Esta solución fue filtrada y luego evaporada a sequedad en Baño María a 45°C obteniéndose el extracto seco hidroalcohólico. Este extracto se usó para las pruebas de solubilidad, análisis Fitoquímico cualitativo, control de calidad microbiológico, la determinación de la actividad antibacteriana y la determinación de la toxicidad subaguda.

## FLUJOGRAMA

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHOLICO AL 70% DE *Psidium guajava* "Sahuinto"



FUENTE: Elaboración propia

### 3.5.3.1. PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN:

El porcentaje de extracción se calcula con la siguiente relación:

$$\% \text{ Extraccion} = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

Pi = peso final (extracto seco)

Pf = peso inicial (muestra pulverizada)

### 3.5.3.2. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD:

Para realizar las pruebas de solubilidad se tomaron unos cuantos miligramos del extracto seco hidroalcohólico que se depositaron en diferentes tubos de ensayo a los cuales se agregó 1 mililitro de solventes de diferente polaridad en forma descendente: agua, metanol, etanol al 96%, etanol al 70%, acetona, acetato de etilo, cloroformo, benceno y hexano.

### 3.5.3.3. ANALISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO:

Los extractos obtenidos fueron analizados mediante una marcha fotoquímica utilizando el método según Olga Loock "Investigación Fotoquímica" (Anexo N°7)

**CUADRO N° 3.3 ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO**

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO
Cloruro Férrico 1%	Compuestos Fenólicos
Gelatina	Taninos
Reacción de SHINODA	Flavonoides
BENEDIC	Glicósidos
Acido Sulfúrico Concentrado	Quinonas
Prueba de la Espuma	Saponinas
DRAGUENDORF	Alcaloides
Reactivo de BALGET	Lactonas

**3.5.3.4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Psidium guajava* "Sahuinto"**

Según la "Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano" del Ministerio de Salud (43) todo alimento o bebida en estado natural procesado o elaborado destinado al consumo humano está comprendido dentro de los criterios microbiológicos que observamos en el siguiente cuadro:

**CUADRO N°3.4 ANALISIS MICROBIOLÓGICO**

CRITERIOS	AGAR USADO	PESO DEL EXTRACTO	BACTERIAS Y HONGOS	RESULTADOS ACEPTADOS
<b>CRITERIO IMPERATIVO:</b> No debe presentarse caso contrario el riesgo es muy elevado	Agar SS	1g	<i>Salmonella</i>	NEGATIVO
<b>CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE:</b> El exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto puede ser rechazado	Agar Mcconkey	1g	Coliformes Fecales ( <i>E. coli</i> )	NEGATIVO
<b>CRITERIOS DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS:</b> Significa que durante el proceso de propagación del extracto no se debe exceder los límites especificados	Agar Saboraud	1g	-Aerobios mesófilos. -Hongos y Levaduras	NEGATIVO

Fuente: DIGESA, Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, Cusco-Perú, 1999.

### 3.5.4 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUB AGUDA

#### 3.5.4.1 METODOLOGIA

Se usaron 20 ratas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman macho certificadas obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Salud con peso promedio de 250 gramos que fueron divididas en 4 grupos, un grupo control, y tres grupos que recibieron el extracto de la especie vegetal *Psidium guajava* en distintas dosis como se describe en el cuadro a continuación:

**CUADRO N° 3.3 GRUPOS DE EXPERIMENTACION PARA LA TOXICIDAD SUBAGUDA**

Grupo			
Control	G1 (50mg/kg)	G2 (100mg/Kg)	G3 /200mg/Kg)
5 ratas	5 ratas	5 ratas	5 ratas

**FUENTE: ELABORACION PROPIA**

Se mantuvieron en jaulas separadas durante 10 días antes de empezar el experimento y durante el experimento a una temperatura aproximada de 13-18 °C y con una luminosidad diaria aproximada de 12 horas, se les alimento con agua *ad libitum* y un concentrado comercial que contenía un 22% de proteína

El día 1 se comenzó con la administración por vía oral del extracto seco hidroalcohólico disuelto en agua destilada (usando una sonda nasogástrica N°4) a los grupos G1, G2 y G3 las dosis de 50mg/Kg, 100mg/Kg y 200mg/Kg respectivamente; así como agua destilada al grupo control.

Se realizó un control del peso una vez por semana y el último día antes del sacrificio

El día 29 se tomó muestras de sangre por punción cardiaca a todas las ratas para realizar los siguientes análisis:

- Hematocrito
- Recuento de glóbulos rojos
- Recuento de glóbulos blancos
- Recuento diferencial de glóbulos blancos
- Creatinina
- Hemoglobina
- Urea
- Fosfatasa alcalina
- Transaminasa glutámico pirúvica

- Transaminasa glutámico oxalacética

Este mismo día se sacrificó a las ratas usando Cloroformo por vía inhalatoria extrayéndose los siguientes órganos:

- Hígado
- Riñón
- Corazón

Se escogió 2 ratas de cada grupo de manera aleatoria para el análisis histopatológico.

#### **3.5.4.2 ANÁLISIS TOXICOLÓGICO**

##### **A.- DETERMINACIÓN DEL HEMATOCRITO:**

Se usó tubos capilares de 7cm de largo por 1mm de diámetro interior heparinizados; el tubo se llenó hasta 1 cm de su extremo y este se tapó con plastilina por el otro extremo, luego se llevó a centrifugar a 5000 rpm durante 5min, después se procedió a la lectura de la proporción del volumen ocupado por los hematíes con una regla milimetrada. **(32)**

##### **B.- RECUENTO DE GLÓBULOS ROJOS:**

Se usó la pipeta para conteo de glóbulos rojos que es la que lleva la marca de 101, se cargó la pipeta aspirando sangre hasta la marca 0.5 (dilución 1 en 200), luego se aspiró el líquido de dilución (solución de Hayems) hasta la marca 101, se homogeneizó manteniendo la posición horizontal y se dejó reposar por 5 minutos

Luego se cargó la cámara de Neubauer

Se desechó las primeras 4 gotas y se aplicó una gota al borde de la cámara, se procedió al recuento usando el objetivo 40x. **(32)**

##### **Cálculos:**

Para determinar el número de glóbulos rojos se cuenta el número de glóbulos rojos en el cuadro central del retículo de Thomas contando 80 cuadrados pequeños, al resultado se le añade cuatro ceros para obtener la cantidad total por  $\text{mm}^3$  sangre

### **C.- RECUESTO DE GLÓBULOS BLANCOS:**

Se usó la pipeta para conteo de glóbulos blancos que es la que lleva la marca de 11, se cargó la pipeta aspirando sangre hasta la marca 0.5 (dilución 1 en 20), luego se aspiró el líquido de dilución (reactivo de Turk) hasta la marca 11, se homogeneizó manteniendo la posición horizontal y se dejó reposar por 5 minutos

Ahora procedemos a cargar la cámara de Neubauer

Se desechó las primeras 4 gotas y se aplicó una gota al borde de la cámara, se procedió al recuento usando el objetivo 10x. **(32)**

#### **Cálculos:**

Se cuenta el número de glóbulos blancos en los cuatro cuadrados (que se encuentran en las esquinas) del retículo de Thomas luego se saca un promedio de los glóbulos blancos contados en los cuatro cuadros y multiplicar por 10 (altura de la cámara) y luego por 20(título de la dilución) lo que equivale a multiplicar directamente por 200 esto nos dará el número total de leucocitos por mm<sup>3</sup> de sangre ó de manera más practica multiplicar por 50 el número total de leucocitos contados en los cuatro cuadros del retículo de Thomas. **(32)**

Dicho cálculo se resume utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Numero de Globulos Blancos} = \frac{L * 20 * 10}{4}$$

Donde:

L= Sumatoria de Glóbulos Blancos contados en las cuatro esquinas del retículo de Thomas

### **D.- RECUESTO DIFERENCIAL DE GLÓBULOS BLANCOS**

#### **Frotis sanguíneo:**

Se dejó caer una gota de sangre capilar sin anticoagulante en una lámina porta objetos y con otra lámina se realizó el frotis; se dejó secar al ambiente.

El frotis sanguíneo consta de tres partes:

**Cabeza:** Es la parte donde se coloca la sangre, tiene gran concentración de eritrocitos

**Cuerpo:** Parte media de un frotis, esta parte se emplea para la evaluación microscópica

Cola: zona final del frotis, esta zona se encuentra diluida, la morfología de las células se ve alterada.

Una buena extensión tiene las siguientes características:

- La cabeza ha de estar cerca de uno de los extremos del porta.
- La cola debe estar cercana al otro extremo del porta, pero sin llegar a él.
- El borde de la cola debe estar finamente deshilachado, ese fino deshilachamiento recibe el nombre de barbas.
- Toda la extensión ha de ser fina y homogénea.
- Una extensión normal ha de tener una longitud de las  $\frac{3}{4}$  partes del porta objetos.

De esta forma se garantiza una extensión adecuada.

#### **Coloración:**

La lamina porta objetos se llevó sobre un soporte en forma horizontal; se cubrió la lámina con 10 o más gotas de colorante Wright se dejó actuar 1 minuto; sin descartar el colorante se agregó solución tampón o buffer o agua destilada neutra el mismo número de gotas que el Wright; se dejó por 6 minutos luego se descartó el exceso de colorante y se lavó con agua la lámina y finalmente se dejó secar la lámina.

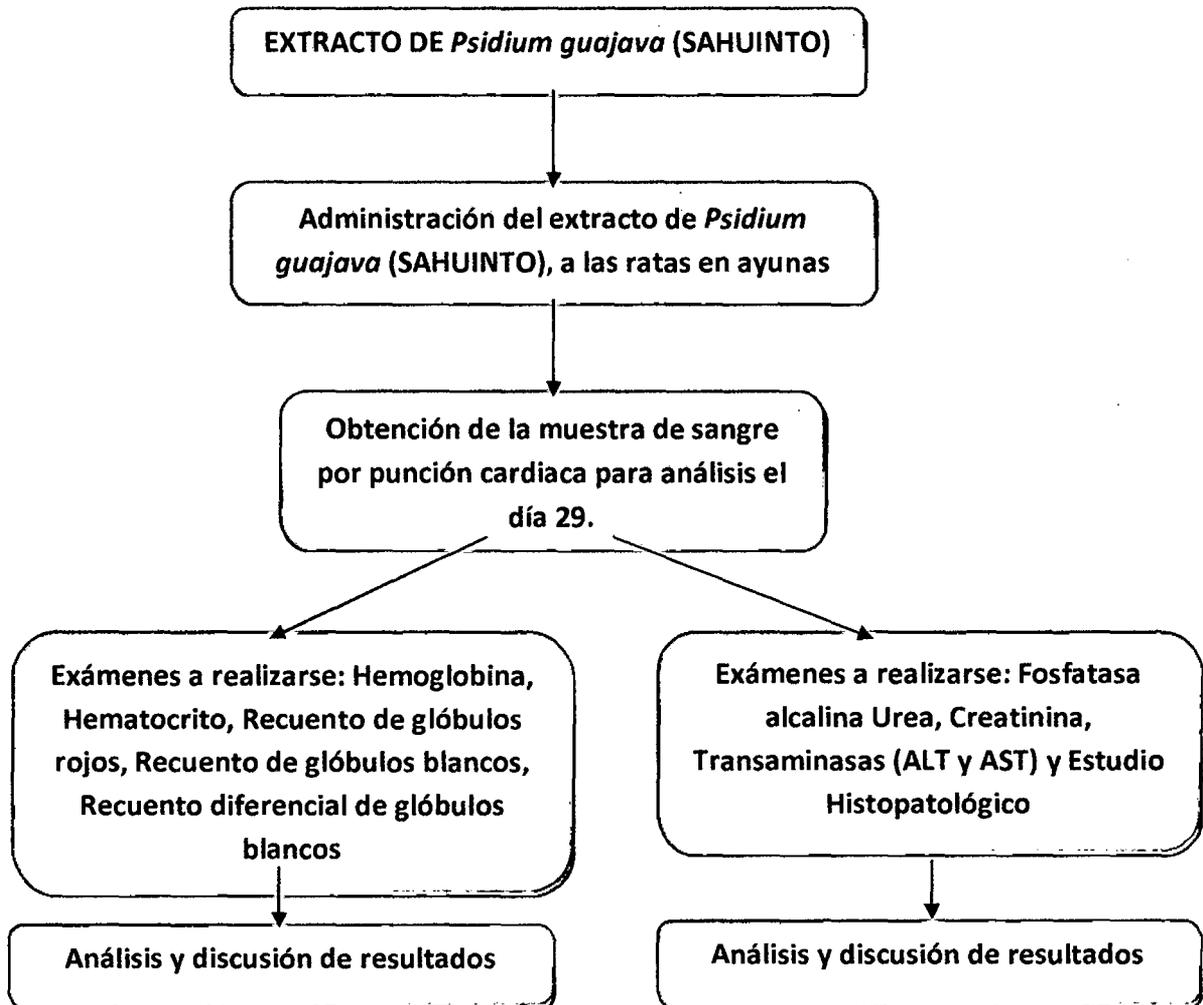
Luego se llevó al microscopio y se observó usando el aceite de inmersión, para el recuento diferencial se usó el método aconsejado por Schilling, que consiste en tomar cuatro puntos marginales recorriendo el campo en zigzag desde el borde hacia la parte central y contar 25 elementos en cada uno de los cuatro puntos. **(32)**

#### **E.-DETERMINACION DE HEMOGLOBINA, UREA, CREATININA, FOSFATASA ALCALINA Y TRANSAMINASAS GLUTAMICO PIRUVICA Y GLUTAMICO OXALACETICA:**

La determinación de estos parámetros se realizó empleando kits de Wiener Lab.

## FLUJOGRAMA

### ENSAYO DE TOXICIDAD SUBAGUDA DEL EXTRACTO DE *Psidium guajava* (SAHUINTO)



FUENTE: Elaboración propia

### 3.5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:

#### 3.5.5.1 PRIMERA FASE

##### a) Cepas ATCC: REACTIVACIÓN

Las cepas ATCC fueron obtenidas de Microbiologics Inc (AnexoN°16), para su reactivación Microbiologics Inc recomienda los siguientes agares.

- Agar tripticasa soya
- Agar mueller hinton o Agar Nutritivo

En este caso usamos agar MuellerHinton; para realizar el cultivo se procedió como indica las instrucciones de Microbiologics Inc (Anexo N°17)

Finalmente se incubaron a 37°C por un tiempo de 24 horas, luego de esto se escogió las colonias para su conservación.

#### **b) CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS**

Fueron conservadas en frascos con 4ml de Agar Tripticasa soya en pico de flauta debidamente rotulados y codificados e incubados a 37°C por 24 horas, para posteriormente ser conservados a 4°C en refrigerador y replicados a un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la cepa.

#### **c) ESTANDARIZACION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* ATCC25922 Y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853**

Se tomó un inóculo de cada una de las bacterias que se encontraban en estado de conservación en el agar Tripticasa soya, este inóculo se propagó en 5ml de caldo de cultivo BHI y luego se incubó durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se realizó una dilución de 1/100 tomando 1ml de este caldo con bacterias y vertiéndolo en un matraz con 99ml de caldo BHI puro, luego se incubaron a 37°C, la evaluación del crecimiento bacteriano se realizó cada media hora mediante la lectura de la densidad óptica (D.O.) del cultivo a una longitud de onda de 623 nm en el espectrofotómetro.

#### **d) PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR EL MÉTODO DE POZOS EXCAVADOS**

- **Preparación del inóculo:**

Se cultivaron las especies bacterianas en estudio en 5 ml de caldo BHI y se llevó a la estufa a una temperatura de 37°C durante 5 a 6 horas (según la curva de crecimiento), con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en las placas.

- **Preparación de las placas Petri y procedimiento:**

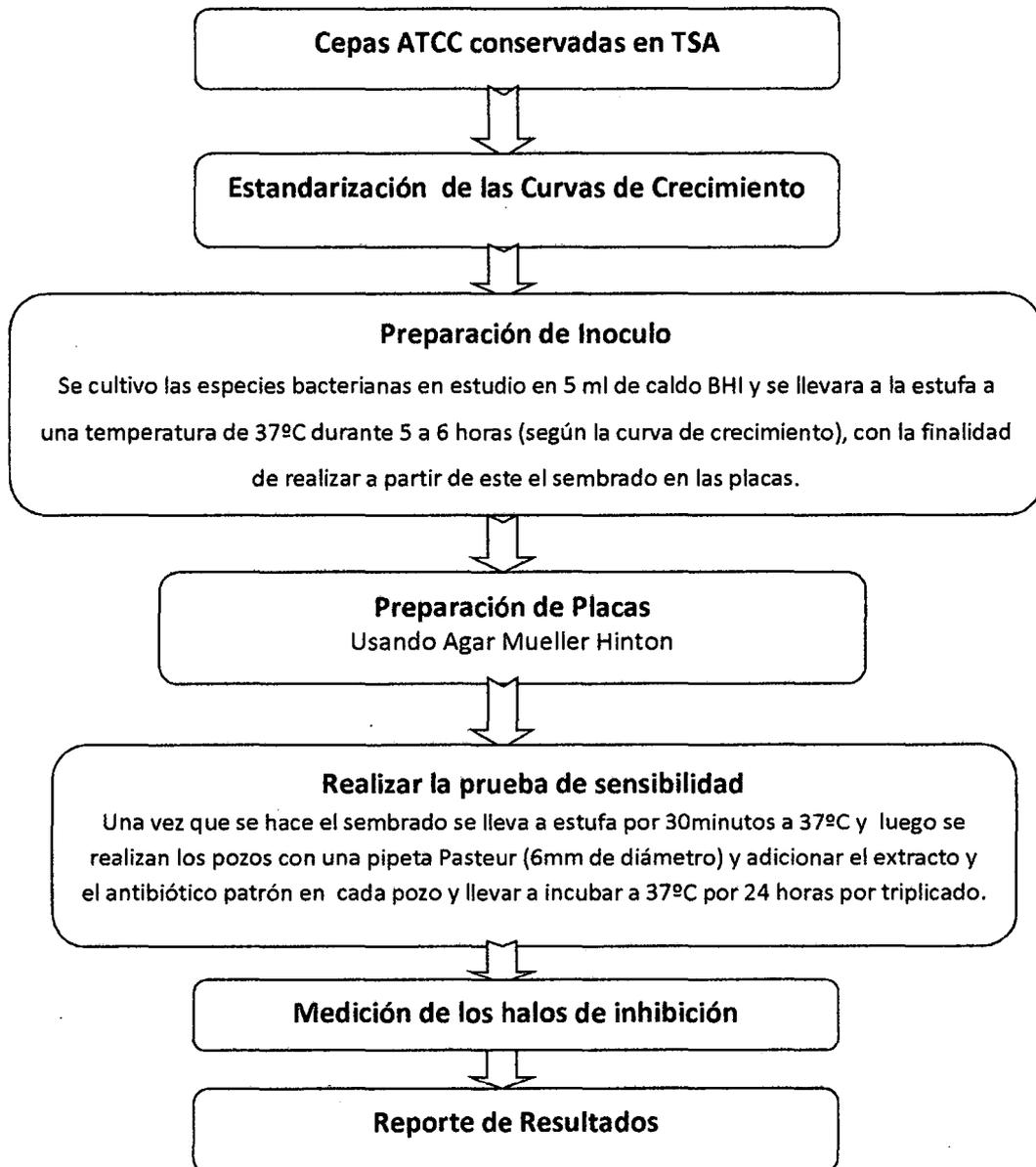
- Se prepararon las placas petri que contengan Agar Muller Hinton con una cantidad de 20mL aproximadamente. Luego se incubaron a 37°C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad.
- Se elaboraron los preparados de las concentraciones del extracto en mg/100ul y el fármaco patrón (amikacina 30ug/100ul)

- Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra con la ayuda de un hisopo estéril, en las placas con agar Muller Hinton ya preparadas
- Se llevo a la estufa a 37°C por 30 minutos, luego se hicieron 4 pozos por placa con la ayuda de una pipeta Pasteur (un diámetro de 6mm),
- Luego usando una micro pipeta se introdujo los extractos ya preparados y el antibiótico patrón en los pozos
- Finalmente se incubo a 37°C por 24 horas, luego de este tiempo se mide el diámetro de los halos formados.

#### **e) ENSAYO CON EL ANTIBIÓTICOPATRÓN**

De acuerdo a los protocolos de tratamiento, se considera a los aminoglucósidos como una de las opciones para tratar infecciones del tracto urinario producidas a nivel intra-hospitalario, y ya que esta investigación se realizo aislando cepas bacterianas a partir de urocultivos positivos del Hospital Regional del Cusco se eligió a la Amikacina como fármaco patrón en esta investigación.

**FLUJOGRAMA**  
**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO**  
**SECO HIDROALCOHOLICO AL 70% DE *Psidium guajava* “Sahuinto” CONTRA**  
**CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922 Y *Pseudomona aeruginosa* ATCC**  
**27853**



**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA**

#### f) ESTANDARIZACION DE LA CONCENTRACION ANTIBACTERIANA:

Las concentraciones se determinaran hallando el factor de incremento para cada bacteria en experimentación, teniendo en cuenta las concentraciones mínima y máxima inhibitorias halladas durante la prueba piloto:

$$\text{Factor de incremento} = \sqrt[r]{i}$$

Donde:

$$i = \frac{\text{Concentración Máxima}}{\text{Concentración Mínima}}$$

$$r = N - 1$$

N = Numero de concentraciones con las que se desea trabajar

Las concentraciones con las que se trabajara serán las siguientes:

- I. Concentración Mínima = Concentración 1
- II. Concentración 1 x Factor de Incremento = Concentración 2
- III. Concentración 2 x Factor de Incremento = Concentración 3
- IV. Concentración 3 x Factor de Incremento = Concentración 4
- V. Concentración 4 x Factor de Incremento = Concentración 5
- VI. Concentración 5 x Factor de Incremento = Concentración 6
- VII. Concentración 6 x Factor de Incremento = Concentración 7
- VIII. Concentración 7 x Factor de Incremento = Concentración 8
- IX. Concentración 8 x Factor de Incremento = Concentración 9

10º Concentración Máxima

Este procedimiento se realizara con cada una de las bacterias en experimentación.

#### 3.5.5.2 SEGUNDA FASE

##### a. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS *Escherichia coli* Y *Pseudomona aeruginosa* DEL HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO

Para el aislamiento de las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* se utilizaron urocultivos positivos de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Del Cusco.

## OBTENCION DEL TAMAÑO DE MUESTRA:

EL TAMAÑO DE MUESTRA SE HALLARA ESTADISTICAMENTE USANDO LA FORMULA PARA POBLACION FINITA:

$$n = \frac{Nz^2pq}{E^2(N - 1) + z^2pq}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra del estudio prospectivo.

z = 1.96 valor en la tabla normal al 95% de confianza.

P = Proporción de muestras que presentan cultivos positivos de infección del tracto urinario en el laboratorio del Hospital Regional (95%)

q = Proporción de muestras que presentan cultivos negativos de infección del tracto urinario (5%)

E = Error muestral = 5%

N = total de muestras de urocultivos positivos obtenidos.

Teniendo 15 muestras de urocultivos positivos obtenidas en el laboratorio del hospital regional en el periodo de enero a febrero del 2010 se remplaza en la fórmula para población finita obteniéndose:

$$n = \frac{(15)(1.96)^2(0.95)(0.05)}{(0.05)^2(15 - 1) + (1.96)^2(0.95)(0.05)}$$

$n = 13$

Este estudio se realizo usando 13 urocultivos positivos.

## OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Una vez que se tuvo los urocultivos positivos, los microorganismos fueron aislados a 5ml de caldo BHI con el fin de ser conservadas para realizar el respectivo ensayo de sensibilidad bacteria.

### b. PROCESAMIENTO BACTERIOLÓGICO:

Las bacterias que fueron aisladas de urocultivos positivos previamente identificadas en el laboratorio del Hospital Regional del Cusco fueron conservadas en tubos con 4ml de Agar Tripticasa soya en pico de flauta debidamente rotulados y codificados e incubados a 37°C por 24 horas, para posteriormente ser conservados a 4°C en

refrigerador y replicados a un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la cepa.

**c. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* Y *Pseudomona aeruginosa* AISLADAS.**

Para proceder a la estandarización de las curvas de crecimiento, se tomo un inculo de cada una de las bacterias que se encuentran en estado de conservación en el Agar Tripticasa soya, esta inculo se propagara en 5ml de caldo de cultivo BHI para luego incubar durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se realizara una dilución de 1/100 tomando 1ml de este caldo con bacterias y vertiéndolo en un matraz con 99ml de caldo BHI puro, luego se incubara a 37°C, la evaluación del crecimiento bacteriano se realizara a cada hora mediante la lectura de la densidad óptica (D.O.) del cultivo a una longitud de onda de 623nm en el espectrofotómetro.

**d) PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR EL MÉTODO DE POZOS EXCAVADOS**

• **Preparación del inculo:**

Se cultivaron las especies bacterianas en estudio en 5 ml de caldo BHI y se llevo a la estufa a una temperatura de 37°C durante 5 a 6 horas (según la curva de crecimiento), con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en las placas.

• **Preparación de las placas Petri y procedimiento:**

- Se prepararon las placas petri que contengan Agar Muller Hinton con una cantidad de 20mL aproximadamente. Luego se incubaran a 37°C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad.
- Se elaboraron los preparados de las concentraciones del extracto en mg/100ul y el fármaco patrón (amikacina 30ug/100ul)
- Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra con la ayuda de un hisopo estéril, en las placas con agar Muller Hinton ya preparadas.
- Se llevo a la estufa a 37°C por 30 minutos, luego se hicieron 4 pozos por placa con la ayuda de una pipeta Pasteur (un diámetro de 6mm),
- Luego usando una micro pipeta se introdujo los extractos ya preparados y el antibiótico patrón en los pozos
- Finalmente se incubo a 37°C por 24 horas, luego de este tiempo se mide el diámetro de los halos formados.

### **3.6 PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto", se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 19.

El procesamiento de variables cuantitativas se realizara mediante el análisis de la varianza ANOVA con análisis Pots hoc y el Test de STUDENT con el 95% de confianza.

# ***CAPÍTULO IV***

## 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1 DE LOS ENSAYOS FITOQUÍMICOS PRELIMINARES DE *Psidium guajava*

#### 4.1.1 PORCENTAJE DE HUMEDAD

El porcentaje de humedad se muestra en el siguiente cuadro:

CUADRO N° 4.1: Determinación del Porcentaje de Humedad

	<i>Psidium guajava</i> "SAHUINTO"				
N° de Determinaciones	1	2	3	4	5
Peso de Muestra Fresca	10g	10g	10g	10g	10g
Peso de Muestra Seca	2.43	2.42	2.44	2.42	2.45
% de Humedad	75.7	75.8	75.6	75.8	75.5
Promedio de % de Humedad	75.68				

FUENTE: Elaboración propia

#### INTERPRETACIÓN:

El porcentaje de humedad de las hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO" fue del 75.68%, un porcentaje de humedad elevado; por lo que la muestra tendrá un mayor riesgo a contaminación ya sea de origen bacteriano o fúngico, puesto que el agua es un medio que favorece la proliferación de estos agentes; la determinación del porcentaje de humedad nos permite tomar una mayor previsión para el proceso de secado y un mejor acondicionamiento para el almacenamiento de las hojas.

#### 4.1.2 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

Los resultados del porcentaje de extracción se muestran en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.2: Determinación del Porcentaje de Extracción**

	<i>Psidium guajava</i> "SAHUINTO"		
Peso de Muestra Molida	10g	10g	10g
Peso del Extracto Seco	4.68g	4.69g	4.66g
% de Extracción	46.8	46.9	46.6
Promedio del % de Extracción	46.767		

FUENTE: Elaboración propia

#### INTERPRETACIÓN:

En el presente cuadro el porcentaje de extracción de hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO" donde se obtuvo un promedio de 46.767, esto se realizó por el método de maceración con etanol al 70%. El porcentaje de extracción de las hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO", es alto por lo que no fue necesario el uso de grandes cantidades de la especie vegetal en estudio.

#### 4.1.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la determinación de las pruebas de solubilidad se utilizaron diferentes solventes que van de mayor a menor polaridad obteniéndose los siguientes resultados (Anexo N° 8):

CUADRO N° 4.3: Pruebas de Solubilidad

Solvente	Extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de hojas de <i>Psidium guajava</i> "SAHUINTO"
Agua destilada	+
Metanol	+
Etanol del 40%	+
Etanol del 50%	+
Etanol del 60 %	+
Etanol del 70%	++
Etanol del 96%	++
Acetona	+
Éter	+
Cloroformo	-
Hexano	-
Bencina	-
Dimetilsulfóxido (DMSO)	+++
Tween 80	-

FUENTE: Elaboración propia

#### Leyenda:

- Muy soluble           +++
- Soluble                ++
- Poco soluble         +
- Insoluble             -

FUENTE:

#### INTERPRETACIÓN:

El presente cuadro muestra la solubilidad que presenta el extracto seco hidroalcohólico de las hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO", como podemos observar el extracto presenta una polaridad intermedia, de lo cual podemos inferir que los principios activos presentes en el extracto son también de polaridad intermedia.

El uso del solvente DMSO se utilizó para realizar las pruebas de la Actividad Antibacteriana, porque al ser más soluble se utiliza un menor volumen de este solvente para poder realizar las diluciones necesarias.

Para la prueba de toxicidad subaguda se realiza la dilución del extracto seco hidroalcohólico de las hoja de *Psidium guajava* "SAHUINTO", con agua destilada para poder administrar de manera más confiable y segura las dosis diarias de extracto por vía oral a las ratas.

#### 4.1.4 PRUEBAS FITOQUÍMICAS CUALITATIVAS

El análisis fitoquímico cualitativo se realizó para identificar y corroborar la presencia de los metabolitos secundarios presentes en el extracto obteniéndose los siguientes resultados.

**CUADRO N°4.4: Resultados del análisis Fitoquímico**

TIPO PRUEBA	DE	REACCION RECONOCIMIENTO	DE	Extracto Seco Hidroalcohólico al 70%de <i>Psidium guajava</i> "SAHUINTO"
Compuestos Fenólicos		Cloruro Férrico 1%		+++
Taninos		Gelatina		+++
Flavonoides		Reacción de SHINODA		+++
Glicósidos		BENEDIC		+++
Quinonas		Ácido Sulfúrico Concentrado		+++
Saponinas		Prueba de la Espuma		+++
Alcaloides		DRAGENDORF		-
Lactonas		Reactivo de BALJET		+++

**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA**

#### INTERPRETACIÓN:

De acuerdo a la marcha fotoquímica no hay presencia de alcaloides, mientras que las demás pruebas fotoquímicas indican el alto contenido de Compuestos Fenólicos, Taninos, Flavonoides, Glicósidos, Quinonas, Saponinas y Lactonas.

#### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Los Flavonoides y los Compuestos Fenólicos son sintetizados por las plantas en respuesta a una infección microbiana; su actividad probablemente se debe a su habilidad de formar complejos con proteínas extracelulares solubles, así como también formar complejos con la pared celular bacteriana, los flavonoides mas lipófilos probablemente sean los que quebrantan la membrana celular.

El modo de acción antibacteriano de los taninos puede estar relacionado con su capacidad para inactivar la adhesión bacteriana, enzimas etc.

El modo de acción de los efectos antibacterianos de las saponinas parece estar relacionado con propiedades membranolíticas. (2)

#### 4.1.5 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE LAS HOJAS DE *Psidium guajava*

CUADRO N° 4.5: Resultados del Control Microbiológico

CRITERIOS	PESO DEL EXTRACTO	BACTERIAS Y HONGOS	RESULTADOS
<b>CRITERIO IMPERATIVO:</b> No debe presentarse caso contrario el riesgo es muy elevado (Obligatorio)	1g	<i>Salmonella</i>	NEGATIVO
<b>CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE:</b> El exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto y que el producto puede ser rechazado (Obligatorio)	1g	Coliformes Fecales ( <i>E. coli</i> )	NEGATIVO
<b>CRITERIOS DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS:</b> Significa que durante el proceso de propagación del extracto no se debe exceder los límites especificados (Facultativo)	1g	-Aerobios mesófilos. -Hongos y Levaduras	NEGATIVO

FUENTE: Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano

#### INTERPRETACIÓN:

El control microbiológico realizado demuestra que el Extractos Seco Hidroalcohólico al 70% de las Hojas de *Psidium guajava* (Sahuinto) está libre de contaminación, utilizando los criterios que se encuentran dentro del Control de Calidad a nivel microbiológico indicadas por la DIGESA, lo que nos confirma que los extractos se encuentran aptos para realizar el presente estudio, ya que de esta manera eliminamos los posibles riesgos de

contaminación y alteración de resultados que se podrían presentar en el estudio, tanto en la parte toxicológica como en la parte microbiológica.

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### 4.2.1 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

#### 4.2.1.1 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*

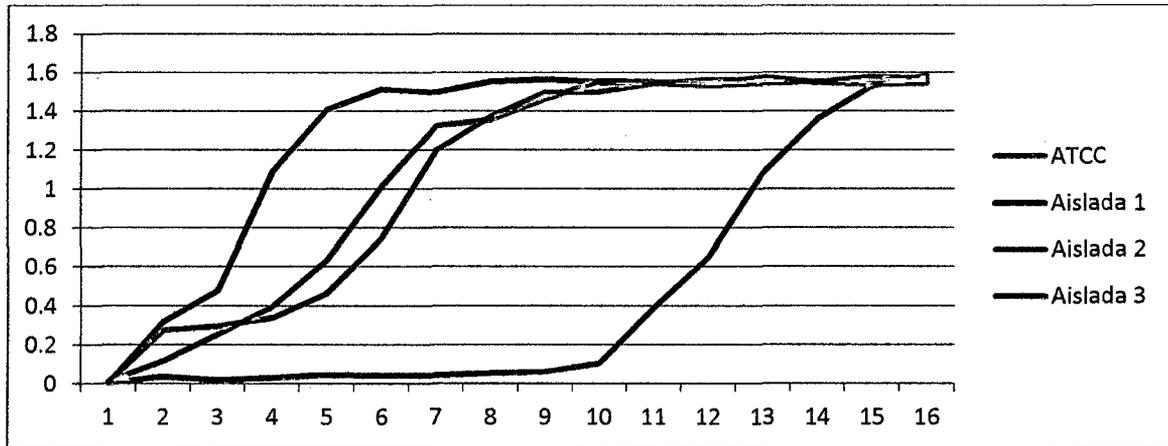
En el siguiente cuadro podemos observar las absorbancias que se obtuvieron cada 30 minutos (0.5 horas) a una longitud de onda de 623 nm de las cepas ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli*.

**CUADRO N° 4.6: Absorbancias para la curva de crecimiento de *Escherichia coli***

Horas	<i>Escherichia coli</i>			
	ATCC	Aislada 1	Aislada 2	Aislada 3
0	0.007	0.004	0.012	0.01
0.5	0.036	0.317	0.115	0.276
1	0.021	0.478	0.254	0.297
1.5	0.031	1.089	0.397	0.339
2	0.047	1.412	0.635	0.463
2.5	0.04	1.515	1.012	0.748
3	0.043	1.499	1.325	1.198
3.5	0.054	1.555	1.357	1.376
4	0.063	1.565	1.467	1.498
4.5	0.105	1.552	1.556	1.502
5	0.391	1.544	1.552	1.547
5.5	0.65	1.563	1.543	1.537
6	1.079	1.56	1.576	1.546
6.5	1.364	1.553	1.548	1.555
7	1.533	1.54	1.578	1.541
7.5	1.586	1.546	1.569	1.547

FUENTE: Elaboración propia

**GRÁFICO N° 4.1** Curva de crecimiento de la cepa ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli*



**FUENTE:** Elaboración propia

**Leyenda:**

- ATCC
- AISLADA 1
- AISLADA 2
- AISLADA 3

**INTERPRETACIÓN:**

En esta grafica vemos las curvas de crecimiento de la cepa ATCC y de tres cepas aisladas de *Escherichia coli*, a simple vista observamos que las cepas aisladas no presentan fase de latencia o retraso, prácticamente empezando su crecimiento a partir de la fase exponencial, a diferencia de la cepa ATCC de *Escherichia coli* que si presenta una fase de latencia la cual dura aproximadamente 4.5 horas.

#### 4.2.1.2 DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pseudomona aeruginosa*

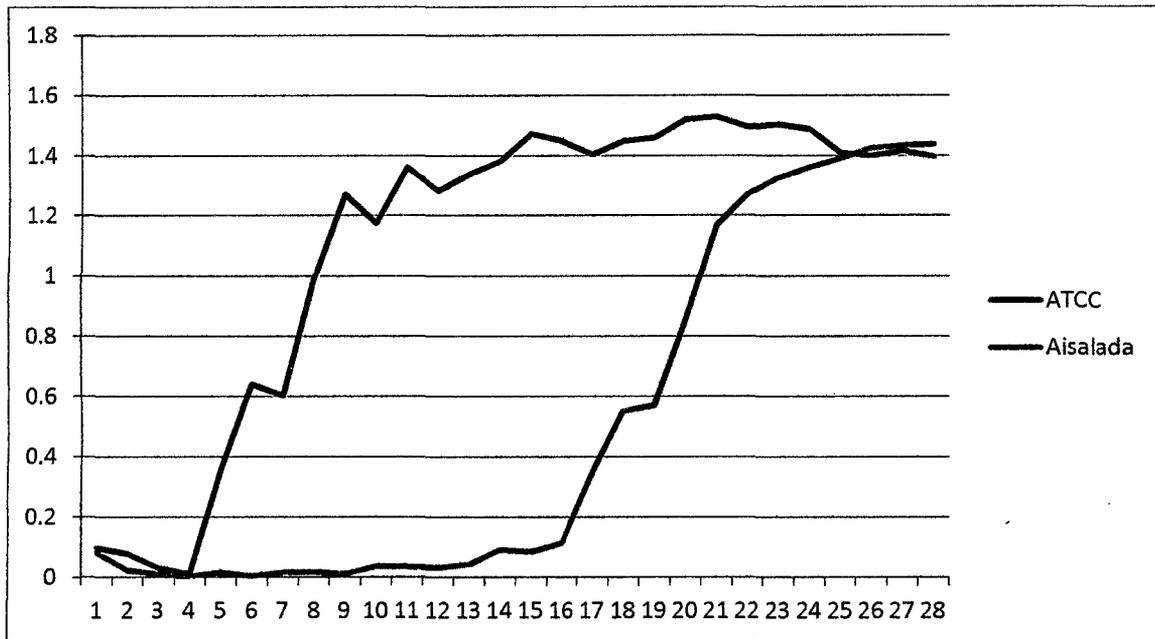
En el siguiente cuadro podemos observar las absorbancias que se obtuvieron cada 30 minutos (0.5 horas) a una longitud de onda de 623 nm de las cepas ATCC y cepas aisladas de *Pseudomona aeruginosa*.

CUADRO N° 4.7 Absorbancias para la curva de crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*

Horas	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	
	ATCC	Aislada
0	0.082	0.098
0.5	0.024	0.079
1	0.012	0.031
1.5	0.005	0.011
2	0.017	0.366
2.5	0.005	0.642
3	0.016	0.603
3.5	0.018	0.992
4	0.011	1.271
4.5	0.037	1.175
5	0.035	1.362
5.5	0.033	1.282
6	0.045	1.339
6.5	0.093	1.382
7	0.085	1.474
7.5	0.115	1.45
8	0.352	1.405
8.5	0.552	1.45
9	0.572	1.46
9.5	0.853	1.52
10	1.167	1.53
10.5	1.271	1.496
11	1.328	1.504
11.5	1.362	1.488
12	1.393	1.41
12.5	1.426	1.402
13	1.433	1.416
13.5	1.439	1.398

FUENTE: Elaboración propia

**GRÁFICO N° 4.2** Curva de crecimiento de la cepa ATCC y de la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa*



**FUENTE:** Elaboración propia

**Leyenda:**

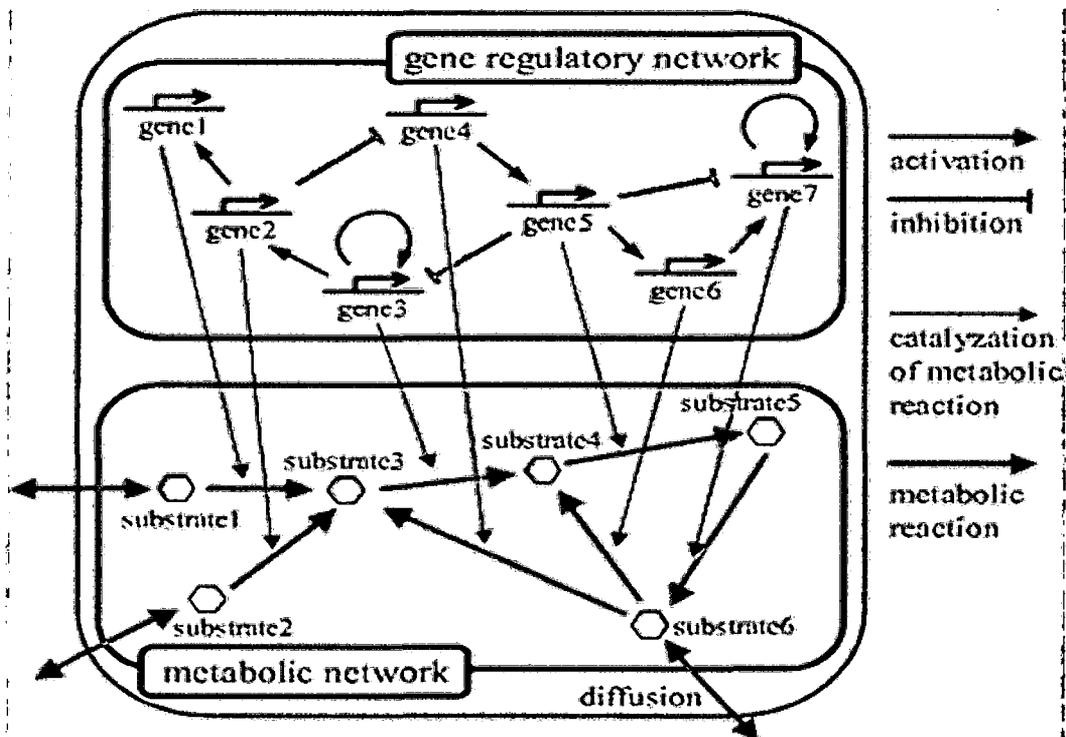
- ATCC
- AISLADA 1

**INTERPRETACIÓN:**

En la grafica vemos que la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* presenta una fase de retraso o latencia que dura aproximadamente 1.5 horas mientras que de la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* dura unas 6 horas, luego de esto ingresan a la fase exponencial donde la cepa aislada presenta una velocidad de crecimiento mayor en comparación con la cepa ATCC.

## DISCUSIÓN:

CHIKARA et al. (44) propone un mecanismo que consiste en una red regulatoria de proteínas y una red de reacciones metabólicas los cuales son necesarios para mantener un estado de equilibrio en la célula bacteriana



En la grafica se observa una forma simplificada de estas redes mencionadas (ya que en un microorganismo estas redes son muy grandes) en la parte superior vemos la red que controla la expresión de los niveles de proteínas donde las flechas rojas muestran la activación de la expresión por parte de los genes y las líneas verdes muestran inhibición de la expresión de un gen sobre el otro, las flechas rojas que señalan a un mismo gen nos indica autorregulación, en la parte inferior tenemos las reacciones metabólicas representadas por flechas azules las cuales están reguladas por las proteínas producidas en la primera red; CHIKARA et al. afirma que las células se adaptan a una variedad de condiciones ambientales cambiando el patrón de expresión génica y la distribución del flujo metabólico, estas respuestas adaptativas son explicadas por mecanismos de señales de transducción donde eventos extracelulares son trasladados a eventos intracelulares a través de moléculas regulatorias, por ejemplo, hablemos del operon lactosa que codifica proteínas envueltas en el metabolismo de lactosa donde la expresión de este operon es

controlado por una proteína regulatoria así que cuando la lactosa está disponible estas proteínas son expresadas en una manera eficiente y coordinada.

**CHIKARA et al** sugiere que una red metabólica está organizada de modo que la tasa de crecimiento bacteriano se encuentra optimizada para funcionar bajo las condiciones dadas, está demostrado que cepas de *Escherichia coli* con una delección de un gen metabólico pueden adaptarse a muchas condiciones ambientales, estas bacterias ajustan su estado intracelular para optimizar la tasa de crecimiento incluso aunque nunca hayan experimentado un cambio de condiciones ambientales.

También podemos hablar de los procesos bioquímicos del crecimiento celular bacteriano, que suponen no menos de 2000 reacciones de gran variedad de tipos, algunas de estas reacciones son transformaciones de la energía otras suponen la biosíntesis de pequeñas moléculas así como los diversos cofactores y coenzimas necesarias para las reacciones enzimáticas, sin embargo las principales reacciones celulares sintéticas consisten en reacciones de polimerización, una vez que se sintetizan los polímeros está dispuesto el escenario para los procesos finales del crecimiento, con esto nos referimos al ensamblaje de las macromoléculas y la formación de las estructuras celulares como la pared celular, membrana citoplasmática, flagelos, ribosomas, cuerpos de inclusión, complejos enzimáticos, etc.

Se han identificado varias proteínas importantes en el proceso de división celular de los procariotas, estas proteínas son esenciales para el proceso de división celular y se han denominado proteínas FTS (filamentous temperatura sensitive), estas proteínas forman en la célula un aparato de división que se llama "divisoma", al parecer este aparato dirige la síntesis de nuevos materiales de membrana y de pared celular hasta que la célula alcanza aproximadamente el doble de su longitud (lo que sucede en la fisión binaria).(45)

Puede ser que las cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* presenten una mutación a nivel de estas proteínas FTS que controlan la división celular, ya que en las graficas podemos ver la diferencia en el crecimiento bacteriano que existe entre las cepas aisladas y cepas ATCC de las bacterias en estudio, esto nos da una idea muy pequeña pero muy importante de cómo las bacterias van cambiando a lo largo del tiempo, esto lo vemos también en el aumento de la resistencia bacteriana que nos indica que las bacterias están desarrollando nuevos mecanismos a nivel bioquímico para evitar la acción de los antibacterianos. Lo que nos hace pensar que también las bacterias

aisladas están desarrollando nuevos mecanismos de supervivencia que les permita probablemente aprovechar los nutrientes del medio en el que se encuentran con mayor rapidez.

En base a esto podemos hablar de una posible modificación a nivel genético por parte de las cepas aisladas teniendo como resultado el aumento en la velocidad de crecimiento, los estudios sobre los mecanismos exactos del porque podría suceder esto aún son muy escasos.

#### 4.2.2 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

##### 4.2.2.1. DE LA PRUEBA PILOTO.

**CUADRO N°4.8: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Psidium guajava* (SAHUINTO) obtenidas en la prueba piloto**

N°	Concentración del extracto en (mg/100uL)	Diámetro del halo de inhibición (mm) de							
		<i>Escherichia coli</i> ATCC				<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC			
		I	II	III	Prom.	I	II	III	Prom.
1	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	6.5	7	6.5	6.67	6.5	6.5	6.5	6.5
4	5	7.5	8.5	8	8	15	16	15.5	15.5
5	10	12	11.5	12	11.83	20	21	21	20.67
6	20	12.5	13	12.5	12.67	22	22	22	22
7	40	12.5	12.5	12.5	12.5	23	24	23	23.3
8	60	13	12.5	12.5	12.67	24	23.5	24	23.83
9	80	13	13	13	13	24	25	24.5	24.5
10	100	13.5	13	13.5	13.3	25	25	25	25
11	120	13.5	13.5	14	13.67	25	25.5	25.5	25.3
12	140	14	13.5	14	13.83	26	25.5	26	25.83
13	160	14	14	13.5	13.83	27	27.5	27	27.17
14	180	14	14	14	14	28	27.5	27.5	27.67
15	200	14.5	15	15	14.83	27.5	27.5	27.5	27.5
16	220	15	14.5	15	14.83	27	27.5	28	27.5

FUENTE: Elaboración propia

#### Leyenda:

- I: Primera medición.
- II: Segunda medición.
- III: Tercera medición.
- Prom: Promedio.

#### INTERPRETACIÓN:

En el cuadro podemos observar las concentraciones mínimas inhibitorias resaltadas en color amarillo y las concentraciones máximas en verde; la inhibición del crecimiento bacteriano se observa a la concentración de 3mg/100uL para ambas cepas ATCC, mientras que las concentraciones máximas fueron de 200mg/100uL y 180mg/100uL para *Escherichia coli* ATCC y *Pseudomona aeruginosa* ATCC respectivamente.

Tomando como base estos datos realizamos la estandarización de las concentraciones para cada una de las cepas.

#### **4.2.2.2. DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ANTIBACTERIANAS**

Para la estandarización se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de incremento} = \sqrt[r]{I}$$

**Dónde:**

**I** = Concentración máxima/Concentración mínima

**r** = N-1

**N** = Número de concentraciones con las que se desee trabajar.

Las concentraciones con las que se trabaja se expresan de la siguiente manera:

1. Concentración mínima = Concentración 1
2. Concentración 1 x Factor de Incremento = Concentración 2
3. Concentración 2 x Factor de Incremento = Concentración 3
4. Concentración 3 x Factor de Incremento = Concentración 4
5. Concentración 4 x Factor de Incremento = Concentración 5
6. Concentración 5 x Factor de Incremento = Concentración 6
7. Concentración 6 x Factor de Incremento = Concentración 7
8. Concentración 7 x Factor de Incremento = Concentración 8
9. Concentración 8 x Factor de Incremento = Concentración 9
10. Concentración 9 x Factor de Incremento = Concentración 10
11. Concentración 10 x Factor de Incremento = Concentración 11
12. Concentración 11 x Factor de Incremento = Concentración 12
13. Concentración 12 x Factor de Incremento = Concentración 13
14. Concentración 13 x Factor de Incremento = Concentración 14

**DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE INCREMENTO PARA EL EXTRACTO SECO  
HIDROALCOHOLICO AL 70% DE *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

**Para *Escherichia coli***

- $I = 200/3 \rightarrow I = 66.67$
  - $N = 14$
  - $r = 14 - 1 \rightarrow r = 13$
- $$F = \sqrt[13]{66.67}$$
- $$F = 1.38$$

**Para *Pseudomona aeruginosa***

- $I = 180/3 \rightarrow I = 60$
  - $N = 14$
  - $r = 14 - 1 \rightarrow r = 13$
- $$F = \sqrt[13]{60}$$
- $$F = 1.37$$

Dónde:

F: Factor de incremento

**INTERPRETACIÓN:**

Como podemos observar al aplicar la fórmula logramos hallar el factor de incremento de dosis del extracto para las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, con estos datos realizaremos la estandarización de las concentraciones como se observa en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.9 Concentraciones estandarizadas para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de las hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO".**

OPERACIÓN	N° DE CONCENTRACIÓN	RESULTADO (mg/100uL)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Concentración mínima	Concentración 1	3	3
Concentración 1 X F	Concentración 2	4.14	4.11
Concentración 2 X F	Concentración 3	6.9	6.85
Concentración 3 X F	Concentración 4	13.8	13.7
Concentración 4 X F	Concentración 5	27.6	27.4
Concentración 5 X F	Concentración 6	55.2	54.8
Concentración 6 X F	Concentración 7	82.2	82.2
Concentración 7 X F	Concentración 8	110.4	109.6
Concentración 8 X F	Concentración 9	138	137
Concentración 9 X F	Concentración 10	165.6	164.4
Concentración 10 X F	Concentración 11	193.2	191.8
Concentración 11 X F	Concentración 12	220.8	219.2
Concentración 12 X F	Concentración 13	248.4	246.6
Concentración 13 X F	Concentración 14	276	274

**FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA DE LOS DATOS EXPERIMENTALES**

**INTERPRETACIÓN:**

Al realizar la estandarización de las concentraciones, observamos que hay diferencia notable en comparación con las concentraciones iniciales.

Las concentraciones obtenidas fueron utilizadas para determinar la sensibilidad antibacteriana tanto en cepas ATCC como en cepas aisladas

#### 4.2.2.3. ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA USANDO LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ESTANDARIZADAS

##### 4.2.2.3.1 DE LA CEPA ATCC Y CEPAS AISLADAS DE *Escherichia coli*:

La medida de los halos de inhibición para la cepa ATCC y cepas aisladas de *Escherichia coli* se realizó por triplicado mostrándose a continuación un promedio de las mediciones.

CUADRO N° 4.10: Halos de inhibición de la cepa ATCC de *Escherichia coli*

Concentración mg/100uL	extracto	Halos de inhibición cepas ATCC (mm)
3		6
4.14		8
6.9		12
13.8		14
27.6		13
55.2		13
82.2		13
110.4		14
138		14
165.6		14
193.2		14
220.8		14
248.4		15
276		15
Amikacina 30ug/100uL		28

FUENTE: Elaboración propia

## DISCUSION:

De acuerdo con el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud (46) los diámetros críticos para enterobacterias usando a la Amikacina como fármaco patrón son los siguientes:

**CUADRO N° 4.11: Halos de inhibición para AMIKACINA**

Amikacina 30ug		
Halos de Inhibición (mm)		
Resistente	Intermedio	Sensible
≤ 14	15-16	≥ 17

**FUENTE:** Elaboración a partir del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud

El halo de inhibición obtenido para la Amikacina (30ug/100uL) fue de 28 mm, de acuerdo a este resultado la cepa ATCC de *Escherichia coli* es sensible al fármaco patrón, de acuerdo al Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, Instituto Nacional de Salud. En cuanto a la actividad antibacteriana del extracto de *Psidium guajava* se obtuvo un mayor halo de inhibición (15 mm) a la concentración de 248.4 mg/100uL, presentando una gran diferencia (de 13mm) en cuanto a la actividad antibacteriana de el fármaco patrón.

CUADRO N° 4.12: Halos de inhibición de las cepas aisladas de *Escherichia coli*

Halos de inhibición Cepas Aisladas (mm)										
Concentración extracto mg/100uL	Cepa de Escherichia coli 1	Cepa de Escherichia coli 2	Cepa de Escherichia coli 3	Cepa de Escherichia coli 4	Cepa de Escherichia coli 5	Cepa de Escherichia coli 6	Cepa de Escherichia coli 7	Cepa de Escherichia coli 8	Cepa de Escherichia coli 9	Cepa de Escherichia coli 10
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.14	9	8	8.6	9	9	8.5	9	8	8.8	9
6.9	12	11	12	11	12.32	11.52	12.44	11.98	12.04	11.68
13.8	12	12	12	11.56	12.44	12.02	12.56	12.12	12.78	12.24
27.6	13	12	12.5	12.48	12.78	13.98	14.04	12.68	13.14	12.76
55.2	14	12	12	13.54	14.02	14.76	13.56	13.76	12.78	13.68
82.2	14	14	13	13.78	14.82	14.46	14.12	14.02	14.68	13.52
110.4	13	13.5	14	14.04	15.34	14.32	15.78	14.76	13.56	14.46
138	13	14	14	14.56	17.56	16.42	16.06	15.56	15.12	14.68
165.6	14	14.5	16	16.58	23.68	18.56	17.98	18.98	18.98	16.54
193.2	28	26	26.5	24.67	27.86	23.48	24.8	24.78	25.66	23.66
220.8	30	27.5	28	28.72	29.64	27.64	28.56	28.76	28.02	27.98
248.4	31	27.5	29	30.76	30.02	28.98	29.04	30.42	29.04	28.78
276	31	28	30	30.78	30.12	29.02	29.89	30.68	29.68	29.92
<b>Amikacina 30ug/100uL</b>	29	27	28	28	29	27	26	29	28	27

FUENTE: Elaboración propia

Este cuadro nos muestra los promedios de los halos de inhibición de las cepas aisladas de *Escherichia coli*.

**CUADRO N° 4.13: Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de los halos de inhibición producidos a diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

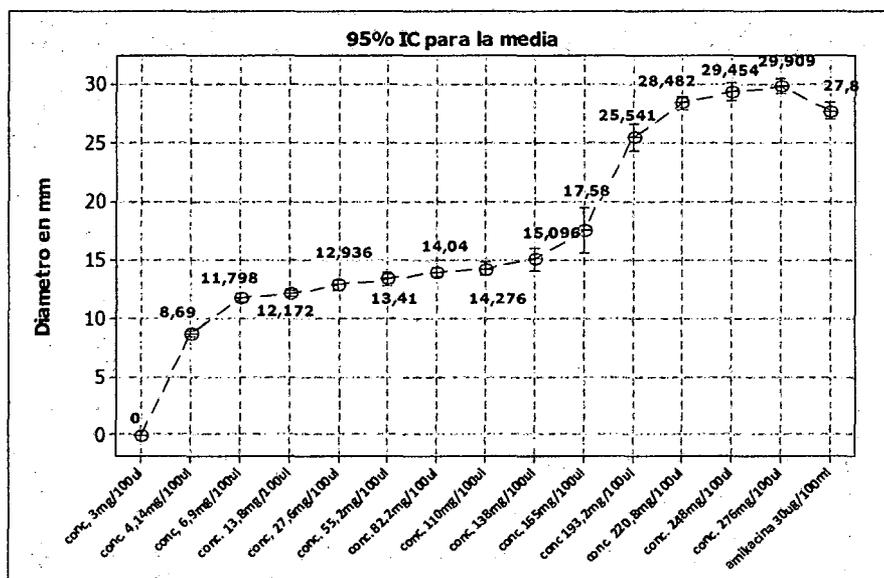
<b>Concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>DESVIACION ESTÁNDAR</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>	<b>INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA MEDIA</b>	
					<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
3 mg/100uL	10	0	0	0	0	0
4,14 mg/100uL	10	8,690	0,406	0,128	8,399	8,981
6,9 mg/100uL	10	11,798	0,496	0,157	11,442	12,153
13,8 mg/100uL	10	12,172	0,347	0,109	11,923	12,420
27,6 mg/100uL	10	12,936	0,645	0,204	12,474	13,397
55,2 mg/100uL	10	13,410	0,891	0,281	12,772	14,047
82,2 mg/100uL	10	14,040	0,539	0,1707	13,653	14,426
110,4 mg/100uL	10	14,276	0,852	0,269	13,666	14,885
138 mg/100uL	10	15,096	1,342	0,424	14,135	16,056
165,6 mg/100uL	10	17,580	2,771	0,876	15,597	19,562
193,2 mg/100uL	10	25,541	1,572	0,497	24,416	26,665
220,8mg/100uL	10	28,482	0,827	0,261	27,890	29,073
248mg/100uL	10	29,454	1,074	0,339	28,685	29,063
276mg/100uL	10	29,909	0,887	0,280	29,274	30,543
<b>Concentración de Amikacina a 30ug/100uL</b>	10	27,800	1,032	0,326	27,0611	28,538

**FUENTE:** Elaboración propia

## DISCUSION:

De acuerdo al cuadro 4.12 podemos observar que el halo de inhibición obtenido usando el fármaco patrón (amikacina 30ug/mL) fue de 27,8 mm, por lo tanto las cepas bacterianas aisladas a partir de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco son sensibles a la Amikacina ya que según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud un halo de inhibición  $\geq 17$  mm nos indica que la especie bacteriana en este caso *Escherichia coli* es sensible a la acción del antibacteriano.

GRAFICO N° 4.3 LIMITE INFERIOR Y LIMITE SUPERIOR DE LOS HALOS DE INHIBICION



FUENTE: Elaboración propia

## INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN:

El presente gráfico muestra el promedio de los halos de inhibición de las cepas aisladas de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* y del antibiótico patrón (Amikacina) y sus respectivos límites superior e inferior con un intervalo de confianza de 95%.

Como se observa en el gráfico, a medida que se incrementa la concentración del extracto, los halos de inhibición también incrementan su diámetro; lo que nos permite observar como aumenta la actividad antibacteriana del extracto, llegando incluso a superar la actividad antibacteriana del fármaco patrón.

Esto nos indica que la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" presenta una actividad antibacteriana mayor al fármaco patrón (Amikacina 30ug/100ul) a las concentraciones de 220,8mg/100uL, 248mg/100uL, 276mg/100uL con halos de inhibición de 28,482; 29,454 y 29,909 mm respectivamente, frente a las cepas aisladas a partir de urocultivos de *Escherichia coli*.

**ANOVA DE UN FACTOR (ANÁLISIS DE LA VARIANZA UNIFACTORIAL) PARA LA COMPARACIÓN DE LA DE LA LONGITUD DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

**CUADRO N° 4.14: Anova Unifactorial**

<b>COMPARACIÓN</b>	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F- FISHER</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	10985,940	14	748,710	639,345	0,000
<b>INTRA GRUPOS</b>	165,694	135	1,227		
<b>TOTAL</b>	11151,634	149			

**FUENTE:** Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

Como podemos observar en el cuadro ANOVA la significación asintótica es 0.000 que es menor que 0.05, lo que muestra que existe diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* y el antibiótico patrón (Amikacina), con respecto a los halos de inhibición que producen cada uno de ellos debido a esto se realizó una prueba post hoc de Scheffé.

**CUADRO N° 4.15: Agrupación en sub conjuntos hecha a partir de la prueba Post-Hoc o Post Test Sheffe**

GRUPOS EN COMPARACION	N	SUB CONJUNTO PARA ALFA = 0,05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
3 mg/100uL	10	0							
4,14 mg/100uL	10		8,69						
6,9 mg/100uL	10			11,798					
13,8 mg/100uL	10			12,172	12,172				
27,6 mg/100uL	10			12,936	12,936	12,93			
55,2 mg/100uL	10			13,41	13,410	13,41			
82,2 mg/100uL	10			14,04	14,040	14,04			
110,4 mg/100uL	10				14,276	14,27			
138 mg/100uL	10					15,096	17,58		
165,6 mg/100uL	10							25,54	
193,2 mg/100uL	10							27,80	27,80
Amikacina30ug/100 uL	10								28,48
220,8mg/100uL	10								29,45
248mg/100uL	10								29,90
276mg/100ul	10								27,80
Sig, asintótica	10	1,000	1,00	0,134	0,223	0,183	1,000	0,125	0,219

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN Y DISCUSION:**

El presente cuadro agrupa las concentraciones que no presentan diferencias estadísticamente significativas en subconjuntos con una significancia asintótica  $\geq 0.05$ , lo que nos indica que existe una actividad antibacteriana similar entre estas concentraciones, siendo importante resaltar que las concentraciones de **193,2 mg/100uL**, **220,8mg/100uL**, **248mg/100uL** y **276mg/100ul** del extracto vegetal que se encuentran

resaltadas en amarillo, estas poseen una actividad antibacteriana similar al fármaco patrón que tiene un halo de inhibición igual a 28.48 mm.

A partir de esto corroboramos que la especie vegetal de *Psidium guajava* "SAHUINTO" presenta actividad antibacteriana similar e incluso superior que el fármaco patrón a las concentraciones ya mencionadas, frente a cepas aisladas de *Escherichia coli* a partir de urocultivos positivos.

**PRUEBA DE TEST DE STUDENT PARA LA COMPARACIÓN DE LOS  
DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PRODUCIDO POR EL EXTRACTO DE  
*Psidium guajava* SOBRE LA CEPA ATCC Y LAS CEPAS AISLADAS A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE *Psidium guajava* Y DEL FÁRMACO  
PATRON**

**CUADRO N° 4.16: Prueba t-test (Test de Student)**

Concentración del Extracto de <i>Psidium guajava</i>	t-test	Grados de libertad	Sig. asintótica	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza para diferencia de medias	
					v.min	v.max
4,14mg/100uL	5,364	9	0,000	0,690	0,399	0,981
6,9mg/100ul	-1,285	9	0,231	-0,202	-0,557	0,1535
13,8mg/100uL	-16,643	9	0,000	-1,828	-2,076	-1,579
27,6mg/100uL	-0,314	9	0,761	-0,0640	-0,525	0,397
55,2mg/100uL	1,455	9	0,180	0,410	-0,227	1,047
82,2mg/100uL	6,091	9	0,000	1,040	0,653	1,426
110,4mg/100uL	1,024	9	0,333	0,276	-0,333	0,885
138mg/100uL	2,581	9	0,030	1,096	-0,135	2,056
165,6mg/100uL	4,085	9	0,003	3,580	1,597	5,562
193,2mg/100uL	23,216	9	0,000	11,541	10,416	12,665
220,8mg/100uL	55,372	9	0,000	14,482	13,890	15,073
248mg/100uL	42,530	9	0,000	14,454	13,685	15,222
276mg/100uL	53,142	9	0,000	14,909	14,274	15,543
Amikacina 30ug/100uL	-0,612	9	0,555	-0,200	-0,938	0,538

FUENTE: Elaboración propia

## INTERPRETACIÓN:

Este cuadro nos presenta una comparación estadística de los halos de inhibición producidos por el extracto seco hidroalcohólico de *Psidium guajava* y del fármaco patrón (Amikacina 30ug/100ul) en las cepas ATCC de *Escherichia coli* y las cepas aisladas de *Escherichia coli* a partir de urocultivos positivos, donde las concentraciones resaltadas en amarillo son aquellas donde se presentó una actividad antibacteriana similar frente a las cepas bacterianas en experimentación por parte del extracto.

Podemos apreciar que la Amikacina presenta una actividad antibacteriana similar frente a ambos tipos de cepas bacterianas (ATCC y Aisladas a partir de urocultivos positivos) de *Escherichia coli*.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Podemos ver que el fármaco patrón presenta buena actividad antibacteriana frente a las cepas ATCC y las cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional del Cusco mostrando incluso una actividad antibacteriana similar como vemos en el siguiente cuadro:

**CUADRO N°17 Comparación entre halos de inhibición producidos por el fármaco patrón Amikacina**

Amikacina 30ug/100uL	
BACTERIA	Halos de inhibición
<i>Escherichia coli</i> ATCC	28 mm
<i>Escherichia coli</i> aislada	28.48mm

FUENTE: Elaboración a partir de los datos experimentales

Según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud, ya que los halos de inhibición son mayores a 17 mm se tiene que las cepas bacterianas son sensibles a la actividad antibacteriana del fármaco patrón, a diferencia del extracto de la especie vegetal *Psidium guajava* que no posee actividad antibacteriana frente a la cepa ATCC de *Escherichia coli*.

En el siguiente cuadro podemos ver las concentraciones del extracto vegetal que tienes actividad antibacteriana similar a la del fármaco patrón:

**CUADRO N°18 Concentraciones de extracto con actividad antibacteriana similar**

<b>Extracto de la especie vegetal <i>Psidium guajava</i></b>	
<b>BACTERIA</b>	<b>Concentraciones con actividad antibacteriana similar con el fármaco patrón</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC	No hay concentraciones
<i>Escherichia coli</i> aislada	Según el cuadro 4.15 se tiene cuatro concentraciones con actividad antibacteriana similar

**FUENTE:** Elaboración a partir de datos experimentales

#### 4.2.2.3.2 DE LA CEPA ATCC Y CEPAS AISLADA DE *Pseudomona aeruginosa*

Este cuadro muestra el promedio de los halos de inhibición de la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa*:

**CUADRO N° 4.19: Halos de inhibición de la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa***

<b>Concentración extracto mg/100uL</b>	<b>Halos de inhibición cepas ATCC (mm)</b>
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
3	6.3
4.11	15.8
6.85	24
13.7	24
27.4	23
54.8	24.5
82.2	25
109.6	25
137	26
164.4	26
191.8	27
219.2	28
246.6	27
274	26
Amikacina 30ug/100uL	26

**FUENTE:** Elaboración propia

**DISCUSION:**

De acuerdo con el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud, los diámetros críticos para *Pseudomonas* usando a la Amikacina como fármaco patrón son los siguientes:

**CUADRO N° 4.20:** Halos de inhibición para AMIKACINA

<b>AMIKACINA 30ug</b>		
<b>Halos de inhibición (mm)</b>		
<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>≤14</b>	<b>15-16</b>	<b>≥17</b>

**FUENTE:** Elaboración a partir del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud.

El halo de inhibición obtenido para la Amikacina (30ug/100uL) fue de 26 mm, de acuerdo a este resultado la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* es sensible al fármaco patrón.

También podemos observar una elevada actividad antibacteriana por parte de las distintas concentraciones del extracto de *Psidium guajava*, teniéndose un halo de inhibición de 28 mm por parte de la concentración de 219.2 mg/100uL, que es superior a la obtenida por parte del fármaco patrón (Amikacina 30ug/100uL) indicándonos que el extracto presenta mayor actividad antibacteriana frente a la cepa de *Pseudomona aeruginosa* ATCC.

CUADRO N° 4.21: Halos de inhibición de la cepa aislada de

*Pseudomona aeruginosa*

Concentración extracto mg/100uL	Halos de inhibición cepas Aisladas (mm)		
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
3	0	0	0
4.11	8	7	8
6.85	11	11	11
13.7	10	11	12
27.4	10	10	10
54.8	11.2	11.8	12
82.2	11.5	11.5	12
109.6	11	10	11
137	11	11	11
164.4	11	11	10
191.8	11	11	11
219.2	11	10	11
246.6	11	11	11
274	11	11	10
<b>Amikacina 30ug/100uL</b>	22	21	23

FUENTE: Elaboración propia

Este cuadro muestra las tres mediciones realizadas del halo de inhibición para la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa*.

**CUADRO N° 4.22: Distribución numérica de las medidas de tendencia central y dispersión de los halos de inhibición producida a diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

Concentraciones	N	PROMEDIO	DESVIACION ESTÁNDAR	ERROR ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA MEDIA	
					LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
3 mg/100uL	10	0	0	0	0	0
4,11 mg/100uL	10	7,666	0,577	0,333	6,232	9,100
6,85 mg/100uL	10	11	0	0	0	0
13,7 mg/100uL	10	11	1	0,577	8,515	13,484
27,4 mg/100uL	10	10	0	0	0	0
54,8 mg/100uL	10	11,666	0,416	0,240	10,632	12,700
82,2 mg/100uL	10	11,666	0,288	0,166	10,949	12,383
109,6 mg/100uL	10	10,666	0,288	0,166	10,949	12,383
137 mg/100uL	10	11	0	0	0	0
164,4 mg/100uL	10	10,66	0,577	0,333	9,232	12,100
191,8 mg/100ul	10	11	0	0	0	0
219,2 mg/100uL	10	10,666	0,577	0,333	9,232	12,100
246,6 mg/100uL	10	11	0	0	0	0
274 mg/100uL	10	10,666	0,577	0,333	9,232	12,109
amikacina 30ug/100uL	10	22	1	0,577	19,515	24,484

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

El cuadro muestra el promedio de los halos de inhibición de la cepas aislada de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* y del antibiótico patrón (Amikacina).

De acuerdo al cuadro vemos que el fármaco patrón presento un halo de inhibición de 22 mm lo cual nos indica que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada a partir de pacientes atendidos en el Hospital Regional del Cusco, es sensible a la actividad antibacteriana de la Amikacina. Respecto al extracto de *Psidium guajava* se presento el mayor halo de inhibición (11.66 mm) a la concentración de 82,2 mg/100uL.

Se deduce rápidamente del cuadro anterior que ninguna de las concentraciones del extracto de *Psidium guajava* "SAHUINTO" presenta una actividad antibacteriana similar a la del fármaco patrón Amikacina.

**ANOVA DE UN FACTOR (ANÁLISIS DE LA VARIANZA UNIFACTORIAL) PARA LA COMPARACIÓN DE LA DE LA LONGITUD DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE *Psidium guajava* "SAHUINTO"**

**CUADRO N° 4.23: Anova Unifactorial**

<b>COMPARACIÓN</b>	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO FISHER F-</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	762,578	14	54,470	208,253	0,000
<b>INTRA GRUPOS</b>	7,847	30	0,262		
<b>TOTAL</b>	770,424	44			

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

Como podemos observar en el cuadro ANOVA la significación asintótica es 0.000 que es mucho menor que 0.05, lo que muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* y el antibiótico patrón (amikacina), con respecto a los halos de inhibición que producen cada uno de ellos debido a esto se realizó una prueba post hoc de scheffé.

CUADRO N° 4.24: Agrupación en sub conjuntos hecha a partir de la prueba Post-Hoc o Post Test Sheffe

GRUPOS COMPARACION	EN	N	SUB CONJUNTO PARA ALFA = 0,05			
			1	2	3	4
3 mg/100uL		10	0,000			
4,11 mg/100uL		10		7,666		
27,4 mg/100uL		10			10,000	
109,6 mg/100uL		10			10,666	
164,4 mg/100uL		10			10,666	
219,2 mg/100uL		10			10,666	
274 mg/100uL		10			10,666	
6,85 mg/100uL					11,000	
13,7 mg/100uL		10			11,000	
137 mg/100uL		10			11,000	
191,8 mg/100uL		10			11,000	
246,6 mg/100uL		10			11,000	
54,8 mg/100uL		10			11,666	
82,2 mg/100uL		10			11,666	
Amikacina 30ug/100uL		10				22,000
Sig, asintótica		10	1,000	1,000	,368	1,000

FUENTE: Elaboración propia

#### INTERPRETACIÓN:

El presente cuadro agrupa las concentraciones que no presentan diferencias estadísticamente significativas en subconjuntos con una significancia asintótica  $\geq 0.05$ , lo que nos indica que existe una actividad antibacteriana similar entre estas concentraciones.

Podemos observar que las concentraciones resaltadas en amarillo no presentan diferencias en cuanto a la actividad antibacteriana, pero esta es relativamente baja en comparación con la actividad antibacteriana que muestra el fármaco patrón Amikacina, corroborándose así que no existe ninguna concentración del extracto que presente una actividad antibacteriana similar al fármaco patrón.

**PRUEBA DE TEST DE STUDENT PARA LA COMPARACIÓN DE LOS DIÁMETROS DE  
LOS HALOS DE INHIBICIÓN PRODUCIDO POR EL EXTRACTO DE *Psidium guajava*  
SOBRE LA CEPA ATCC Y LAS CEPAS AISLADAS A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DE *Psidium guajava* Y DEL FÁRMACO  
PATRON**

**CUADRO N°4.25: Prueba T-Test (Test de Student)**

Concentración del Extracto de <i>Psidium guajava</i>	t-test	Grados de libertad	Sig. asintótica	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza para diferencia de medias	
					v.min	v.max
4,11mg/100uL	-24,40	2	0,002	-8,133	-9,567	-6,699
13,7mg/100uL	-22,517	2	0,002	-13,00	-15,484	-10,515
54,8mg/100uL	-53,39	2	0,000	-12,833	-13,867	-11,799
82,2mg/100uL	-80,0	2	0,000	-13,333	-14,050	-12,616
109,6mg/100uL	-43,00	2	0,001	-14,333	-14,767	-12,899
164mg/100ul	-46,00	2	0,000	-15,333	-16,767	-13,899
219,2mg/100ul	-52,00	2	0,000	-17,333	-18,767	-15,899
274ml/100ul	-46,00	2	0,000	-15,33	-16,767	-13,899
30ug/100ul	-6,00	2	0,020	-4,000	-6,4,94	-1,515

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

El presente cuadro nos muestra que existe diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición producidos por el extracto de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO" sobre la cepa ATCC y la cepa aislada de *Pseudomonas aeruginosa*, esto es algo que se observa a simple vista al observar los cuadros numero 4.30 y 4.32, y ver que los halos de inhibición más elevados se produjeron al emplear el extracto de *Psidium guajava* en la cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*.

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:**

De acuerdo a estos resultados tenemos que el extracto de *Psidium guajava* presenta una actividad antibacteriana mayor frente a la cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con la cepa aislada.

Los halos de inhibición producidos al usar el fármaco patrón (Amikacina 30ug/100uL) en la cepa ATCC y la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* a pesar de presentar diferencias estadísticamente significativas nos muestran que la Amikacina tiene actividad antibacteriana frente a ambas cepas como vemos en el siguiente cuadro:

**CUADRO N°26: Comparación entre halos de inhibición producidos por el fármaco patrón Amikacina**

<b>Amikacina 30ug/100uL</b>	
<b>BACTERIA</b>	<b>Halos de inhibición</b>
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC	26 mm
<i>Pseudomona aeruginosa</i> aislada	22mm

**FUENTE:** Elaborado a partir de los datos experimentales

Como mostramos anteriormente según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud si los halos de inhibición son mayores o iguales a 17 mm la cepa es sensible a la actividad antibacteriana del fármaco patrón pero vemos que hay una diferencia de 4 mm entre la cepa aislada y la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* lo que nos indica que la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* no es tan sensible frente al fármaco patrón como lo es la cepa ATCC de dicha bacteria.

En este cuadro se muestra las concentraciones que presentan actividad antibacteriana similar con el fármaco patrón:

**CUADRO N°27 Concentraciones de extracto con actividad antibacteriana similar**

<b>Extracto de la especie vegetal <i>Psidium guajava</i></b>	
<b>BACTERIA</b>	<b>Concentraciones con actividad antibacteriana similar con el fármaco patrón</b>
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC	Según el cuadro 4.24 se tiene 12 concentraciones que presentan actividad antibacteriana similar.
<i>Pseudomona aeruginosa</i> aislada	No hay concentraciones.

**FUENTE:** Elaborado a partir de los datos experimentales

Vemos que solo en las pruebas que se realizaron con la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo 12 concentraciones con actividad antibacteriana similar a la del fármaco patrón.

#### **DISCUSION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:**

**METWALLY AM et al. (3)** ha demostrado la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Psidium guajava* empleando distintos extractos obtenidos con diferentes concentraciones de etanol (16, 50 y 96%) e incluso aisló flavonoides donde la Quercetina a una concentración de 3mg/ml demostró tener actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*; también menciona que los flavonoides son los compuestos más abundantes en las hojas de *Psidium guajava* L.

**P. GHOSH et al (47)** aisló por primera vez dos terpenoides (el ácido Betulinico y el Lupeol) a partir de hojas de *Psidium guajava* L., determinando su actividad antibacteriana, demostrando que el Lupeol presenta mayor actividad contra cepas bacterianas gram negativas entre estas *Escherichia coli* con una concentración mínima inhibitoria de 200 ug/ml.

**BUVANESWARI et al. (48)** determinaron la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava* L. por el método de difusión en discos antimicrobianos, empleando un extracto acuoso y otro metanólico (a una concentración de 70%) teniéndose como mayores halos de inhibición 10mm y 15 mm respectivamente, esto a una concentración de 50 uL de extracto/disco para la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC, estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestra investigación, donde el halo de inhibición mayor para *Escherichia coli* ATCC fue de 15 mm para una concentración de 276 mg/100uL, debemos resaltar que nosotros realizamos la determinación de la actividad antibacteriana por el método de pozos excavados lo cual no le quita validez a nuestra investigación ya que según **JHON J. ROJAS et al.(49)** que evaluó el método de pozos en agar y el método de Kirby Bauer (usando discos de sensibilidad) usando la especie vegetal *Spilantes americana*, frente a distintas cepas bacterianas ATCC como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus b-hemolitico* y *Saccharomyces cereviciae*, llegando a la conclusión de que el método de pozos en agar es más sensible que el método de Kirby Bauer, recomendando emplear el método de pozos en agar para determinar la actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales.

**BUVANESWARI et al.** También trabajaron con *Pseudomona aeruginosa* ATCC, donde obtuvieron halos de inhibición de 10 mm y 14 mm para su extracto acuoso y metanólico respectivamente a una concentración de 50 uL de extracto/disco, a diferencia de nuestra investigación donde *Psidium guajava* presenta una actividad antibacteriana elevada incluso superando al fármaco patrón como ya mencionamos anteriormente, esto puede deberse a que en la investigación de **BUVANESWARI et al.** su extracto acuoso carece de Taninos y su extracto metanólico carece de Flavonoides (compuestos que de acuerdo a otras investigaciones se comprobó que son importantes en la actividad antibacteriana de muchas especies vegetales) mientras que nuestro extracto seco hidroalcohólico presenta ambos compuestos como podemos ver en el análisis fitoquímico; probablemente estos metabolitos secundarios tengan una acción sinérgica lo cual respondería al porque nuestro extracto presenta una actividad antibacteriana elevada contra *Pseudomona aeruginosa* ATCC.

### 4.3 DE LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD SUB-AGUDA

#### 4.3.1 DEL PESO DE LAS RATAS

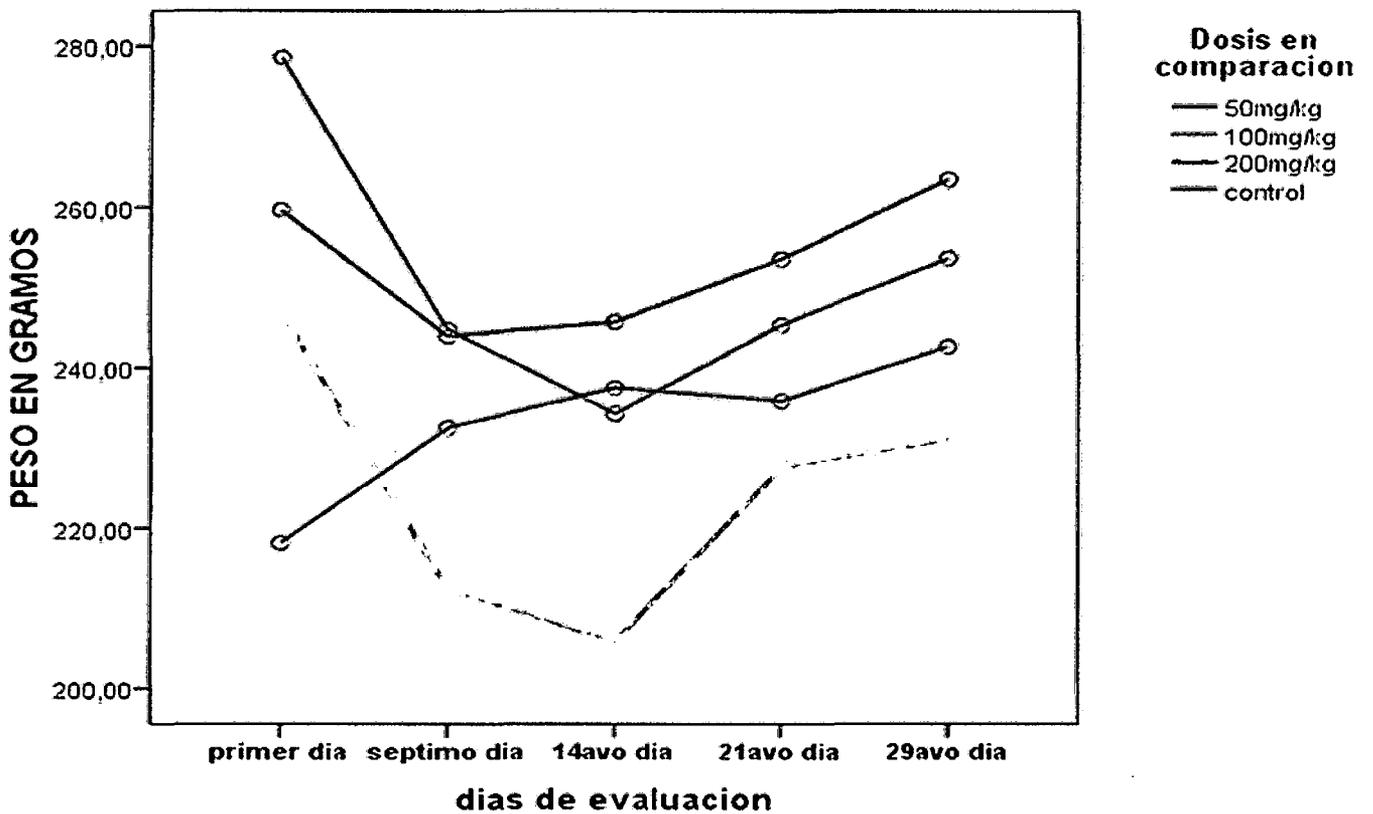
En el siguiente cuadro tenemos los pesos de las ratas que fueron tomados cada 7 días a partir del primer día de administración del extracto:

**CUADRO N° 4.28: Recolección de peso de las ratas para el estudio de la toxicidad Subaguda**

		1er día	7mo día	14avo día	21avo día	29avo día
Grupo	Rata	peso rata	Peso Rata	peso rata	Peso Rata	Peso Rata
G1 50mg/Kg	N	282.67	261.62	263.9	282.17	283.56
	O	287.31	264.75	256.3	226.48	223.65
	C	274.15	222.08	204.08	<b>(fallecido)</b>	<b>(fallecido)</b>
	P	275.13	244.47	225.8	244.8	259.65
	L	274.06	231.5	221.8	228.24	248.02
G2 100mg/Kg	N	257.78	225.3	210.38	221.6	<b>(fallecido)</b>
	O	257.8	240.8	250.07	252.95	248.81
	C	262.28	240.87	248.28	255.15	255.88
	P	265.13	269.25	274.46	284.73	285.95
	L	255.5	<b>(fallecido)</b>	<b>(fallecido)</b>	<b>(fallecido)</b>	<b>(fallecido)</b>
G3 200mg/Kg	N	246.62	192.08	209.35	225.6	239.17
	O	249.85	243.94	237.89	224.9	<b>(fallecido)</b>
	C	242.62	173.4	134.18	<b>(fallecido)</b>	<b>(fallecido)</b>
	P	245.5	228.94	225.04	228.35	219.25
	L	251.46	223.9	222.63	231.77	234.95
Control	N	211.43	234.05	237.52	236.5	248.58
	O	224.18	227.65	232.42	228.9	231.15
	C	213	232.06	238.18	238.6	247.78
	P	228.3	240.04	244.99	237.9	243.72
	L	213.9	229.34	234.8	237.84	242.4

FUENTE: Elaboración propia

GRAFICO N° 4.4 PESOS DE LAS RATAS EN EL TRANCURSO DE LA EXPERIMENTACION



FUENTE: Elaboración propia

#### INTERPRETACIÓN:

La grafica nos muestra que se produjo una pérdida de peso en los 3 grupos tratados con el extracto de *Psidium guajava L.*, mientras que el grupo control (que recibió agua destilada en vez de extracto de *Psidium guajava L.*) presento un aumento de peso durante todo el periodo de experimentación.

#### ANÁLISIS:

El grupo G1 (50mg/Kg) presentó una pérdida de peso del 15.9% respecto al peso inicial, esto sucedió hasta el día 14; a partir de este día los animales de experimentación empezaron a ganar peso hasta el último día de administración del extracto.

El grupo G2 (100mg/Kg) presentó una pérdida de peso del 6.03% respecto al peso inicial, esto sucedió hasta el día 7; a partir de este día los animales de experimentación empezaron a ganar peso lentamente hasta el último día de administración del extracto.

El grupo G3 (200mg/Kg) presentó una pérdida de peso del 16.75% respecto al peso inicial, esto sucedió hasta el día 14; a partir de este día los animales de experimentación empezaron a ganar peso hasta el último día de administración del extracto.

El grupo Control presentó un incremento de peso del 11.25% respecto al peso inicial, este incremento de peso se dio hasta el último día de administración del extracto.

#### ANOVA FACTORIAL (ANÁLISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL) PARA LA COMPARACIÓN DEL PESO DE LAS RATAS SOMETIDAS A DISTINTAS DOSIS DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO DE *Psidium guajava* "Sahuinto" Y GRUPO CONTROL.

CUADRO N°4.29: CUADRO ANOVA PARA COMPARACION DE PESOS

	GRADOS DE LIBERTAD	SUMATORIA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
COMPARACIÓN DE GRUPOS	3	12348,19	4116,065	11,543	0,000
DÍAS DE MEDICION	5	5594,915	1398,72	3,923	0,006
ERROR	57	0,655		-	.

FUENTE: Elaboración propia

#### INTERPRETACIÓN:

El cuadro nos muestra que existe diferencia estadísticamente significativa tanto para los grupos en comparación como para los días de medición ya que la significación asintótica

para ambos es menor a 0.05, esto nos indica que existe diferencia entre el promedio de los pesos en total entre los 4 grupos de experimentación así como también diferencia entre los promedios de los pesos que fueron tomados en cada uno de los días de medición , esto nos lleva a realizar una prueba Post-Hoc, para determinar exactamente donde se encuentra esta diferencia.

**PRUEBA POST-HOC O POST TEST SCHEFFE PARA LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DEL PESO DE LAS RATAS DE ACUERDO A LOS DISTINTOS DÍAS DE EVALUACION**

**CUADRO N°4.30: Prueba Post-Hoc o Post Test Scheffe**

GRUPOS COMPARACION EN		DIFERENCIA DE MEDIAS	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
PRIMER DÍA	SÉPTIMO DÍA	17,9840	,077	-1,1561	37,1241
	DÉCIMO CUARTO DÍA	20,8246	,025	1,6844	39,9647
	VIGÉSIMO PRIMER DÍA	10,5523	,583	-9,1567	30,2614
	VIGÉSIMO NOVENO DÍA	3,4322	,991	-16,9747	23,8391
SÉPTIMO DÍA	DÉCIMO CUARTO DÍA	2,8405	,994	-16,5434	22,2245
	VIGÉSIMO PRIMER DÍA	-7,4317	,845	-27,3776	12,5142
	VIGÉSIMO NOVENO DÍA	-14,5519	,300	-35,1876	6,0839
DÉCIMO CUARTO DÍA	VIGÉSIMO PRIMER DÍA	-10,2722	,619	-30,2181	,619
	VIGÉSIMO NOVENO DÍA	-17,3924	,143	-38,0282	,143
VIGÉSIMO PRIMER DÍA	VIGÉSIMO NOVENO DÍA	7,1202	,888	-14,0444	28,2847

FUENTE: Elaboración propia

## INTERPRETACION:

La prueba Post-Hoc compara un día con otro mostrándonos, por ejemplo, si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los pesos tomados el primer día y los pesos tomados el decimo cuarto día, que en este caso se encuentra resaltado en amarillo y nos dice que existe una diferencia de peso estadísticamente significativa entre estos días, ya que como se dijo anteriormente, fue hasta el decimo cuarto día donde se produjo una gran pérdida de peso por parte de dos grupos de experimentación ( grupos G1 y G2).

### 4.3.2 DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

#### 4.3.2.1 DETERMINACIÓN DEL HEMATOCRITO

CUADRO N° 4.31: Resultados de Hematocrito

GRUPO/DOSIS EXTRACTO	RATA	HEMATOCRITO (%)
G1 (50mg/Kg)	N	53
	O	48
	C	(fallecido)
	P	52
	L	48
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	52.94
	C	45
	P	51
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	55
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	47
	L	48
Control	N	49
	O	50.77
	C	51.56
	P	50.87
	L	49

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N°4.32: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de hematocrito de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	,826	3	,275	,031	<u>,992</u>
<b>INTRA GRUPOS</b>	98,514	11	8,956		

**FUENTE:** Elaboración propia

**INTERPRETACION:** Este cuadro nos indica si es que existe alguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de experimentación (grupos G1, G2, G3 Y Control) en cuanto a los valores de hematocrito obtenidos, al ser la significación asintótica mayor a 0.05 tenemos que los valores de hematocrito son similares entre ellos.

Entonces podemos afirmar que no existe variación entre los grupos tratados con el extracto y el grupo control en cuanto a los valores de hematocrito.

**DISCUSIÓN:**

Según **LEÓN GOÑI et al. (50)** los valores de referencia de hematocrito se encuentran entre 33.9 – 48.5%, mientras que los datos obtenidos en los animales de experimentación son ligeramente más elevados en comparación a los valores de referencia; esto se puede deber al cambio de altura al que fueron sometidas las ratas ya que estas fueron traídas del Instituto Nacional de Salud – Lima.

#### 4.3.2.2 DE LA DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA

Para determinar la hemoglobina se utilizó un kit reactivo, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**CUADRO N°4.33: Resultados de Hemoglobina**

GRUPO/DOSIS EXTRACTO	RATA	HEMOGLOBINA (g/dL)
G1 (50mg/Kg)	N	13.75
	O	14.14
	C	(fallecido)
	P	14.5
	L	13.98
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	12.14
	C	11.99
	P	11.85
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	14.28
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	15.5
	L	12.5
Control	N	13.71
	O	13.56
	C	14.89
	P	14.89
	L	13.43

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.34: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de hemoglobina de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	SUMATORIA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
ENTRE GRUPOS	10,592	3	3,531	5,522	,015
INTRA GRUPOS	7,033	11	,639		

FUENTE: Elaboración propia

### INTERPRETACIÓN:

Este cuadro nos indica si es que existe alguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de experimentación (grupos G1, G2, G3 Y Control) en cuanto a los valores de hemoglobina obtenidos, en este caso la significancia asintótica es menor a 0.05 habiendo entre los grupos diferencia estadísticamente significativa, para ver donde se encuentra esa diferencia se realiza la prueba Post-Hoc.

**CUADRO N° 4.35: Prueba Post-Hoc o Post Test Scheffe para la comparación múltiple de la hemoglobina de las ratas de acuerdo a las distintas concentraciones del extracto y grupo control**

GRUPOS COMPARACION	EN	DIFERENCIA DE MEDIAS	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
50 mg/kg	100 mg/kg	2,09917	,039	,0956	4,1027
	200 mg/kg	-,00083	1,000	-2,0044	2,0027
	control	-,00350	1,000	-1,7632	1,7562
100 mg/kg	200 mg/kg	-2,10000	,055	-4,2419	,0419
	control	-2,10267*	,030	-4,0184	-,1869
200 mg/kg	control	-,00267	1,000	-1,9184	1,9131

FUENTE: Elaboración propia

### INTERPRETACIÓN:

Como podemos observar en el cuadro existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de 50 y 100 mg/kg y entre los grupos de 100mg/Kg y control.

### DISCUSIÓN:

A pesar de que existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto a los resultados de hemoglobina, estos se encuentran entre los valores de referencia según LEÓN GOÑI et al. que van de 12.31 – 15.18 gr/dL.

#### 4.3.2.3 DE LA DETERMINACIÓN DEL RECUENTO DE GLOBULOS ROJOS

El recuento de glóbulos rojos se realizó en una cámara de Neubauer, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

CUADRO N° 4.36: Resultados del Recuento de Glóbulos Rojos

GRUPO/DOSIS EXTRACTO	RATA	RECUENTO DE GLOBULOS ROJOS X 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> de sangre
G1 (50mg/Kg)	N	9.4
	O	8.6
	C	(fallecido)
	P	9.1
	L	8.7
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	8.9
	C	7.5
	P	8.9
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	9.5
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	8.5
	L	8.9
Control	N	8.9
	O	9.1
	C	9.1
	P	9
	L	8.4

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.37: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación del recuento de glóbulos rojos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	,610	3	,203	,873	,485
<b>INTRA GRUPOS</b>	2,563	11	,233		

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

La significación asintótica es mayor a 0.05 lo que nos dice que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto al recuento de glóbulos rojos.

**DISCUSIÓN:**

Según LEÓN GOÑI et al. los valores de referencia del conteo de glóbulos rojos se encuentran entre  $6.07 - 7.74 \times 10^6$  glóbulos rojos por milímetro cúbico de sangre a diferencia de los resultados que obtuvimos que son mayores a los valores referencia, esto se puede deber al cambio de altura, comprobando así los resultados obtenidos al realizar la prueba de hematocrito.

#### 4.3.2.4 DE LA DETERMINACIÓN DEL RECuento DE GLOBULOS BLANCOS

El recuento de glóbulos blancos se realizó en una cámara de Neubauer, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**CUADRO N° 4.38: Resultados del Recuento de Glóbulos Blancos**

GRUPO	RATA	RECuento DE GLOBULOS BLANCOS/mm <sup>3</sup>
G1 (50mg/Kg)	N	7200
	O	7800
	C	(fallecido)
	P	6400
	L	7500
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	8400
	C	8400
	P	7800
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	6600
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	7000
	L	6800
Control	N	7600
	O	7400
	C	8800
	P	7000
	L	7600

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.39: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación del recuento de glóbulos blancos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	SUMATORIA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
<b>ENTRE GRUPOS</b>	3401833,333	3	1133944,444	3,879	[,05]
<b>INTRA GRUPOS</b>	3215500,000	11	292318,182		

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

### **INTERPRETACIÓN:**

La significación asintótica es mayor a 0.05 lo que nos dice que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto al conteo de glóbulos blancos.

### **DISCUSION:**

Según **LEÓN GOÑI et al.** los valores de referencia del recuento de glóbulos blancos se encuentran entre 5040 – 12 360 glóbulos blancos por mililitro de sangre. Los resultados obtenidos a partir de los grupos de experimentación se encuentran entre los valores de referencia.

4.3.2.5 DE LA DETERMINACIÓN DEL RECuento DIFERENCIAL DE GLÓBULOS BLANCOS

CUADRO N° 4.40: resultados del recuento diferencial de glóbulos blancos

GRUPO	RATA	RECuento DIFERENCIAL DE GLOBULOS BLANCOS				
		NEUTROFILOS (%)	BASOFILOS (%)	LINFOCITOS (%)	MONOCITOS (%)	EOSINOFILOS (%)
G1 (50mg/Kg)	N	10	0	68	0.5	1
	O	11	0	67	1	1
	C	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)
	P	13	0	65	0.5	1
	L	18	0	70	0.5	1
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)
	O	14	0	75	0	1
	C	16	1	71	0	2
	P	19	0	69	1	1
	L	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	18	0	71	0	1
	O	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)
	C	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)	(fallecido)
	P	19	0	68	0.5	1
	L	12	0	66	1	1
Control	N	10	0	69	0	1
	O	10	0	68	0.5	1
	C	13	0	65	0	2
	P	10	0	79	0.5	1
	L	11	0	78	0	1

FUENTE: Elaboración propia

Para el análisis estadístico se utilizaron solo los resultados de neutrófilos y linfocitos debido a que los demás parámetros presentan valores estadísticamente no significativos.

**CUADRO N° 4.41: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de Neutrófilos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	47,800	3	15,933	1,012	<u>0,424</u>
<b>INTRA GRUPOS</b>	173,133	11	15,739		

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACION:**

La significación asintótica es mayor a 0.05 así que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto al conteo de neutrófilos.

**CUADRO N° 4.42: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de los linfocitos de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	57,800	3	19,267	1,043	<u>0,412</u>
<b>INTRA GRUPOS</b>	203,133	11	18,467		

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

La significación asintótica es mayor a 0.05 así que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto al conteo de linfocitos.

**DISCUSIÓN:**

Todos los resultados del recuento diferencial de glóbulos blancos se encuentran en los valores referenciales según **LEÓN GOÑI et al.**

### 4.3.3 DE LA DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS HEPÁTICOS

#### 4.3.3.1 DE LA DETERMINACIÓN DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALACETICA

La recolección de datos se muestra en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.43: Resultados de Transaminasa Glutámico Oxalacetica**

GRUPO	RATA	TGO (UI/L)
G1 (50mg/Kg)	N	50.02
	O	49.88
	C	(fallecido)
	P	46
	L	50
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	46
	C	49.29
	P	50.12
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	50.14
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	50.2
	L	49.34
Control	N	50.16
	O	50.1
	C	46
	P	49.36
	L	46

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.44: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la transaminasa glutámico oxalacetica (TGO) de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	SUMATORIA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
ENTRE GRUPOS	5,143	3	1,714	,469	,710
INTRA GRUPOS	40,169	11	3,652		

FUENTE: Elaboración propia

## INTERPRETACIÓN:

La significación asintótica es mayor a 0.05 así que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto a la Transaminasa Glutámico Oxalacetica.

## DISCUSIÓN:

Según **LEÓN GOÑI et al.** los valores de referencia de Transaminasa Glutámico Oxalacetica se encuentran entre, 42.9 – 270.8 UI/L

Los resultados obtenidos a partir de los animales de experimentación se encuentran entre este rango.

### 4.3.3.2 DE LA DETERMINACION DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA

Los resultados de la medición se muestran en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.45: RESULTADOS DE TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA**

GRUPO	RATA	TGP (UI/L)
G1 (50mg/Kg)	N	27,46
	O	25,85
	C	(fallecido)
	P	30,78
	L	28,66
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	30,35
	C	27,85
	P	27,06
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	30,27
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	31,20
	L	31,35
Control	N	26,41
	O	29,17
	C	25,10
	P	27,14
	L	26,91

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.46: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	30,094	3	10,031	3,913	,040
<b>INTRA GRUPOS</b>	28,202	11	2,564		

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

La significación asintótica es menor a 0.05 así que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto a la Transaminasa Glutámico Pirúvica, ahora para determinar entre que grupos se encuentran las diferencias se realizo la prueba Post-Hoc.

**CUADRO N° 4.47: Prueba Post-Hoc o Post Test de Scheffé para la comparación múltiple de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) de las ratas de acuerdo a las distintas concentraciones del extracto y grupo control**

<b>GRUPOS COMPARACION</b>	<b>EN</b>	<b>DIFERENCIA DE MEDIAS</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>	<b>INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS</b>	
				<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
<b>50 mg/kg</b>	<b>100 mg/kg</b>	-,23250	,998	-4,2444	3,7794
	<b>200 mg/kg</b>	-2,75250	,227	-6,7644	1,2594
	<b>control</b>	1,24150	,725	-2,2822	4,7652
<b>100 mg/kg</b>	<b>200 mg/kg</b>	-2,52000	,342	-6,8089	1,7689
	<b>control</b>	1,47400	,671	-2,3621	5,3101
<b>200 mg/kg</b>	<b>control</b>	3,99400*	,041	,1579	7,8301

FUENTE: Elaboración propia

### INTERPRETACIÓN:

Vemos que la diferencia se encuentra en el grupo que recibió el extracto a una dosis de 200mg/Kg, donde los valores de Transaminasa Glutámico Pirúvica, se encuentran ligeramente elevados en comparación con los otros grupos.

### DISCUSION:

Los valores de referencia según LEÓN GOÑI et al. se encuentran entre 26.3 –68.5 UI/L, así que a pesar que existe diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de que recibió 200mg/Kg de extracto y el grupo control los valores de transaminasa glutámico pirúvica se encuentran entre los valores de referencia.

#### 4.3.3.3 DE LA DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASA ALCALINA.

Los datos obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.48: Resultados de Fosfatasa Alcalina**

GRUPO	RATA	FOSFATASA ALCALINA (UI/L)
G1 (50mg/Kg)	N	157.3
	O	155.43
	C	(fallecido)
	P	159.58
	L	162.24
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	163.78
	C	155.88
	P	160.56
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	156.78
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	158.66
	L	158.42
Control	N	155.6
	O	162.7
	C	158.42
	P	158.98
	L	155.24

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.49: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la fosfatasa alcalina de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRÁTICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	9,331	3	3,110	,397	,758
<b>INTRA GRUPOS</b>	86,195	11	7,836		

**FUENTE:** Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

La significación asintótica es mayor a 0.05 así que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto a la Fosfatasa Alcalina.

**DISCUSION:**

Los valores de Fosfatasa Alcalina obtenidos se encuentran entre los valores de referencia según LEÓN GOÑI et al. que se encuentran entre 150.5 – 421.3 UI/L

#### 4.3.4 DE LA DETERMINACION DE LOS PARAMETROS RENALES.

##### 4.3.4.1 DETERMINACIÓN DE LA CREATININA

Los datos obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

**CUADRO N° 4.50: Resultados de Creatinina**

GRUPO	RATA	CREATININA (mg/L)
G1 (50mg/Kg)	N	5.14
	O	5.23
	C	(fallecido)
	P	4.57
	L	6.57
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	5.85
	C	4.85
	P	5.12
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	5.28
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	4.28
	L	4.98
Control	N	5
	O	4.28
	C	4.85
	P	5.2
	L	5.48

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.51: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de la creatinina de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	SUMATORIA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRÁTICA	ESTADÍSTICO F	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)
ENTRE GRUPOS	,684	3	,228	,624	,614
INTRA GRUPOS	4,018	11	,365		

FUENTE: Elaboración propia

### INTERPRETACIÓN:

La significación asintótica es mayor a 0.05, esto nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación respecto a la Creatinina.

### DISCUSIÓN:

Según LEÓN GOÑI et al. los valores de referencia de creatinina se encuentran en el rango de 3.2 – 7.1 mg/L.

#### 4.3.4.2 DETERMINACIÓN DE UREA

Los datos obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

CUADRO N° 4.52: Resultados de Urea

GRUPO	RATA	UREA (g/dL)
G1 (50mg/Kg)	N	51,7
	O	51,3
	C	(fallecido)
	P	50
	L	53,5
G2 (100mg/Kg)	N	(fallecido)
	O	54,1
	C	51,6
	P	54,7
	L	(fallecido)
G3 (200mg/Kg)	N	63,2
	O	(fallecido)
	C	(fallecido)
	P	64,8
	L	64,2
Control	N	53,2
	O	52,7
	C	57,9
	P	51,1
	L	52

FUENTE: Elaboración propia

**CUADRO N° 4.53: Anova de un factor (análisis de la varianza unifactorial) para la comparación de urea de las ratas sometidas a distintas dosis por kilogramo de peso y grupo control**

	<b>SUMATORIA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA CUADRATICA</b>	<b>ESTADÍSTICO F</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>
<b>ENTRE GRUPOS</b>	312,284	3	104,095	27,922	,000
<b>INTRA GRUPOS</b>	41,009	11	3,728		

FUENTE: Elaboración propia

**INTERPRETACIÓN:**

El cuadro anterior nos indica que si existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados de urea entre los grupos de experimentación, debido a que la significación asintótica es menor a 0.05, esto nos lleva a hacer una prueba post-hoc para determinar entre que grupos se encuentra esa diferencia.

**CUADRO N° 4.54: Prueba Post-Hoc o Post Test de Scheffé para la comparación múltiple de Urea de las ratas de acuerdo a las distintas concentraciones del extracto y grupo control**

<b>GRUPOS COMPARACION EN</b>	<b>DIFERENCIA DE MEDIAS</b>	<b>SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (P)</b>	<b>INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% PARA LA DIFERENCIA DE MEDIAS</b>	
			<b>LIMITE INFERIOR</b>	<b>LIMITE SUPERIOR</b>
	100 mg/kg	-1,84167	,677	-6,6795 2,9962
<b>50 mg/kg</b>	200 mg/kg	-12,44167*	,000	-17,2795 -7,6038
	control	-1,75500	,621	-6,0041 2,4941
<b>100 mg/kg</b>	200 mg/kg	-10,60000*	,000	-15,7719 -5,4281
	control	,08667	1,000	-4,5392 4,7125
<b>200 mg/kg</b>	control	10,68667*	,000	6,0608 15,3125

FUENTE: Elaboración propia

### **INTERPRETACION:**

De acuerdo al test POST-HOC tenemos que la diferencia se encuentra en el grupo de experimentación que recibió 200mg/Kg de extracto seco hidroalcohólico, vemos que la concentración de urea esta ligeramente elevada en comparación con los otros grupos.

### **DISCUSION:**

Según **LEÓN GOÑI et al.** los valores de referencia de Urea se encuentran en el rango de 38 – 63,3 mg/L, a pesar que existe una diferencia estadísticamente significativa en los valores de urea por parte del grupo que recibió el extracto a una dosis 200mg/Kg, vemos que estos valores son ligeramente elevados en comparación con los valores de referencia.

### 4.3.5 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS DE LAS RATAS

**CUADRO 4.55: RESULTADOS DEL ANALISIS HISTOPATOLOGICO**

DOSIS	RATA	CORTES	Nº LAMINA	CONGESTION	EDEMA	ESTEATOSIS	EROSION	NECROSIS	REACTIVOS
CONTROL	A	HIGADO	1	L,					
		RIÑON	2	M,					
		CORAZON	3	L,					
	B	HIGADO	4	L,	L y M				
		RIÑON	5	M,	M,				
		CORAZON	6	L,					
50 mg	A	HIGADO	7	M,					
		RIÑON	8	M,	L GLOMERULAR				
		CORAZON	9	L					
	B	HIGADO	10	L	L				
		RIÑON	11	M					
		CORAZON	12	M					
100mg	A	HIGADO	13	L					
		RIÑON	14	M					
		CORAZON	15	L					
	B	HIGADO	16	L	L	L			
		RIÑON	17	M					
		CORAZON	18	L					
200mg	A	HIGADO	19	M,	M,				M
		RIÑON	20	M, CORTICAL					
		CORAZON	21	L					
	B	HIGADO	22	M	L, FOCAL	L			L
		RIÑON	23	S, CORTICAL				M,	
		CORAZON	24	L					

FUENTE: DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y ANATOMÍAPATOLÓGICA, HOSPITAL REGIONAL CUSCO.

**Leyenda:**

- L: Leve
- M: Moderada
- S: Severa

**DISCUSION DE LA PARTE TOXICOLÓGICA:**

Los parámetros hematológicos se encuentran entre los valores de referencia a excepción de los valores de hematocrito y conteo de glóbulos rojos que se encuentran elevados, según (51) en altitudes muy elevadas, donde la cantidad de oxígeno se encuentra muy reducida, se transporta una cantidad insuficiente de oxígeno a los tejidos y aumenta de modo considerable la producción de eritrocitos, debido a que los especímenes de experimentación fueron traídos del Instituto Nacional de Salud-Lima y fueron adaptados a las condiciones ambientales durante un periodo de 10 días antes de empezar con la administración del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava*, se considera esta la razón por la cual los valores sanguíneos ya mencionados se encuentren por encima de los valores de referencia.

En cuanto a los parámetros bioquímicos tenemos que los resultados se encuentran entre los valores de referencia, pero se tiene una ligera elevación de urea en el grupo que recibió el extracto a una dosis de 200mg/Kg.

En los resultados del análisis histopatológico vemos que se presentó Congestión de leve a severa en todos los órganos analizados, la congestión se define como un proceso causado por la disminución del drenaje sanguíneo a un tejido, produciéndose un estancamiento de sangre desoxigenada a este nivel. (52) El método de eutanasia empleado causa un paro cardio-respiratorio, lo cual podría explicar la presencia de congestión a nivel de todos los tejidos analizados, la congestión está estrechamente relacionada con el desarrollo de edema, por tanto, congestión y edema frecuentemente aparecen juntos (53) esto puede explicar la presencia de edema en algunos de los tejidos analizados.

La Necrosis Renal Moderada en uno de los especímenes tratados con el extracto a una dosis de 200mg/Kg puede ser relacionada con los niveles ligeramente elevados de urea, pero los niveles de creatinina están entre los valores de referencia, esto puede deberse a

que al ser una necrosis moderada aún no se mostraron alteraciones significativas en estos dos parámetros.

La presencia de reactividad leve y moderada a nivel hepático en el grupo que recibió 200mg/Kg de extracto, nos indica que las células de ese tejido están en un proceso de regeneración por un daño previo, dicho daño probablemente se produjo por el día 14 de la administración del extracto ya que como mencionamos anteriormente se produjo una pérdida de peso hasta ese día, luego del día 14 se produjo una ganancia de peso gradual pero sin llegar a su peso original, lo cual significaría que los animales de experimentación estaban en recuperación; es por esto que los niveles de Transaminasas glutámico oxalacética y glutámico pirúvica se encuentran entre los valores de referencia, puesto que estas enzimas tienen un tiempo de vida media de 17 y 47 horas aproximadamente (54) y las muestras de sangre se tomaron un día después del último día de administración del extracto para ser analizadas.

# **CONCLUSIONES**

El extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava L.* "SAHUINTO" presenta elevada actividad antibacteriana in vitro frente a cepas aisladas de *Escherichia coli* y frente a la cepa ATCC de *Pseudomona aeruginosa* mientras que frente a la cepa ATCC de *Escherichia coli* y la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* presenta baja actividad antibacteriana.

La administración oral durante 28 días del Extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava L.*"SAHUINTO" a una concentración de 200mg/Kg de peso produce toxicidad a nivel renal y hepática.

Se obtuvo el extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava* "SAHUINTO"

El extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava L* "SAHUINTO" es muy soluble en: Dimetilsulfóxido (DMSO), Soluble en: Etanol al 70% y 96%, Poco Soluble en: Agua destilada, Etanol al 40%, 50% y 60 %, Éter y Acetona e Insoluble en Cloroformo, Hexano, Bencina y Tween 80. Se encontró gran cantidad de Compuestos Fenólicos, Taninos, Flavonoides, Glicósidos, Quinonas, Saponinas y Lactonas y ausencia de Alcaloides. El Porcentaje de Humedad fue de 75.68% y el Porcentaje de Extracción fue de 46.767%.

Se determinó la curva de crecimiento bacteriano de las cepas aisladas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* que al ser comparadas con las curvas de crecimiento de las cepas ATCC de dichas bacterias se presentó una velocidad de crecimiento bacteriano mayor por parte de las cepas bacterianas aisladas.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto seco hidroalcohólico al 70% de la especie vegetal *Psidium guajava L* "SAHUINTO" que es de 3mg/100uL para *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Se comparó los resultados de la actividad antibacteriana del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava* "SAHUINTO" con el antibiótico patrón Amikacina a una concentración de 30ug/100uL; teniéndose para las cepas aisladas de *Escherichia coli* a las concentraciones de 220.8mg/100uL, 248mg/100uL y 276mg/100ul de extracto una actividad antibacteriana superior a la del fármaco patrón, igualmente para la cepa ATCC

de *Pseudomona aeruginosa* a las concentraciones de 191.8mg/100uL, 219.2mg/100uL, 246.6 mg/100uL y 274 mg/100uL también se obtuvo una actividad antibacteriana mayor a la del fármaco patrón. En cuanto a la cepa de *Escherichia coli* ATCC y la cepa aislada de *Pseudomona aeruginosa* no se obtuvo concentraciones de extracto que presenten una actividad antibacteriana similar o superior al fármaco patrón.

Se determino los parámetros los parámetros hematológicos bioquímicos e histopatológicos presentándose resultados elevados en el Hematocrito y conteo de glóbulos rojos en todos los grupos de experimentación incluyendo el grupo control, un ligero aumento en los niveles de urea, necrosis renal y daño hepático en el grupo que recibió 200mg/Kg de extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Psidium guajava*

# **RECOMENDACIONES**

#### **A LOS INVESTIGADORES:**

Los resultados de las pruebas fotoquímicas nos muestran que *Psidium guajava* presenta alto contenido de flavonoides, pero ya que solo es una prueba cualitativa y los resultados de esta son subjetivos lo ideal sería realizar una prueba cuantitativa para determinar el contenido real de flavonoides en las hojas de *Psidium guajava* L.

Realizar una investigación que se dedique exclusivamente al estudio de cepas bacterianas aisladas a partir de pacientes ambulatorios, hospitalizados, (dependiendo de la patología) así como también de los ambientes del Hospital Regional y de todos los centros de atención de salud, centrándose principalmente en la velocidad de crecimiento bacteriano y su sensibilidad a antibacterianos de uso actual.

#### **A LA COMUNIDAD MÉDICA:**

Tomar mucha más importancia a los cambios que se están produciendo a nivel de bacterias patógenas, ya que las bacterias están evolucionando se requiere tener más cuidado en el uso de antibióticos así como también en las condiciones higiénicas de las entidades de salud que también es un factor que influye en este problema.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- 1.- **CARLOS E. ECHEMENDÍA SALIX, FRANCISCO J. MORÓN RODRÍGUEZ**, Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple, **Rev Cubana Plant Med** 2004; 9(3)
- 2.- **GUTIERREZ RM, MITCHEL, SOLIS RV.**; *Psidium guajava*: Una revisión de los usos tradicionales, su fotoquímica y farmacología; **J Ethnopharmacol.** 2008 México; 117(1):1-27, Citado en PubMed PMID: 18353572
- 3.- **DANIEL H. COOPER MD ANDREW J. KRAINIK MDSAM J. LUBNER MD HILARY E. L. RENO MD, PHD**, Manual de Terapéutica Médica de Washington, 32º ed., **ESPIRAL**, Washington-USA, 2007.
- 4.- **DHIMAN A, NANDA A, AHMAD S, NARASIMHAN B.**; Actividad antimicrobiana in-vitro del extracto metanólico de hojas de *Psidium guajava*; **J PharmBioalliedSci.** 2011 India;
- 5.- **METWALLY AM, OMAR AA, HARRAZ FM, EL SOHAFY SM**; Investigación Fitoquímica y Actividad Antimicrobiana de Hojas de *Psidium guajava*; **PharmacognMag.** 2010 Egipto; 6(23):212-8.; Citado en PubMed PMID: 20931082.
- 6.- **LIC. MARÍA JULIA MARTÍNEZ, LIC. MARISOL LÓPEZ, DR. JOSÉ BETANCOURT BADELL, DR. HÉCTOR BARCELÓ PÉREZ, LIC. MARÍA ELENA MONTE Y DRA. ROSAURA REGO** "Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba)" **REVISTA CUBANA DE PLANTAS MEDICINALES; CUBA** 2001 (2):56-61
- 7.- **ANGEL M. VILLAR DEL FRESNO**; *Farmacognosia General*; Editorial Síntesis; España 1999.
- 8.- **BEGUM, S.; HASSAN, S. I. AND SIDDIQUI, B. S.**, Dos triterpenoides nuevos aislados de hojas frescas de *Psidium guajava*, **Planta Med.** 2002, 68(12), 1149-52.
- 9.- **OVIEDO L., AIQUIPA H.**; Estudio comparativo in vitro de la actividad antibacteriana de los extractos secos hidroalcohólicos al 70% de las hojas de *Psidium guajava* (SAHUINTO) y *Chenopodium ambrosioides* (PAICO), frente a bacterias que causan infecciones de las vías respiratorias y determinación de la toxicidad agua en animales de experimentación, **UNSAAC, Cusco-Perú**, 2011.

- 10.- **INFOJARDIN**, Fichas De Plantas Medicinales, [acceso el 09 de enero del 2011]; Disponible en: <http://www.infojardin.net/fichas/plantas-medicinales/psidium-guajava.htm>.
- 11.- **TRAMIL: Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe**; Tramiloteca: *Psidium guajava*; Última actualización: 11/06/2011 [con acceso el 11/06/2011]; Disponible en: [http://www.tramil.net/fototeca/imageDisplay1.php?id\\_elem=256](http://www.tramil.net/fototeca/imageDisplay1.php?id_elem=256).
- 12.- **NTBG: National Tropical Botanical Garden**; Conoce a las plantas; *Psidium guajava* [acceso el 12/04/2012]; disponible en: [https://ntbg.org/plants/plant\\_details.php?plantid=9567](https://ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=9567).
- 13.- **INSAYA VADEMECUM**, Guayaba; [con acceso el 09 de enero del 2011]; Disponible en: <http://isnaya.webseiten.cc/index.php?id=94>.
- 14.- **TERRANOISTRA: VIVERO TEMATICO**; Guayabo rosado - *Psidium guajava*; publicado el 01/06/2011 [acceso el 15/12/2011]; disponible en: [http://terranostra-terranostra.blogspot.com/2011/06/guayabo-rosado-psidium-guajava\\_01.html](http://terranostra-terranostra.blogspot.com/2011/06/guayabo-rosado-psidium-guajava_01.html).
- 15.- **SAIZ A., LOPEZ G.**, Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria, Laboratorio del Ebro; Obtención y Aplicación de Extractos Naturales; acceso en 11 enero 2011; Disponible en: [http://www.ctnc.es/recursos/publico/Ponencias%20CEIDEA/100210Murcia\\_CNTA.pdf](http://www.ctnc.es/recursos/publico/Ponencias%20CEIDEA/100210Murcia_CNTA.pdf).
- 16.- **ROSA M. RAYBAUDI-MASSILIA, ROBERT SOLIVA FORTUNY, OLGA MARTÍN BELLOSO**; Uso de Agentes Antimicrobianos para la Conservación de Frutas Frescas y Frescas Cortadas; Departamento de Tecnología de Alimentos; Universidad de Lleida-España; [acceso el 12/01/2012]; Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/37700663/compuestos-antimicrobianos>.
- 17.- **RAMSÉS SALAS ASENCIOS, JORGE ARAUJO DÍAZ**; Actividad Antimicrobiana de Plantas, Revista Científica, Universidad Científica del Sur, Lima Perú 2008; [acceso el 12/01/2012]; Disponible en: <http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>.
- 18.- **PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, PARICHAT PHUMKHACHORN**; Contenido y actividad antibacteriana de flavonoides extraídos a partir de hojas de *Psidium guajava*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010 Tailandia, Vol. 4(5), pp. 393-396.

- 19.- ALAN J. WEIN, LOUIS R. KAVOUSSI, ANDREW C. NOVICK, ALAN W. PARTIN, CRAIG A. PETERS., Campbell - Walsh Urology, 9<sup>na</sup> ed., Philadelphia-United States, Elsevier Saunders, 2007.
- 20.- LAURENCE M. TIERNEY JR, STEPHEN J. MCPHEE, MAXINEA. PAPADAKIS., Diagnostico Clinico y Tratamiento, 41<sup>o</sup> ed, 2006.
- 21.- BAILEY, S., Diagnostico Microbiologico, 12<sup>o</sup> ed, Buenos Aires-Argentina, Editorial Medica Panamericana, 2009.
- 22.- MERCK, El Manual Merk Del Diagnostico al Tratamiento, 11<sup>va</sup> ed, Madrid-España, Elsevier, 2007.
- 23.- FRED F. FERRI, Consultor De Medicina Interna, Madrid-España, Editorial Oceano, 2007.
- 24.- DANIEL H. COOPER MD ANDREW J. KRAINIK MD SAM J. LUBNER MD HILARY E. L. RENO MD, PHD, Manual de Terapéutica Medica de Washington, 32<sup>o</sup> ed., ESPIRAL, Washington-USA, 2007.
- 25.- LERNER, K. LEE and LERNER, BRENDA WILMOTH, World of Microbiology and Immunology, Volumen 1; Detroit-New York USA; Mark Springer, 2003.
- 26.- JAWETZ, ERNEST, MELNICK, JOSEPH L., ADELBERG, EDWARD A., BROOKS, GEO. F., BOTTEL, JANET S., ORNSTON, L. NICHOLAS; Microbiologia Medica de Jawetz, 18<sup>a</sup> ed, Mexico, El Manual Moderno, 2005.
- 27.- URRUNGA ORMACHEA, MARIO JESUS, Actividad Antibacteriana De La Especie Vegetal *Acicarpa tribuloides* "Estrella Kiska" Frente a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, Germen Causante de Infección del Tracto Genito Urinario, Cusco-Peru, UNSAAC, 2003.
- 28.- BURROWS, A., Tratado De Microbiologia, 21<sup>o</sup> ed, Mexico, Editorial Interamericana, 1984.
- 29.- MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M., PARKER, JACK., Biología De Los Microorganismo, 10<sup>a</sup> ed, Madrid-España, PRENTICE HALL, 2003.
- 30.- LANSING M. PRESCOTT. Microbiology, 5ta Ed, The McGraw Hill Companies; 2002.

- 31.- **LITTER, M.**, Compendio De Farmacologia, EL ATENEO, 1994.
- 32.- **GUERSI, A.**, Metodo De Analisis Clinicos y su Interpretacion, 4° ed, Buenos Aires-Argentina, EL ATENEO, 1989.
- 33.- **JAUREGUI PEREDO, LUIS E.**, Antimicrobianos: Uso Terapeutico en Infectologia Clinica, Ecuador, PLURAL EDITORES, 2002.
- 34.- **GOODMAN & GILMAN**, Las Bases Farmacologicas De La Terapeutica, 11ª ed, Mexico, EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA, 2010.
- 35.- **JOSE BELLO GUTIERREZ, ADELA LOPEZ DE CERAIN SALSAMENDI**; Fundamentos De Ciencia Toxicológica, 1ª ed., Madrid-España, 2001.
- 36.- **HODGSON, ERNEST.**, A Text Book of Modern Toxicology, 3a ed, North Carolina State University-USA; WILEY INTERSCIENCE, 2004.
- 37.- **IQB.ES**, Principios de Toxicología, última actualización 03/01/2012 [acceso el 05/06/2011]; Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma05/tox/tox02.htm>.
- 38.- **OSMAM**, Diccionario del Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalusia, OSMAM, 1997.
- 39.- **OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS**; Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents; OECD 2008; Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740701e.pdf?expires=1339551854&id=id&accname=freeContent&checksum=6855C14666AFF018F35989D7D4C6CEBA>.
- 40.- **O. LOOCK de UGAZ**, Investigacion Fitoquimica, Metodos en el Estudio de Productos Naturales 2ª ed, Pontificia Universidad Catolica del Peru. Lima-Peru, FONDO EDITORIAL, 1994.
- 41.- **MOSBY/DOYMA**, Diccionarios De Medicina, Enfermeria y Ciencias De La Salud, 5ª ed, Madrid-España, EDICIONES HARCOURT, 2000.
- 42.- **INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE LA UNIVERSIDAD DE NAVARRA**; Diccionario Espasa de Medicina; Editorial Espasa-Calpe 2005.
- 43.- **DIGESA**, Norma Sanitaria sobre Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano, Cusco-Perú, 1999.

- 44.- **CHIKARA FURUSAWA, KUNIHICO KANEKO**; Un mecanismo general para la regulación adaptativa de la tasa de crecimiento, **PLoSComputBiol**, 2008, citado en PMC: 2186362.
- 45.- **MICHAEL T. MADIGAN, JOHN M. MARTINCO, JACK PARKER**, Brock: Biología De Los Microorganismos, 10º ed., PEARSON Prentice Hall, España, 2003.
- 46.- **ROSA ELENA SACSAQUISPE CONTRERAS, JORGE VELÁSQUEZ POMAR**, Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión, Instituto Nacional de Salud, 2002.
- 47.- **P. GHOSH, A. MANDAL, P. CHAKRABORTY, M. G. RASUL, MADHUMITA CHAKRABORTY, Y A. SAHA.**; Triterpenoides de *Psidium guajava* con actividad biocida; Indian J Pharm 2010; 72(4): 504–507; Citado en PubMed PMID: 21218065.
- 48.- **S. BUVANESWARI, C.K.RAADHA, N.KRISHNAVENI, S.JAYASHREE**, Actividad antimicrobiana in-vitro de *Psidium guajava* contra cepas de importancia clínica, **EJLS** 2011, 1(1) ,14-22.
- 49.- **JHON J. ROJAS, AURA M. GARCIA, ALVIN J. LOPEZ**, Evaluación de Dos Metodologías Para Determinar La Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales, **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 2005 Chile, 4(2), 28-32.
- 50.- **LEÓN GOÑI, AVELINA CARIDAD, BLANCO DIURIS, PEÑA AMELIA, RONDA MARISEL, GONZÁLEZ BÁRBARA O., ARTEAGA MARÍA E. y col**; Valores Hematológicos y Bioquímicos de las Ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, **RevelectronVet.** 2011 - Cuba, 12(11).
- 51.- **GUYTON y HALL**, Tratado de Fisiología Medica, 12ª ed, ELSEVIER, España-2011.
- 52.- **DR NICOLAS SABILLON V.**; Trastornos Hemodinámicos; Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Departamento de Patología; [acceso el: 12/05/12]; disponible en: <http://www.slideshare.net/troncony/edema-hiperhemia-congestion-i-semester-2010>.
- 53.- **BUYO MARTÍNEZ**; Trastornos hemodinámicos: Edema, hiperemia y congestión, hemorragia, hemostasia y trombosis; 2006 [acceso el: 05/05/2012]; disponible en: [http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema\\_09.pdf](http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_09.pdf).

**54.- JOHN BERNARD HENRY, El Laboratorio en el Diagnostico Clínico, MARBAN, España-2006.**

**55.- BERTRAM G. KATZUNG, SUSAN B. MASTERS, ANTHONY J. TREVOR, Farmacología Básica y Clínica, 11ª ed., McGraw Hill, 2010.**

**56.- METWALLY AM, OMAR AA, HARRAZ FM, EL SOHAFY SM; Investigación Fitoquímica y Actividad Antimicrobiana de Hojas de *Psidium guajava*; PharmacognMag. 2010 Egipto; 6(23):212-8.; Citado en PubMedPMID: 20931082.**

# **ANEXOS**

## ANEXO N°1

OECD/OCDE 407 Adaptado: 3 de Octubre del 2008 © OECD, (2008)

### GUIAS OECD PARA LA PRUEBA DE COMPUESTOS QUIMICOS

#### Estudio de Toxicidad Oral: Dosis Repetida por 28 Días en Roedores

##### Principios de la Prueba

La sustancia de ensayo se administra por vía oral diariamente en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante un período de 28 días. Durante el período de administración, los animales se observan de cerca, cada día en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren o son sacrificados durante y en la conclusión de la prueba se les practica la necropsia, los animales supervivientes son sacrificados y llevados a un análisis histopatológico. Un estudio de 28 días proporciona información sobre los efectos de la exposición oral repetida y puede indicar la necesidad de realizar más estudios a largo plazo. También puede proporcionar información sobre la selección de las concentraciones para los estudios a largo plazo. Los datos derivados del uso de esta Guía debe permitir la identificación de la sustancia toxica en ensayo, para verificar la relación de respuesta a la dosis y la determinación del nivel de Efecto Adverso no observado (hasta qué punto la sustancia en ensayo no presenta efectos adversos).

##### DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

###### Selección de especies animales:

La especie preferida de roedor es la rata, aunque otras especies de roedores pueden ser utilizados. Si los parámetros especificados en este TG 407 son investigados en otras especies de roedores debe darse una justificación detallada. Aunque es biológicamente plausible que otras especies deben responder a los agentes tóxicos de una manera similar a la rata, el uso de especies más pequeñas puede resultar en aumento de la variabilidad debido a dificultades técnicas de

dissección de órganos más pequeños. En el programa de validación internacional para la detección de disruptores endocrinos, la rata fue la única especie utilizada. Animales adultos jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso común debe ser empleado. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La dosis debe iniciarse tan pronto como sea posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. Al comienzo del experimento, la diferencia de peso de los animales utilizados debe ser mínima y no superar el  $\pm 20\%$  del peso medio de cada sexo. Cuando una dosis oral repetida se lleva a cabo como fase previa de un estudio a largo plazo, es preferible que los animales sean de la misma cepa.

### **Vivienda y alimentación**

Todos los procedimientos deben ajustarse a las normas cuidado de los animales de laboratorio. La temperatura en la sala de experimentación ha de estar  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Aunque la humedad relativa debe ser de al menos 30% y preferiblemente no superior a 70%, salvo durante la limpieza de la habitación, de preferencia entre 50-60%. La iluminación debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, las dietas de laboratorio convencionales, puede ser usado un suministro ilimitado de agua potable. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla adecuada de una sustancia de ensayo cuando se administra por este método. Los animales deben ser alojados en grupos pequeños del mismo sexo, los animales pueden ser alojados individualmente si es justificado científicamente. Por jaulas colectivas, no más de cinco animales en cada jaula.

### **Preparación de los animales**

Animales sanos adultos y jóvenes son asignados al azar a los grupos control y de tratamiento. Las jaulas se disponen de tal manera que los posibles efectos debidos a la colocación de la jaula se reducen al mínimo. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos cinco

días antes del inicio del estudio de tratamiento para permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

### **Preparación de las dosis**

El compuesto de ensayo se administra por sonda o con la dieta o agua potable. El método de administración oral depende del objetivo del estudio, y las propiedades físicas / químicas / toxico-cinéticas de la sustancia de ensayo.

Cuando sea necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa se considerará primero, seguido por el examen de una solución o suspensión en aceite (por ejemplo, aceite de maíz) y, a continuación, la disolución en otros vehículos. Para vehículos distintos del agua, características tóxicas del vehículo debe ser conocido. La estabilidad de la sustancia de ensayo en el vehículo debe ser determinada.

### **Número y sexo de los animales**

Al menos 10 animales se deben utilizar en cada nivel de dosis. Si la eutanasia provisional se ha previsto, el número debería ser aumentado por el número de animales programados para ser sacrificados antes de la finalización del estudio.

### **Dosis**

Generalmente, al menos tres grupos de prueba y un grupo control se debe utilizar. Si no hay datos adecuados, un estudio de determinación del intervalo (animales de la misma cepa y la fuente) se puede realizar para ayudar a la determinación de las dosis a utilizar. Excepto para el tratamiento con la sustancia de ensayo, los animales del grupo testigo deben ser tratados de manera idéntica a los lotes de ensayo. Si el vehículo se utiliza en la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el vehículo en el mayor volumen utilizado. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente sobre la sustancia de ensayo o productos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero no la muerte ni un

sufrimiento intenso. A partir de entonces, una secuencia descendente de dosis debe seleccionarse con el propósito de demostrar cualquier respuesta relacionada con la dosis. Dos a cuatro intervalos suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes, si se adiciona un cuarto lote de ensayo, es preferible utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, más de un factor de 10) entre dosis. En caso de observar toxicidad general (por ejemplo, la reducción de peso corporal, el hígado, el corazón, los pulmones o los efectos renales, etc) u otros cambios que pueden no ser las respuestas tóxicas (por ejemplo, consumo reducido de alimentos, agrandamiento del hígado), efectos observados sobre la inmunidad, sistema nervioso o endocrino deben ser interpretados con cautela.

### **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 1000 mg de peso corporal / kg / día no produce ningún efecto tóxico observable entonces, un estudio completo con tres dosis no se considera necesario. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis más alta para ser utilizado.

### **La administración de dosis**

Los animales son dosificados con la sustancia de ensayo al día, 7 días a la semana durante un período de 28 días. Cuando la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis a los animales con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo. El volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso utilizados. Excepto en caso de sustancias irritantes o corrosivas, que muestren normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. Para las sustancias administradas con los alimentos o el agua potable, es

importante asegurarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administra en la dieta, ya sea una concentración constante dieta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales puede ser usado; la alternativa utilizada debe ser especificada. La sustancia se administra por sonda, la dosis debe administrarse a la misma hora cada día, y ajustarse según sea necesario para mantener un nivel de dosis constante en términos de peso corporal del animal. Cuando un estudio de administración continuada es usado como fase previa de un estudio a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos estudios.

### **Observaciones**

El periodo de observación debe ser de 28 días. Animales en el grupo satélite (usado para ver los efectos que se pueden producir cuando se deja de administrar la sustancia en experimentación) deben ser mantenidos al menos por 14 días sin tratamiento

Las observaciones clínicas deben ser realizadas al menos una vez al día, de preferencia a la misma hora cada día.

Después de la primera exposición y al menos una vez a la semana después de la primera administración debe realizarse observaciones clínicas detalladas de todos los animales. Estas observaciones deben ser realizadas fuera de las jaulas y de preferencia a la misma hora de día todos los días. Debe hacerse esfuerzos para asegurar que las variaciones en las condiciones del ensayo sean mínimas. Debe observarse cambios en la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad autonómica (lagrimeo, piloerecton, tamaño de pupila, patrón de respiración inusual) cambios en la postura y respuesta a la manipulación así como la presencia de movimientos tónicos o clónicos o comportamiento agresivo (como automutilación) deben ser también reportados.

### **Peso Corporal y consumo de comida y agua**

Todos los animales deben ser pesados al menos una vez a la semana, si la sustancia en prueba es administrada vía el agua que consumen los animales de experimentación, entonces el consumo de agua también debe ser controlado al menos una vez a la semana.

### **Hematología**

Los siguientes parámetros hematológicos deben ser hallados al final del periodo de experimentación: Hematocrito, Hemoglobina, conteo de Glóbulos Rojos, Reticulocitos, recuento total y diferencial de glóbulos blancos, conteo de plaquetas.

Si la sustancia en prueba tiene o se sospecha que posee propiedades oxidativas debe realizarse pruebas de concentración de metahemoglobina y cuerpos de Heinz.

### **Bioquímica Clínica**

La determinación de la Bioquímica Clínica para investigar los efectos tóxicos en tejidos, específicamente sobre riñón e hígado deben ser realizados partir de sangre obtenida de todos los animales a partir del momento de la Eutanasia.

Investigaciones de plasma y suero deben incluir análisis de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albumina, al menos dos enzimas indicadoras de efectos hepatocelulares( transaminasa glutámico oxalacética y glutámico piruvica) y ácidos biliares. Algunas pruebas enzimáticas adicionales y bilirrubina pueden proporcionar información útil bajo ciertas condiciones.

Opcionalmente los siguientes análisis de orina pueden ser realizados durante la última semana del estudio utilizando orina recolectada: apariencia, volumen, osmolaridad o gravedad específica, pH, proteínas, glucosa, presencia de células sanguíneas.

Las muestras de plasma específicamente las destinadas a la determinación de hormonas deben ser obtenidas a una determinada hora del día. Es recomendable que se de consideración a la determinación de T3, T4 y TSH basándose en resultados del análisis histopatológico de tiroides, Si la base de datos histórica es inadecuada, se debe dar consideración a la determinación de variables hematológicas y la bioquímica clínica antes de empezar la dosificación o de preferencia trabajar con un grupos de animales que no estén incluidos en los grupos de experimentación.

## **PATOLOGIA**

### **Necropsia**

Todos los animales incluidos en el estudio deben ser sometidos a necropsia lo cual incluye análisis cuidadoso de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneal, torácica y abdominal, y sus contenidos. El Hígado, riñones, glándulas renales, testículos, próstata, vesícula seminal, timo, cerebro y corazón de todos los animales deben ser separados de cualquier tejido que se adhiera y también se debe tomar su peso tan pronto sea posible después de la disección, para evitar que se sequen. Se debe tener mucho cuidado al obtener la próstata para evitar dañar las vesículas seminales. La próstata y las vesículas seminales pueden ser pesadas después de la fijación de tejidos.

Otros dos tejidos pueden ser pesados después de la disección (los ovarios y el útero).

El peso de la tiroides (opcional) puede ser determinado después de la fijación, el tejido. Tener mucho cuidado con el tejido ya que un daño puede comprometer el análisis histopatológico.

Dependiendo del tipo de tejido y la exanimación histopatológica que se quiera hacer los siguientes tejidos deben ser preservados en el más apropiado medio de fijación: Cerebro, medula espinal, ojos, estomago, intestino grueso y delgado, hígado riñones, glándulas renales, corazón, timo, tiroides, tráquea, y pulmones, testículos y ovarios, órganos sexuales accesorios, musculo esquelético y huesos.

Los siguientes tejidos pueden dar valiosa indicación para efectos endocrinos relacionados: gónadas, órganos sexuales accesorios, vagina, glándula pituitaria, glándulas mamarias, tiroides y glándulas adrenales.

### **Histopatología**

El análisis histopatológico debe ser realizado en los órganos y tejidos debidamente conservados de todos los animales de experimentación.

Todas las lesiones deben ser examinadas.

### **REPORTE DE RESULTADOS**

- **Datos**

Todos los datos deben ser mostrados en una forma tabular mostrando el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales encontrados muertos durante la prueba o que fueron sacrificados por razones humanas y el tiempo en que se produjo cada muerte, el número de animales que mostro signos de toxicidad, el día, duración, la severidad de la toxicidad y el porcentaje de animales que mostro cada tipo de lesión.

De ser posible, los resultados numéricos deben ser evaluados por un método estadístico apropiado. Comparaciones del efecto en un rango de dosis deberían evitar el uso de multiplex t-tets. El método estadístico debe ser seleccionado durante el diseño del estudio.

Para control de calidad se propone que se colecte datos históricos. Estos datos pueden ser usados con el propósito de comparar con estudios actuales

- **Reporte de la Prueba**

El reporte de la prueba debe incluir la siguiente información:

**Prueba de la sustancia:**

Naturaleza física, pureza y características fisicoquímicas, datos de identificación vehículo (si es apropiado) justificación de la elección del vehículo si es que este no es agua.

**Animales de la Prueba:**

Especies y cepa usada, numero, edad y sexo, origen, condiciones de crianza, dieta, pesos individuales de los animales al inicio de la prueba, justificar si es que se uso una especie diferente a la rata.

**Condiciones de la Prueba:**

Dosis seleccionadas, detalles de la formulación de la sustancia usada, estabilidad y homogeneidad del preparado, detalles de la administración de la sustancia, detalles de la calidad de comida y agua

**Resultados**

Peso corporal, cambio de los pesos, consumo de agua y comida, datos de respuesta a toxicidad por sexo y por dosis, incluyendo signos de toxicidad, naturaleza, severidad y duración de las observaciones clínicas(su fueron reversibles o no) actividad sensorial, pruebas hematológicas con resultados relevantes, pruebas bioquímicas con resultados relevantes, resultados de la necropsia, una descripción de tallada de los resultados histopatológicos, resultados estadísticos de los datos, discusión de los resultados y conclusiones.

ANEXO N°2

IDENTIFICACION BOTANICA DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO Calle Tigre N° 127 Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210 243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL Plaza de Armas s/n Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEO INKA Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA" Av. De la Cultura N° 721 "Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO CUZ.

**CERTIFICA**

Que, los Bachilleres: **QUIROGA ZANABRIA, DANNY JOSEPH** y **QUISPE TAPIA, JAIME ARMANDO**; con el expediente N° 11360, de la Carrera Profesional de **Farmacia y Bioquímica**; Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado al Herbario CUZ una muestra botánica herborizada para su identificación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y en comparación con las muestras existentes en el herbario, de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie *Psidium guajava* L. Siendo la posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Myrtaceae
Género	:	<i>Psidium</i>
Especie	:	<i>Psidium guajava</i> L.
N. vulgar	:	Sahuinto, guayaba

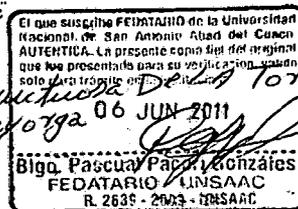
Se les expide, el presente certificado de identificación de la especie para los fines que vieran por conveniente

Cusco, 02 de Junio de 2011



Arch/HV CUZ

Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco  
Herbario (CUZ)  
M. Sc. FREDY LA TORRE MARGO  
Directora



## ANEXO N°3

### REACCIONES DE RECONOCIMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO

#### 1. COMPUESTOS FENOLICOS.

A 0.5 ml de extracto agregar una o dos gotas de cloruro férrico al 1%, la presencia de precipitados o coloraciones azules o verdosas indican prueba positiva para compuestos fenolicos.

#### 2. ALCALOIDES.

Reacción de Dragendorf: A 0.4 ml de solución acida agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado naranja o marrón indica la presencia de alcaloides

#### 3. LACTONAS.

Prueba de hidroxamato férrico: A 0.5 ml de solución etanólica con 0.5mg de muestra sólida agregar 0.5 ml de clorhidrato de hidroxalamina 0.5N en etanol, mas 0.1 ml de KOH 2N, enfriar y acidular con tres gotas de HCl 0.5 N, luego se adiciona 3 gotas de cloruro férrico al 1%, si se observa una coloración violácea es reacción positiva.

#### 4. QUINONAS.

Reacción de Borntrager: A 0.5 ml de extracto agregar 0.5 ml de KOH al 0.5%, calentar, filtrar si es necesario, enfriar y acidular, luego extraer con benceno, a la fase de benceno separada agregar 0.5 ml de hidróxido de amonio. La coloración rojo en la fase de amoniaco indica presencia de naftoquinona y antraquinonas.

#### 5. FLAVONOIDES.

Shinoda: A 0.5 ml de extracto, agregar unas limaduras de magnesio mas 2 o 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, coloraciones rojizas o amarillentas indican prueba positiva.

#### 6. TANINOS.

A 0.5 ml de extracto agregar 3 a 5 gotas de la solución de gelatina-NaCl al 1%, la formación de un precipitado indica reacción positiva.

## **7. SAPONINAS.**

Prueba de la espuma: A un tubo de ensayo que contenga 2 ml de extracto, diluir 5 veces su volumen en agua y agitar vigorosamente por 30 segundos. La formación de espuma persistente por 30 minutos indica prueba positiva.

## **8. GLICOSIDOS.**

A 200 mg de extracto se le agrega 2 ml de ácido clorhídrico al 1% refluja por minutos, enfriar y neutralizar con hidróxido de sodio al 1%. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica prueba positiva.

**FUENTE:** O. LOOCK de UGAZ, Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales 2ª ed, Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima-Perú, FONDO EDITORIAL, 1994.

## ANEXO N°4

### VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LAS RATAS SPRAGUE DAWLEY PRODUCIDAS EN CENPALAB, CENP: SPRD

(Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD)

**León Goñi Avelina Caridad | Blanco Diuris | Peña Amelia | Ronda Marisel | González Bárbara O. | Arteaga María E. | Bada Ana M. | González Yana | Mancebo Axel.** Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB)

Contacto: [aveli@cenpalab.inf.cu](mailto:aveli@cenpalab.inf.cu) o [avelinalg@infomed.sld.cu](mailto:avelinalg@infomed.sld.cu)

#### RESUMEN

Las ratas son animales ampliamente usados como biomodelos. Los rangos normales de referencia son una herramienta indispensable para la experimentación animal, porque permiten evaluar el estado higiénico sanitario de los animales a la vez que ayudan a establecer diferencias en el comportamiento de los parámetros de la fisiología animal durante los experimentos, sin embargo existen muy pocos artículos donde se describen los parámetros de su fisiologismo normal. Este trabajo se propuso como objetivo establecer el rango normal de las principales variables hematológicas y bioquímicas de ratas Sprague Dawley producidas en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), desde el año 1998 hasta el 2002. Para el estudio se utilizaron los datos de 780 animales, de ambos géneros, con una edad comprendida entre 5 y 22 semanas. Los parámetros analizados fueron: concentración de hemoglobina, conteo de eritrocitos, hematocrito, conteo de plaquetas, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, leucocitos totales, conteo diferencial de leucocitos, conteo de reticulocitos, Fosfatasa Alcalina, Creatinfosfokinasa, Ganmaglutamiltranspeptidasa, Aspartatoaminotransferasa, Alaninoaminotransferasa, Albúmina, Bilirrubina total, Proteínas totales, Glucosa, Acido Úrico, Urea, Calcio, Fósforo, Colesterol total, Triglicéridos y Creatinina. Con los resultados obtenidos se logra caracterizar los parámetros hematológicos y bioquímicos por edades de las ratas Sprague Dawley de ambos géneros producidas en CENPALAB, lo cual permite realizar un análisis integral del estado de salud de este animal de laboratorio.

**Palabras clave:** hematología | bioquímica sanguínea | ratas Sprague Dawley.

En la tabla 1 se muestran los valores de referencia de los parámetros hematológicos de las ratas Sprague Dawley (Cenp: SPRD), donde se aprecia el comportamiento de las variables analizadas por género y por grupos de edades: 5 a 8, 9 a 14 y 15 a 22 semanas.

**Tabla # 1:** Valores de referencia de parámetros hematológicos de ratas SpragueDawley (Cenp: SPRD).

Parámetros	Género					
	Hembras			Machos		
	Rangos de edades (semanas)					
	5-8	9-14	15-22	5-8	9-14	15-22
Concentración de Hemoglobina (g/dl)	11.81 -15.44	11.26 -14.86	11.97 -15.18	12.31 -15.18	12.09 -15.18	12.64 -15.52
Hematocrito (%)	33.4 - 45.0	30.1 - 44.4	31.4 - 39.4	33.9 - 48.5	33.1 - 45.8	32.7 - 41.0
Conteo de Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	6.06 - 7.74	6.5 - 7.9	5.81 - 7.19	6.06 - 7.74	6.33 - 8.64	6.03 - 8.10
Reticulocitos (%)	0.70 - 4.59	1.45 - 3.82	2.30 - 3.65	0.5 - 4.8	1.68 - 4.32	2.16 - 3.48
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	436 - 844	404 - 888	474 - 895	446 - 852	428 - 857	438 - 916
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	3.99 - 10.47	3.84 - 10.11	2.88 - 8.19	5.04 - 12.36	4.84 - 12.96	3.84 - 10.74
Neutrofilos (%)	1.99 - 13.51	0.37 - 16.21	3.88 - 12.79	2.0 - 13.85	0 - 19.44	0 - 14.5
Linfocitos (%)	85.02 -97.26	82.71 -98.94	83.64 -96.93	84.71 -97.40	82.67 -96.71	83.51 -97.13
Monocitos (%)	0 -2	0 -2	0 -2	0 -2	0 -2	0 -2.5
Eosinofilos (%)	0 -2	0 -1	0 -1	0 -1	0 -1	0 -1
VCM: Volumen Corpuscular Medio (fL)	53.7 - 59.4	53.0 - 59.4	51.3 - 56.2	56.9 - 62.0	52.4 - 59.9	48.6 - 55.6
HCM: Hemoglobina Corpuscular Media (pg)	17.2 - 20.9	16.6 - 20.2	19.4 - 22.7	17.9 - 20.9	15.6 - 21.2	18.2 - 22.2
CHCM: Concentración de hemoglobina Corpuscular Media (g/dL)	30.6 - 36.8	28.9 - 36.7	36.9 - 41.3	30.3 - 35.2	28.1 - 33.3	36.7 - 40.6

**Tabla # 2:** Valores de referencia de parámetros bioquímicos en suero de ratas SpragueDawley (Cenp: SPRD).

Parámetros	Genero					
	Hembras			Machos		
	Rangos de edad (semanas)					
	5-8	9-14	15-22	5-8	9-14	15-22
Fosfatasa alcalina (UI/L)	60.5 - 284.1	82.8 - 297.3	69.65 - 227.26	150.5 - 421.3	85.4 - 311.7	134.5 - 357.3
Creatinfosfokinasa (UI/L)	246 - 3228	494 - 4132	3027 - 3428	381 - 3393	233 - 4367	1384 - 4975
GGT (UI/L)	0 - 2.33	0 - 1.43	0 - 3.13	0 - 0.86	0 - 1.05	0 - 1.97
GOT /AST (UI/L)	79.5 - 248.1	94.9 - 240.8	42.9 - 270.8	65.8 - 266.2	88.9 - 215.8	61.4 - 276.2
GPT/ALT (UI/L)	20.2 - 69.8	32.7 - 84.1	33.4 - 73.1	26.3 - 68.5	32.2 - 80.9	41 - 83.1
Albúmina (g/dL)	2.76 - 4.88	2.92 - 4.64	3.18 - 5.22	2.63 - 4.59	2.94 - 4.29	2.94 - 4.65
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.005 - 0.19	0.025 - 0.42	0 - 0.48	0.01 - 0.17	0 - 0.39	0.01 - 0.43
Proteínas totales (g/dL)	6.11 - 17.49	5.99 - 7.45	6.40 - 8.20	5.45 - 7.67	5.69 - 7.34	5.94 - 7.97
Glucosa (mg/dL)	60.0 - 161.7	66.8 - 154.9	54.7 - 189.7	43.0 - 152.7	58.0 - 160.2	48.4 - 91.2
Urea (mg/dL)	33.11 - 86.5	38.33 - 8.79	43.2 - 70.8	38.0 - 63.3	31.6 - 52.6	39.6 - 68.8
AcidoÚrico (mg/dL)	1.05 - 3.01	2.22 - 4.11	1.25 - 3.76	0.88 - 1.66	0.97 - 4.72	1.28 - 3.71
Calcio (mmol/L)	1.79 - 3.29	2.37 - 2.91	2.15 - 3.17	1.51 - 3.19	2.21 - 2.81	2.19 - 3.27
Fósforo (mg/dL)	4.33 - 8.74	5.42 - 6.74	4.2 - 8.33	6.1 - 8.26	6.01 - 8.68	5.26 - 8.44
Colesterol Total (mg/dL)	49.7 - 91.0	41.1 - 59.1	58.5 - 101.6	44.4 - 96.9	40.3 - 84.7	52.2 - 95.7
Triglicéridos (mg/dL)	24.5 - 91.3	76.4 - 132.8	62.4 - 123.7	26.7 - 99.9	44.8 - 119.8	52.2 - 21.5
Creatinina (mg/dL)	0.23 - 0.80	0.5 - 0.92	0.48 - 0.68	0.32 - 0.71	0.46 - 0.88	0.43 - 0.64
Albúmina/globulina	0.25 - 2.80	0.69 - 2.19	0.44 - 2.68	0.32 - 2.48	0.74 - 2.12	0.43 - 2.41

## ANEXO N°5

### AGAR MULLER HINTON

#### Indicaciones:

Para el ensayo de la sensibilidad, para ensayo de resistencia de agentes patógenos, clínicamente importantes frente a antibióticos y sulfamidas, para la realización del ensayo de difusión en placas, para mejorar de forma considerable el crecimiento de microorganismos exigentes, puede añadirse agar sangre al agar Muller Hinton.

#### Características:

La composición de estos medios de cultivo garantiza, por una parte, condiciones favorables de crecimiento y por otro parte, cuneta con la ausencia, muy considerable, de antagonistas de las sulfamidas.

#### Composición:

Carne de infusión.....	2.0g
Ácido hidrolizado de caseína.....	17,5 g
Agar.....	13.0g
Almidón.....	1,5 g

PH: 7.4 ± 0.2 a 25°C.

#### Preparación:

Disolver 34gr en 1000ml de agua destilada, estéril con cuidado en autoclave durante 15 minutos a 122°C, enfriar eventualmente a 45-50°C posteriormente verter en placas petri dejar endurecer. Para pruebas de control de calidad de la muestra, incubar a 37°C por 24 horas, posteriormente queda listo para ser utilizada.

**FUENTE:** Extraído de las etiquetas de Medios de cultivo Merk.

## ANEXO N°6

### CALDO DE CEREBRO CORAZON. (Brain Heart Infution)

#### Indicaciones:

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes.

#### Características:

Adecuado para el cultivo de diversas bacterias exigentes.

También se utiliza para la preparación de inóculos para el uso en la susceptibilidad a los antimicrobianos.

#### Composición:

Caldo de cerebro.....	200mg
Caldo de corazón .....	250mg
Glucosa.....	2.0mg
Cloruro de sodio .....	5.0mg
Hidrogeno fosfato disodico.....	2.5mg

PH:  $7.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Preparación:

Disolver 37mg en 1000 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

**FUENTE:** Extraído de las etiquetas de Medios de cultivo MerK.

## ANEXO N°7

### TSA; TRYPTICASE SOJA AGAR

#### Indicaciones:

Es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias, aunque no es medio de elección para anaerobios. Permite visualizar reacciones hemolíticas que producen muchas especies bacterianas.

#### Características:

Tiene por base una fuente proteica (digeridos tripticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre.

#### Composición:

Digerido pancreático de caseína .....	15.0 g
Digerido papaico de haba de soja .....	5.0 g
Cloruro Sódico .....	5.0 g
Agar .....	15.0 g
Factores de crecimiento .....	1.5 g
Sangre desfibrinada de carnero .....	50.0 ml

**FUENTE:** Extraído de las etiquetas de Medios de cultivo Merk

ANEXO N°8

CUADRO N°1 ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO

TIPO DE PRUEBA	EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE Psidium guajava "Sahuinto"
ALCALOIDES.	
LACTONAS.	
QUINONAS.	
COMPUESTOS FENOLICOS.	
FLAVONOIDES.	
TANINOS.	
SAPONINAS.	
GLICOSIDOS.	

FUENTE: Elaboración propia para registro de datos experimentales

LEYENDA:

- Abundante cantidad       +++
- Regular cantidad        ++
- Poca cantidad            +
- Ausencia                   -

ANEXO N°9

CUADRO N°2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

SOLVENTE	EXTRACTO SECO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE Psidium guajava "Sahuinto"
AGUA DESTILADA	
ETER ETILICO	
METANOL	
ETANOL DE 96%	
ETANOL DEL 70%	
ETANOL DEL 60%	
ETANOL DEL 50%	
ETANOL DEL 40%	
BENCINA	
ACETONA	
ACETATO DE ETILO	
CLOROFORMO	
HEXANO	
DIMETILSULFOXIDO (DMSO)	
TWEEN 80	

FUENTE: Elaboración propia para registro de datos experimentales

LEYENDA:

- Muy soluble           +++
- Soluble                ++
- Poco soluble         +
- Insoluble             -

ANEXO N°10

CUADRO N°3 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA PRUEBA PILOTO EN LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

NUMERO POZO	DE	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE Psidium guajava "Sahuinto"	SECO	HALOS DE INHIBICIÓN EN MILIMETROS
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
FARMACO PATRON				

FUENTE: Elaboración propia para registro de datos experimentales

**ANEXO N° 11**

**CUADRO N°4 FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LOS EXAMENES TOXICOLOGICOS**

<b>GRUPO</b>	<b>RATA</b>	<b>HEMATOCRITO (%)</b>	<b>HEMOGLOBINA(G/dL)</b>	<b>RECUENTO DE GLOBULOS ROJOS</b>	<b>RECUENTO DE GLOBULOS BLANCOS</b>
	<b>N</b>				
	<b>O</b>				
<b>G1 (50MG/Kg)</b>	<b>C</b>				
	<b>P</b>				
	<b>L</b>				
	<b>N</b>				
	<b>O</b>				
<b>G2 (100mg/Kg)</b>	<b>C</b>				
	<b>P</b>				
	<b>L</b>				
	<b>N</b>				
	<b>O</b>				
<b>G3 (200mg/Kg)</b>	<b>C</b>				
	<b>P</b>				
	<b>L</b>				
	<b>N</b>				
	<b>O</b>				
<b>Control</b>	<b>C</b>				
	<b>P</b>				
	<b>L</b>				

**FUENTE:** Elaboración propia para registro de datos hematológicos

ANEXO N° 12

CUADRO N°5 FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA RECUENTO DIFERENCIAL DE GLOBULOS BLANCOS

GRUPO	RATA	RECUENTO DIFERENCIAL DE GLOBULOS BLANCOS				
		NEUTROFILOS (%)	BASOFILOS (%)	LINFOCITOS (%)	MONOCITOS (%)	EOSINOFILOS (%)
G1 (50mg/Kg)	N					
	O					
	C					
	P					
G2 (100mg/Kg)	L					
	N					
	O					
	C					
G3 (200mg/Kg)	P					
	L					
	N					
	O					
Control	C					
	P					
	L					
	N					

FUENTE: Elaboración propia para registro de datos hematológicos

ANEXO N° 13

CUADRO N°6 FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LOS EXAMENES BIOQUIMICOS

GRUPO	RATA	Transaminasa Glutámico Oxalacetica (UI/L)	Transaminasa Glutámico Pirúvica (UI/L)	Fosfatasa Alcalina (UI/L)	Creatinina (mg/L)	Urea (g/dL)
	N					
	O					
G1 (50MG/Kg)	C					
	P					
	L					
	N					
	O					
G2 (100mg/Kg)	C					
	P					
	L					
	N					
	O					
G3 (200mg/Kg)	C					
	P					
	L					
	N					
	O					
Control	C					
	P					
	L					

FUENTE: Elaboración propia para registro de datos Bioquímicos

**ANEXO N°14**

**CUADRO N°7 FICHA DE LA RECOPIACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICION**

N° DE DISCO	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/pozo)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm) EN CEPAS ATCC DE <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
FARMACO PATRON					

**LEYENDA:**

**IG:** Primer grupo de placas

**IIG:** Segundo grupo de placas

**IIIG:** Tercer grupo de placas

**FUENTE:** Elaboración propia para registro de datos experimentales

**ANEXO N°15**

**CUADRO N°8 FICHA DE LA RECOPIACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICION**

N° DE DISCO	CONCENTRACION DEL EXTRACTO (mg/pozo)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm) EN CEPAS AISLADAS DE <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>			
		IG	IIG	IIIG	PROMEDIO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
FARMACO PATRON					

**LEYENDA:**

IG: Primer grupo de placas

IIG: Segundo grupo de placas

IIIG: Tercer grupo de placas

**FUENTE:** Elaboración propia para registro de datos experimentales



# Pseudomona aeruginosa



Certificate of Analysis (Lyophilized Microorganism Specification) and Performance Upon Release

<p><b>Specifications</b>                  Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                  Catalog Number: 0353                  Lot Number: 353-74                  Reference Number: ATCC® 27953™                  Purity: Pure                  Recovery: &gt; 1000 CFUs per Petal                  Passage from Reference: 4                  Expiration Date: 2012/05</p>	<p><b>Additional Information</b>                  Release Information:                  Quality Control Technologist: Carol J. Stanoch                  Release Date: 2011/11/13                  Disclaimer:                  The last digit(s) of the lot number appearing on the packaging strip is merely a packaging event number. The 03 number displayed on this certificate is the certificate lot number.</p>																																																																																																
<p><b>Performance</b></p>																																																																																																	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                  Two colony types: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen (SEAP) and small BEAP</p> <p><b>Microscopic Features:</b>                  Straight or slightly curved gram negative rod</p>	<p><b>Medium:</b>                  BEAP</p> <p><b>Method:</b>                  Gram Stain</p>																																																																																																
<p><b>Vitek GN</b></p> <table border="0"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Feature</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Alk-Pho-PRYLAZIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ADONITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-ARABITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-GELLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>H2S PRODUCTION</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Oxidant/Arylamidase pNA</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>GLUTAMYL-GLUTAMYL-TRANSFERASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>FERMENTATION GLUCOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-N-Acetyl-arylamidase pNA</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>LIPASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>GALACTINASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE SUCROSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TALATOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td>+</td></tr> <tr><td>MALONATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>5-KETO-D-GLUCONATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE oxidation</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE oxidation</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Cysteine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>LYSINE DECARBOXYLASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>INDOLE production</td><td>+</td></tr> <tr><td>COURMARONE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCORONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>GLUS RESISTANCE (ccc, vbr, c)</td><td>+</td></tr> <tr><td>GLU-Gly-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-MALATE oxidation</td><td>+</td></tr> <tr><td>ELIMAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE oxidation</td><td>+</td></tr> </tbody> </table>	Phenotypic Feature	Result	Alk-Pho-PRYLAZIDASE	-	ADONITOL	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	L-ARABITOL	-	D-GELLOSE	-	BETA-GALACTOSIDASE	-	H2S PRODUCTION	-	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	Oxidant/Arylamidase pNA	+	D-GLUCOSE	+	GLUTAMYL-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+	FERMENTATION GLUCOSE	-	BETA-GLUCOSIDASE	-	D-MALTOSE	-	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	-	BETA-XYLOSIDASE	-	BETA-N-Acetyl-arylamidase pNA	+	L-Proline ARYLAMIDASE	+	LIPASE	+	GALACTINASE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	UREASE	-	D-SORBITOL	-	SACCHAROSE SUCROSE	-	D-TALATOSE	-	D-TREHALOSE	-	CITRATE (SODIUM)	+	MALONATE	+	5-KETO-D-GLUCONATE	-	L-LACTATE oxidation	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	SUCCINATE oxidation	+	BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	-	PHOSPHATASE	-	Cysteine ARYLAMIDASE	-	ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	LYSINE DECARBOXYLASE	-	INDOLE production	+	COURMARONE	+	BETA-GLUCORONIDASE	-	GLUS RESISTANCE (ccc, vbr, c)	+	GLU-Gly-ARYLAMIDASE	-	L-MALATE oxidation	+	ELIMAN	-	L-LACTATE oxidation	+	<p><b>Other Features/Challenges/Results</b>                  Oxidase (Kovacs) positive                  Indole (Medium) positive                  Gelatinase (10 mg) - 24 hrs Susceptibility 15 - 24 hrs</p> <div style="text-align: center;">                   Eric Godwin, President                  AUTHORIZED SIGNATURE             </div>
Phenotypic Feature	Result																																																																																																
Alk-Pho-PRYLAZIDASE	-																																																																																																
ADONITOL	-																																																																																																
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																																																
L-ARABITOL	-																																																																																																
D-GELLOSE	-																																																																																																
BETA-GALACTOSIDASE	-																																																																																																
H2S PRODUCTION	-																																																																																																
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-																																																																																																
Oxidant/Arylamidase pNA	+																																																																																																
D-GLUCOSE	+																																																																																																
GLUTAMYL-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+																																																																																																
FERMENTATION GLUCOSE	-																																																																																																
BETA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																
D-MALTOSE	-																																																																																																
D-MANNITOL	+																																																																																																
D-MANNOSE	-																																																																																																
BETA-XYLOSIDASE	-																																																																																																
BETA-N-Acetyl-arylamidase pNA	+																																																																																																
L-Proline ARYLAMIDASE	+																																																																																																
LIPASE	+																																																																																																
GALACTINASE	-																																																																																																
Tyrosine ARYLAMIDASE	+																																																																																																
UREASE	-																																																																																																
D-SORBITOL	-																																																																																																
SACCHAROSE SUCROSE	-																																																																																																
D-TALATOSE	-																																																																																																
D-TREHALOSE	-																																																																																																
CITRATE (SODIUM)	+																																																																																																
MALONATE	+																																																																																																
5-KETO-D-GLUCONATE	-																																																																																																
L-LACTATE oxidation	+																																																																																																
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																
SUCCINATE oxidation	+																																																																																																
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-																																																																																																
ALPHA-GALACTOSIDASE	-																																																																																																
PHOSPHATASE	-																																																																																																
Cysteine ARYLAMIDASE	-																																																																																																
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-																																																																																																
LYSINE DECARBOXYLASE	-																																																																																																
INDOLE production	+																																																																																																
COURMARONE	+																																																																																																
BETA-GLUCORONIDASE	-																																																																																																
GLUS RESISTANCE (ccc, vbr, c)	+																																																																																																
GLU-Gly-ARYLAMIDASE	-																																																																																																
L-MALATE oxidation	+																																																																																																
ELIMAN	-																																																																																																
L-LACTATE oxidation	+																																																																																																
<p><small>Note for Users: Although the Vitek panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p>																																																																																																	
<p><small>ATCC® and Vitek® are trademarks of the American Type Culture Collection, Inc. (ATCC). The ATCC logo and the ATCC logo and the ATCC logo are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to reproduce them on its VITEK culture cards.</small></p>																																																																																																	
<p><small>© 2010 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 217 Owen Avenue, Walkersville, MD 21791</small></p>																																																																																																	

ANEXO Nº17



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS  
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

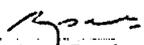
CERTIFICADO SANITARIO Nº 247-2011

Producto	Rata Albina	Lote N°	M - 44 - 2011
Especie	Rattus norvegicus	Cantidad	: 25
Cepa	Moltzman	Edad	: 4 a 6 semanas
Peso	220 a 260 g	Sexo	: Machos
Boleta de Venta N°	004-13018    G.R. 022458	Destino	: Danny Joseph Quiroga Zanabria
Fecha	: 25-10-11		

El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias \*

\*Referencia P.R.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 25 de Octubre del 2011  
(Fecha de emisión del certificado)

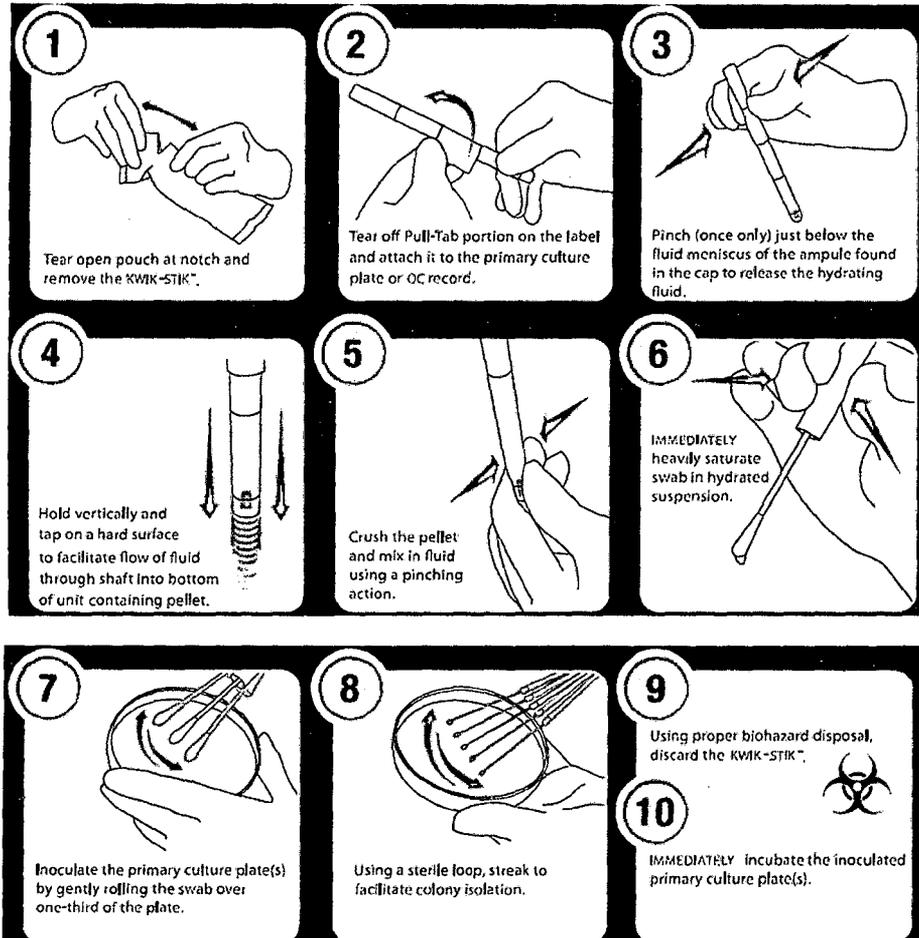
  
M.V. Arturo Rosales Fernández  
C.M.V.P. 1588

NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo

## ANEXO N°18

### INSTRUCCIONES DE USO DE LAS CEPAS ATCC

KWIK-STIK™ Plus Instructions for Use  
Also for KWIK-STIK™ and EZ-COMPTM



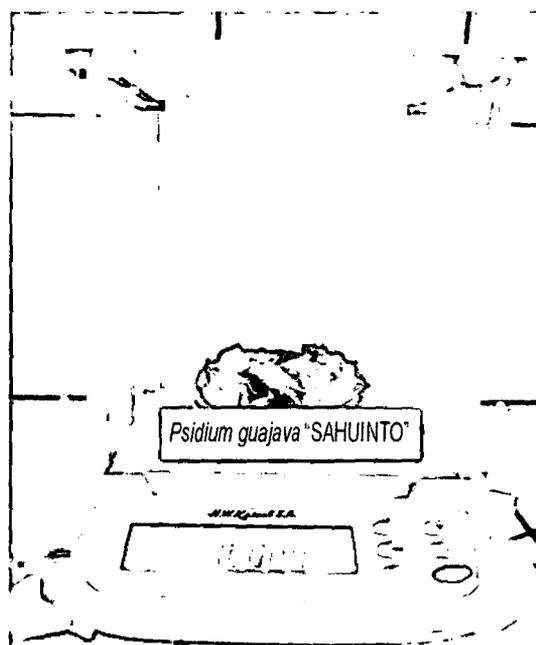
# **ARCHIVO FOTOGRAFÍCO**



**FOTOGRAFIAS N° 1 y 2**

En esta fotografía se observa a la especie vegetal *Psidium guajava* "Sahuinto", ubicada en pachachaca Abancay departamento de Apurímac.

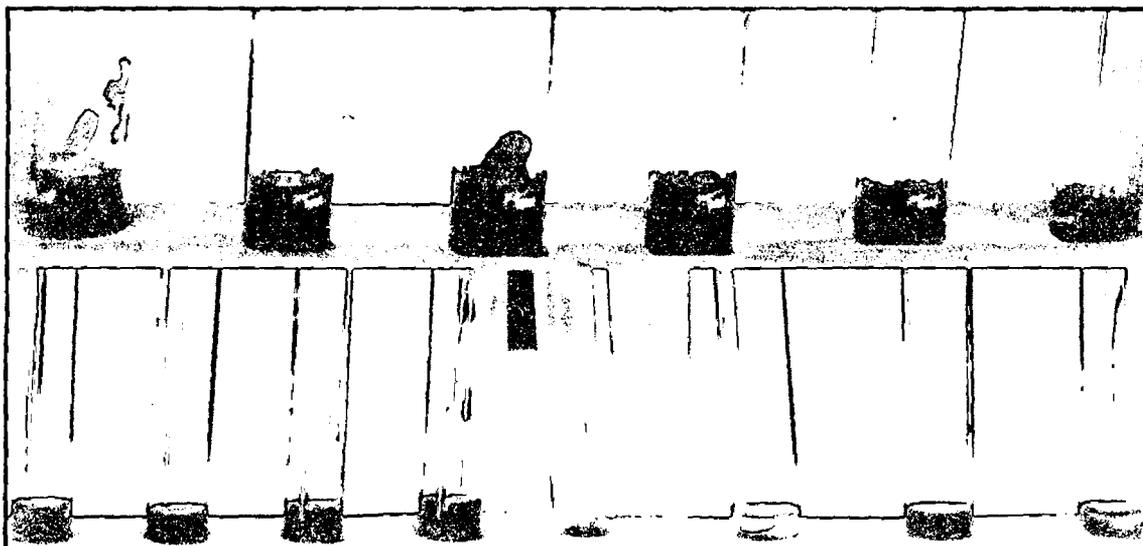
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 3**

En esta fotografía se observa el pesaje de la especie vegetal para la determinación del porcentaje de humedad.

FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.

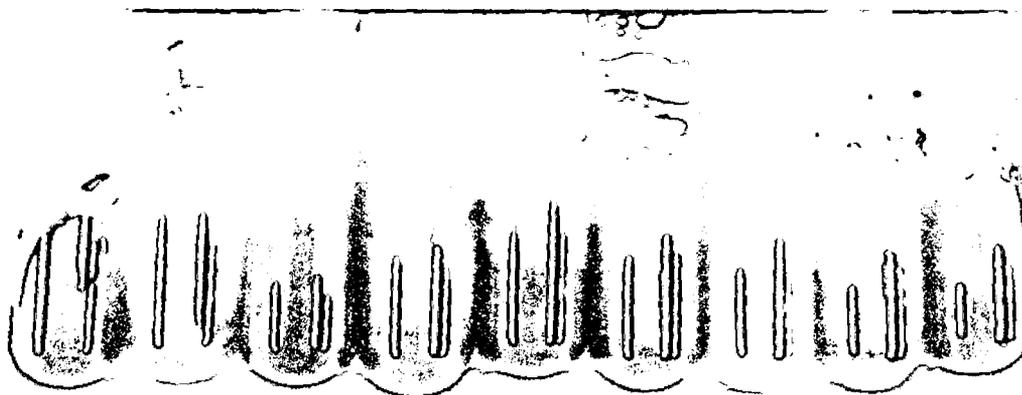


**FOTOGRAFIA N° 4**

En la parte superior de izquierda a derecha se observa: la solubilidad en agua, metanol, etanol de 40, 50, 60 y 70%.

En la parte inferior de izquierda a derecha se observa: la solubilidad con etanol al 96%, acetona, éter, dimetilsulfóxido (DMSO), cloroformo, hexano, bencina y tween 80.

FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N°5**

En esta fotografía se observa el análisis fitoquímico realizado a la especie vegetal *Psidium guajava* "sahuinto", de izquierda a derecha se observan: Compuestos fenólicos, Alcaloides, Quinonas, Azúcares reductores, Glicósidos, Flavonoides, saponinas, Lactonas, Taninos.

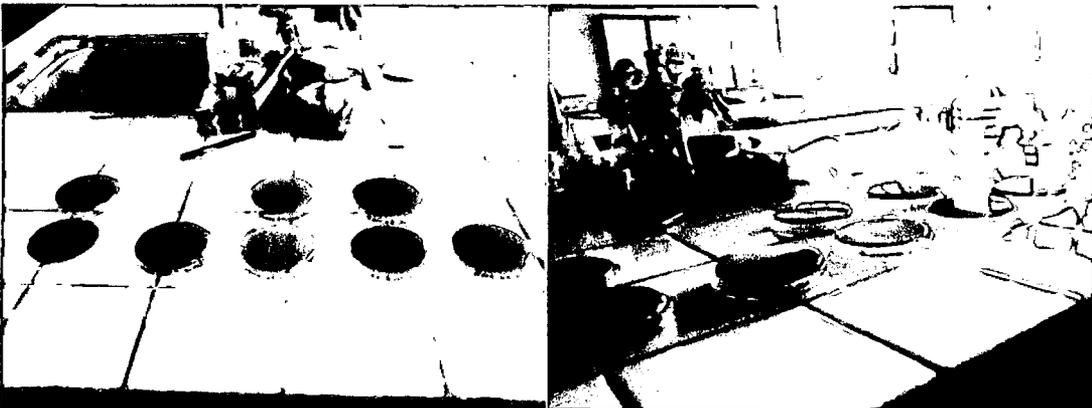
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 6 y 7**

En la fotografía N° 6 podemos observar el proceso de filtrado del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Psidium guajava* "SAHUINTO", en la fotografía N° 7 se observa la concentración del extracto hidroalcohólico utilizando el rota-vapor.

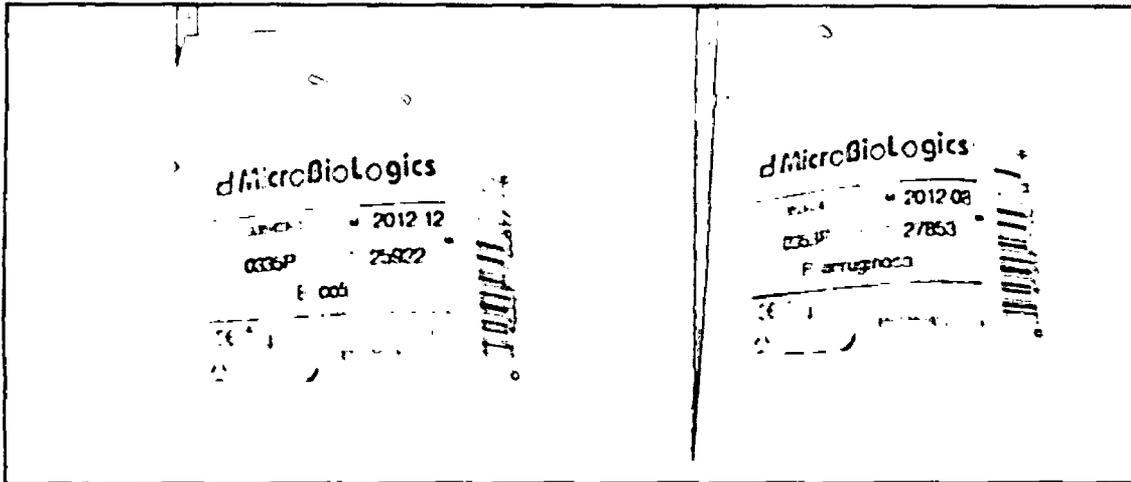
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 8 y 9**

Observamos las pruebas microbiológicas del extracto seco hidroalcohólico de *Psidium guajava* "SAHUINTO"

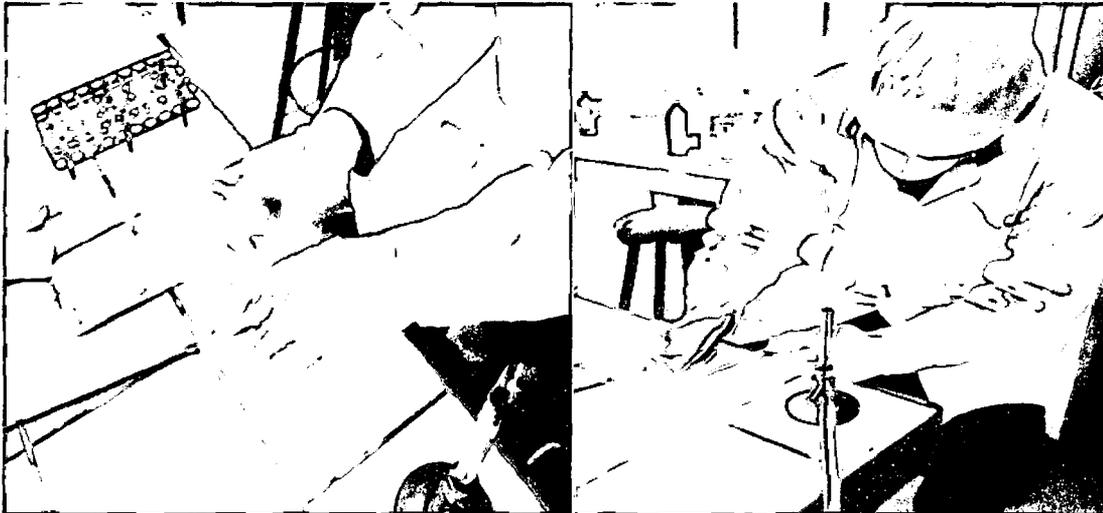
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 10 Y 11**

En estas fotografías se observan a las cepas liofilizadas que se utilizaron para el análisis microbiológico. De izquierda a derecha se observa: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

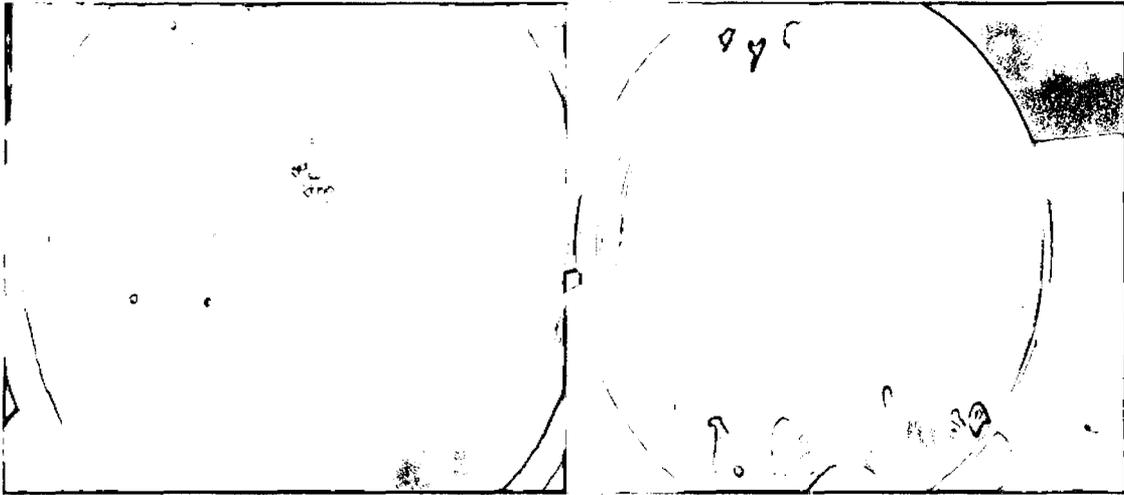
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 12 Y 13**

En estas fotografías se observan la activación de las cepas ATCC liofilizadas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

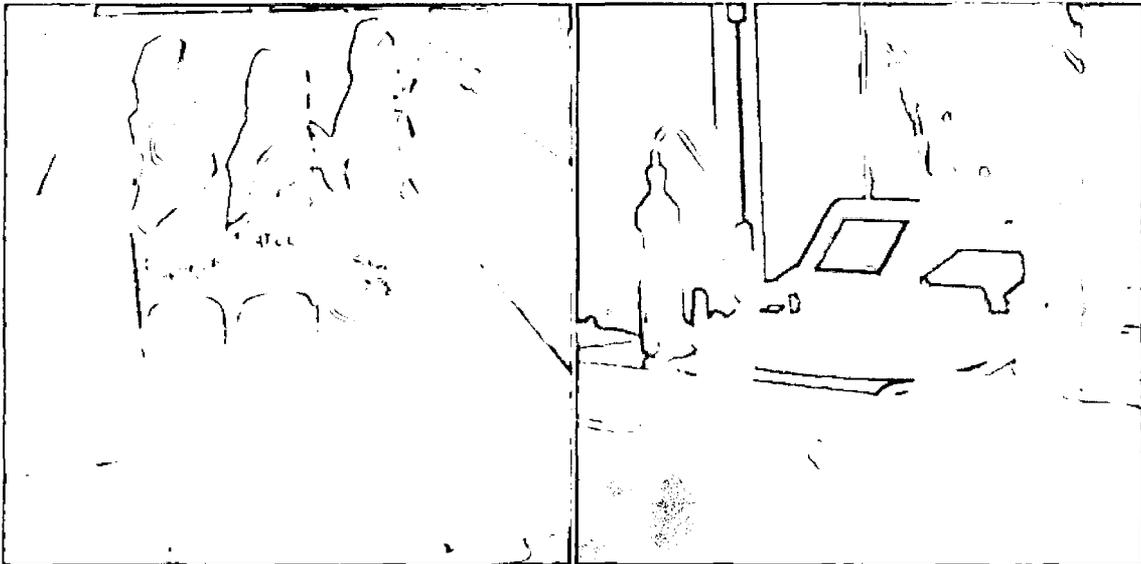
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 14 Y 15**

Se observan de izquierda a derecha las cepas ATCC de *E. coli* y *P. aeruginosa* ya reactivadas.

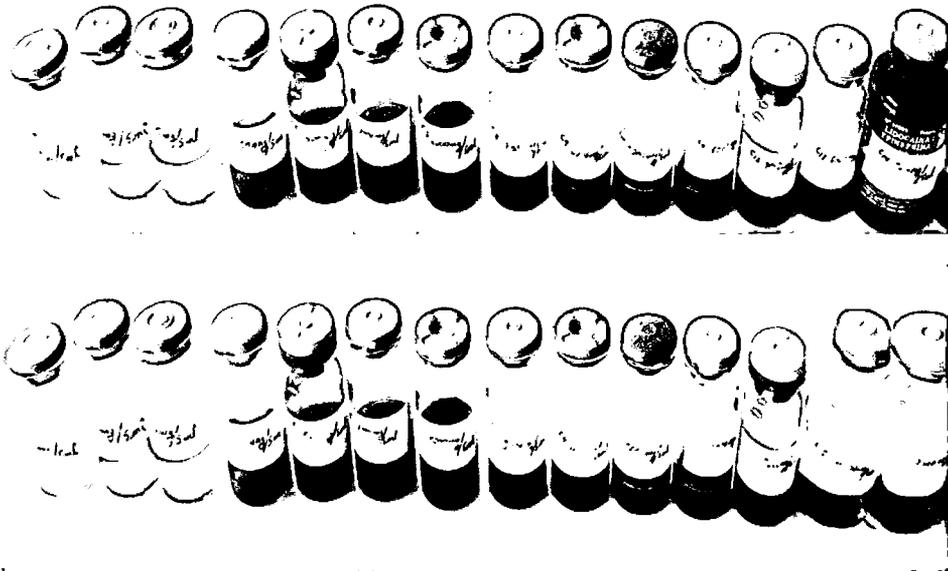
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 16 Y 17**

En estas fotografías se observan las muestras de *E. coli* y *P. aeruginosa* ATCC y AISLADAS listas para medir su absorbancia en el fotocolorímetro a 620 nm para determinar la curva de crecimiento bacteriano.

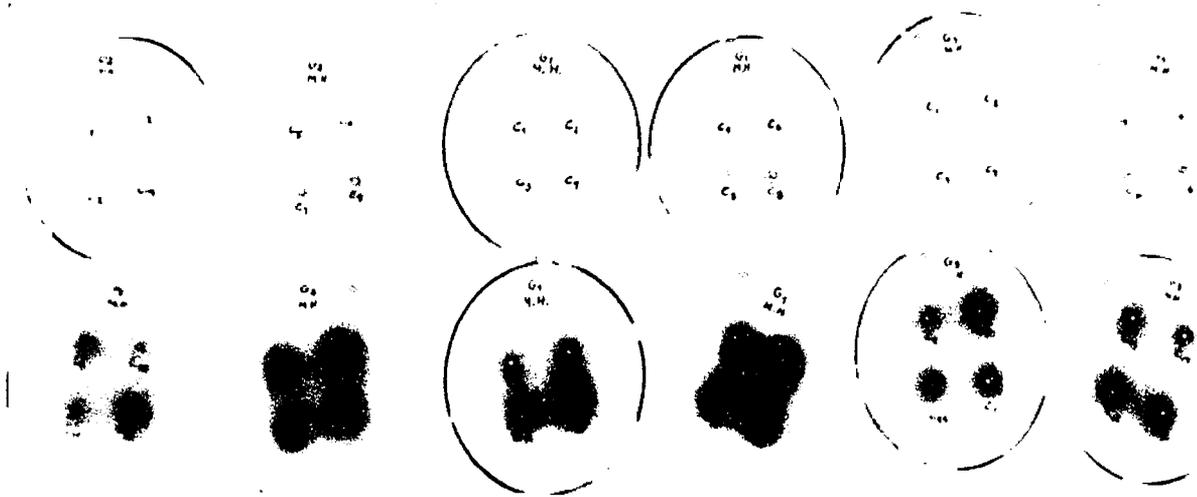
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 18 Y 19**

Se observa de arriba abajo las muestras del extracto de *Psidium guajava* para determinar la actividad antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* respectivamente.

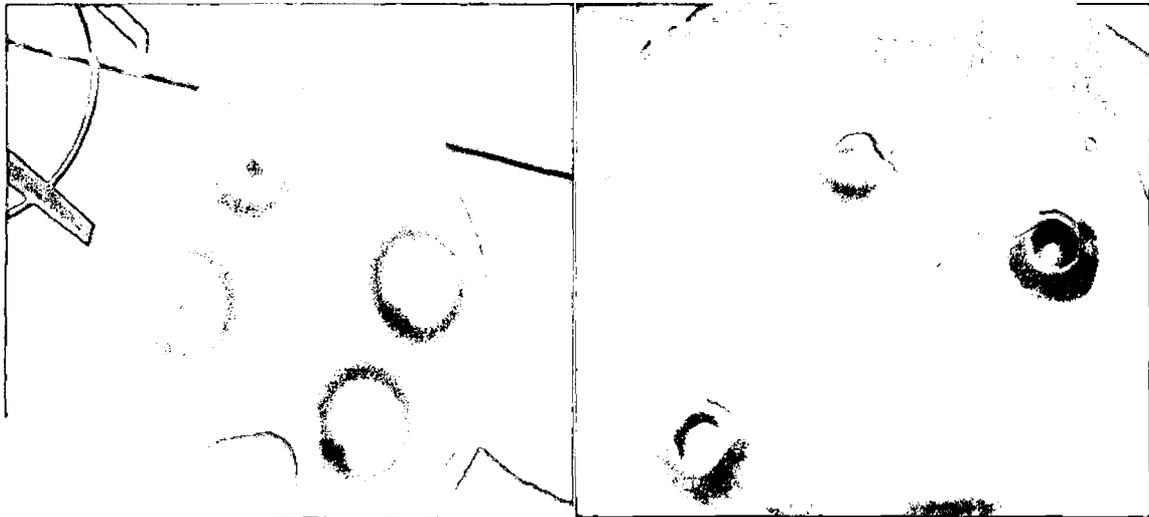
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N°20**

Aquí tenemos las placas usadas en la determinación de la actividad antibacteriana de la cepa ATCC de *Escherichia coli*.

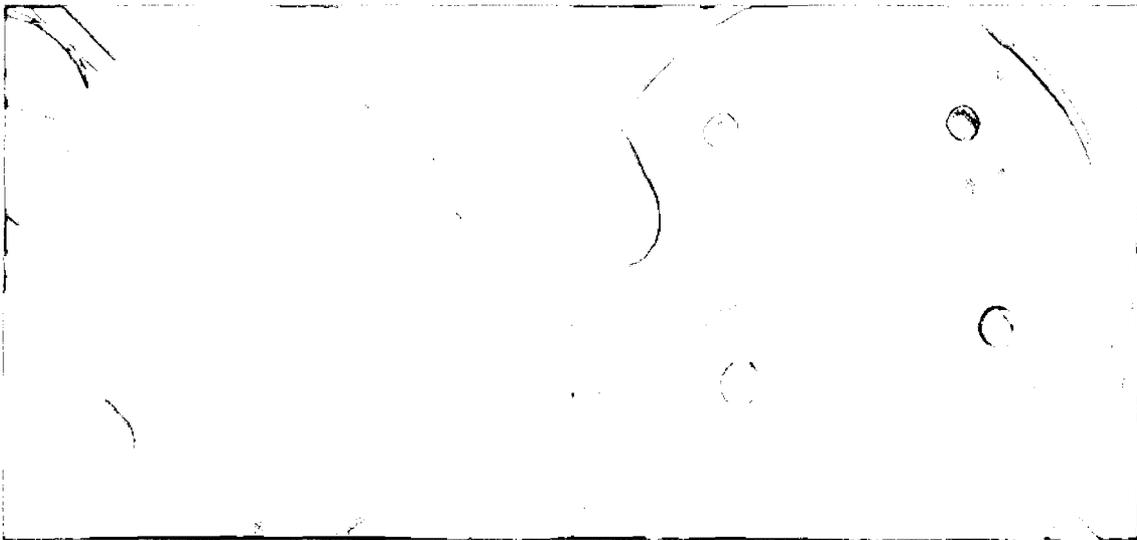
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 21 Y 22**

Se pueden observar en las fotografías los halos de inhibición de las cepas aisladas de *Escherichia coli*.

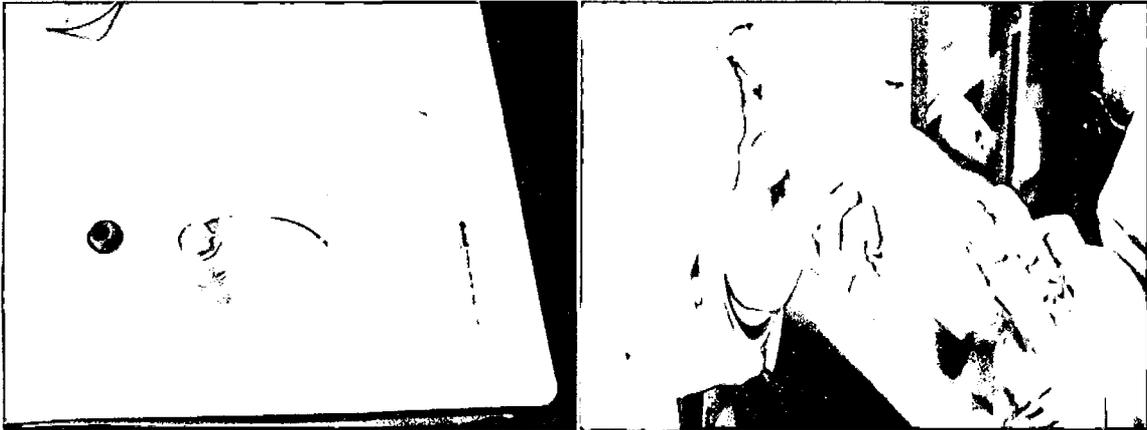
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 23 Y 24**

Se observan los halos de inhibición de las cepas ATCC y Aisladas de *Pseudomona aeruginosa* respectivamente.

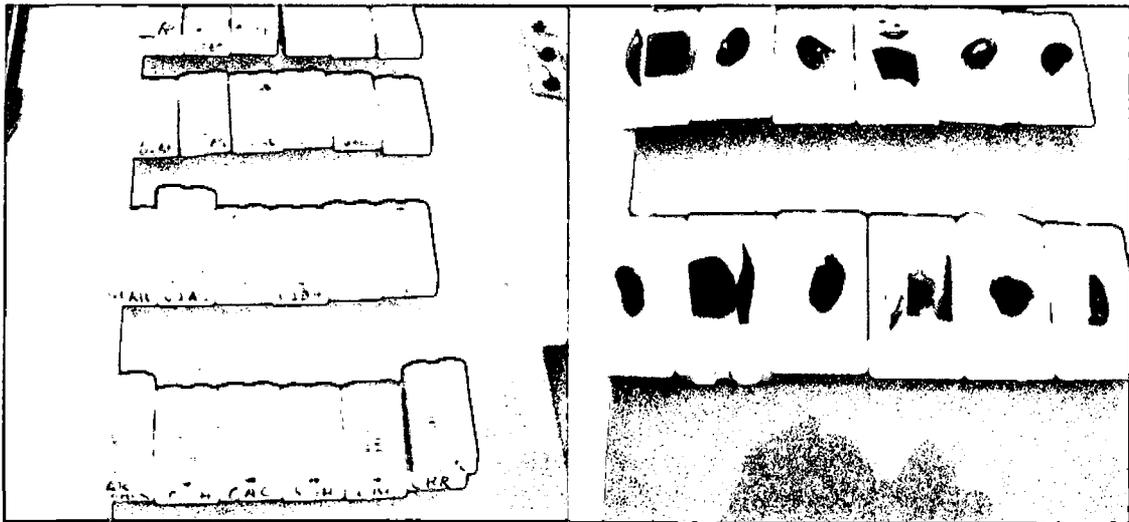
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 25 Y 26**

Se observa en la fotografía N° 24 un matraz que contiene una de las concentraciones del extracto de *Psidium guajava* "SAHUINTO" utilizado para la administración y determinación de toxicidad sub aguda en las ratas Holtzman como se muestra en la fotografía N° 26.

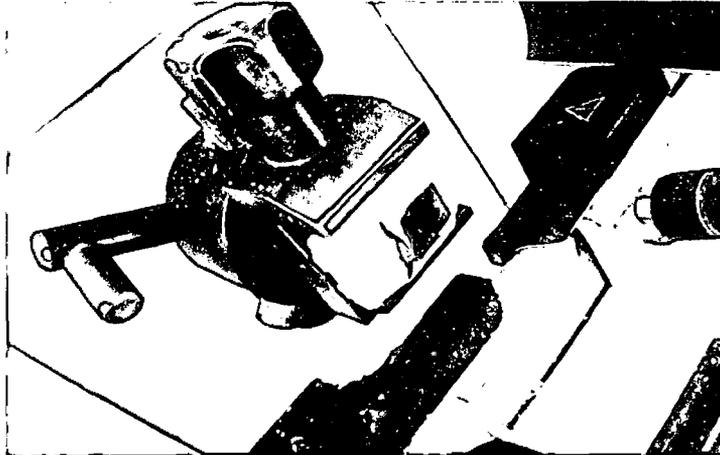
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 27 Y 28**

En las fotografías N° 26 y 27 se observan los órganos fijados; luego de esto se realiza un corte con un aparato llamado Microtomo que nos da una fina capa de órgano fijado que recién es llevada al microscopio para observar las alteraciones histológicas que el extracto de *Psidium guajava* "SAHUINTO" pudo causar.

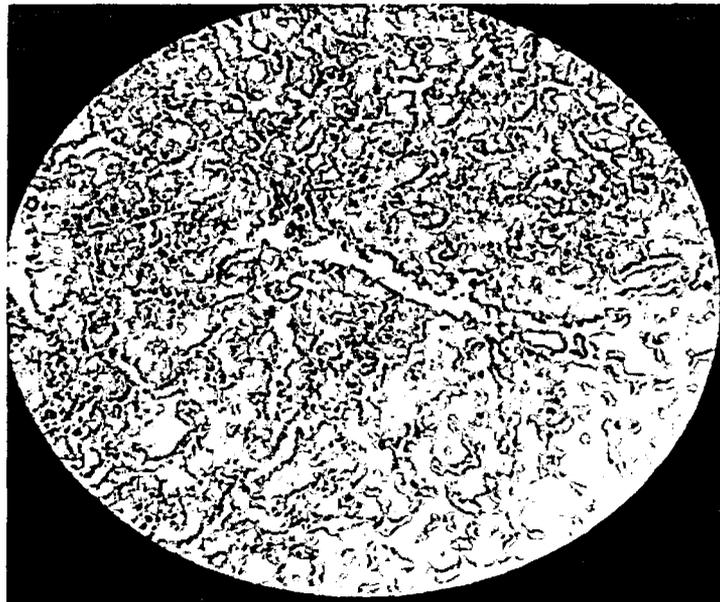
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 29** Micrótomo

Aparato usado para obtener finos cortes de los órganos fijados.

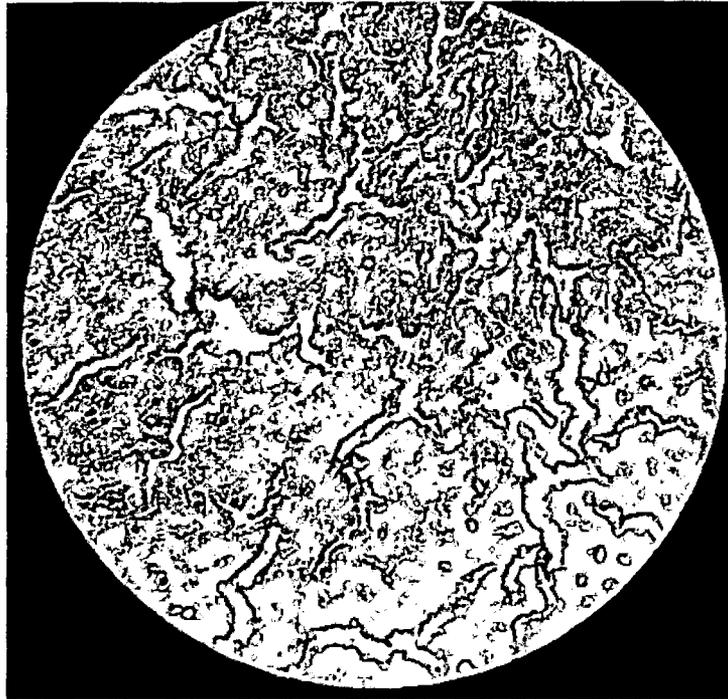
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 30**

Esta foto pertenece a un hígado del grupo control, donde podemos observar una ligera congestión y células sin daño aparente.

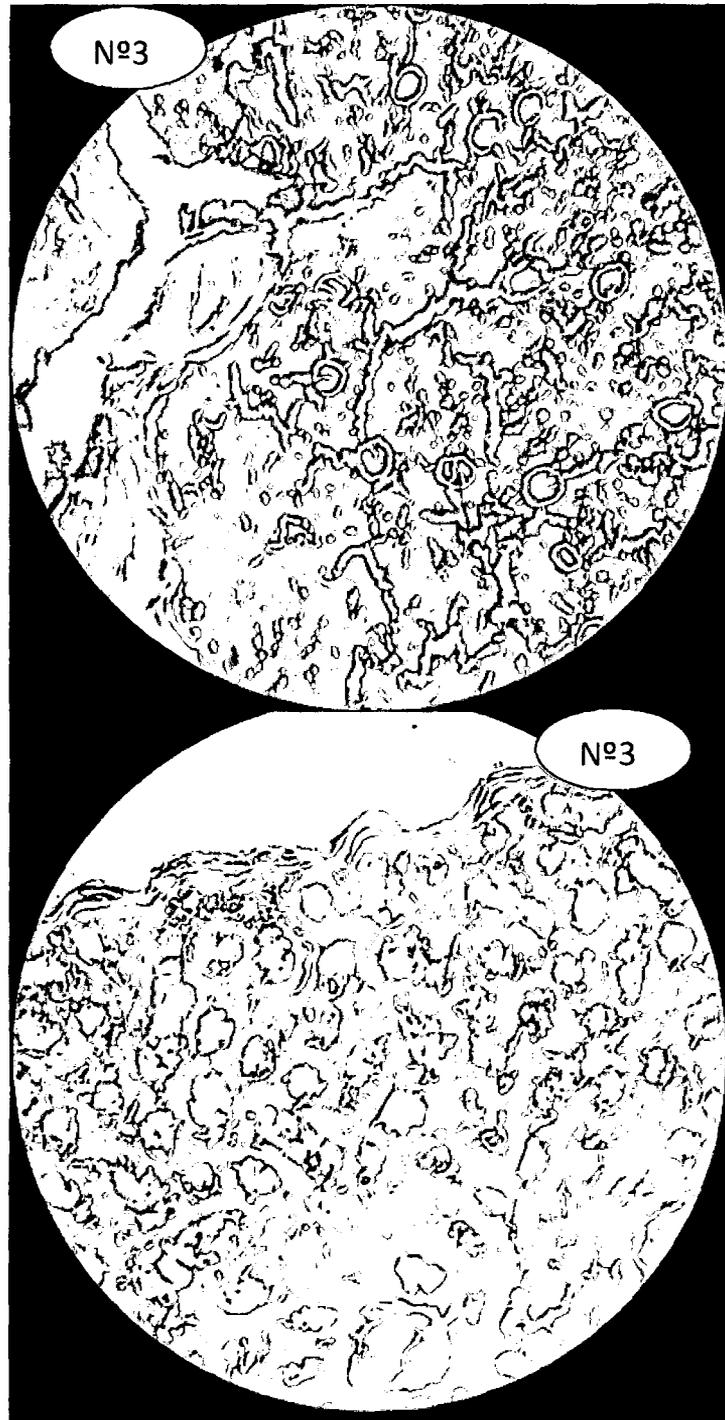
FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 31**

Esta foto pertenece al hígado de uno de los animales de experimentación del grupo G3B que presento hepatocitos reactivos caracterizados por presentar dos núcleos, lo cual indica que las células están en regeneración

FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.



**FOTOGRAFIA N° 32 Y 33**

En la fotografía N° 30 se observa el riñón normal perteneciente al grupo control mientras que en la fotografía N° 31 se observa la necrosis del riñón del grupo G3 B.

FUENTE: J.A.Q.T/D.J.Q.Z.