



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE HOJAS DE *Psidium Guajava L.*  
“GUAYABA” FRENTE A BACTERIAS GRAM POSITIVAS  
(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) Y GRAM  
NEGATIVAS (*Escherichia coli* ATCC 25922)**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO

**AUTORES**

**Bach. LLAMOZA MALDONADO, JESÚS MARÍA**  
<https://orcid.org/0000-0002-6874-1820>

**Bach. MAMANI DE LA CRUZ, GABRIEL**  
<https://orcid.org/0000-0002-2110-8892>

**ASESOR**

**Mg. PINEDA PERÉZ, NEUMAN MARIO**  
<https://orcid.org/0000-0001-6818-7797>

**LIMA - PERÚ**

**2022**

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, JESÚS MARÍA LLAMOZA MALDONADO, con DNI 40770056, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

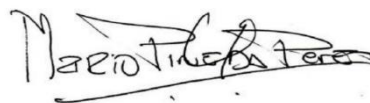
Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>1</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 13 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 08 días del mes de agosto del año 2023.



---

Jesús María Llamozza Maldonado  
40770056



---

Mg. Neuman Mario Pineda Pérez  
09410930

---

<sup>1</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Gabriel Mamani de la Cruz, con DNI 41737288, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

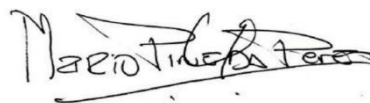
Asimismo, DECLARO BAJO JURAMENTO<sup>2</sup> que dicho documento es ORIGINAL con un porcentaje de similitud de 13 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 08 días del mes de agosto del año 2023.



---

Gabriel Mamani de la Cruz  
41737288



---

Mg. Neuman Mario Pineda Pérez  
09410930

---

<sup>2</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## INFORME FINAL DE TESIS (APROBADO EN SUSTENTAION)

### INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

12%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Maria Auxiliadora SAC Trabajo del estudiante	7%
2	rraae.cedia.edu.ec Fuente de Internet	2%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
4	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1%
6	www.untrm.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	1%

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico a Dios por haber permitido darme las fuerzas, su bendición y a mi amada madre por apoyarme incondicionalmente y seguir adelante cumpliendo mi objetivo.

Jesús María Llamaza Maldonado

Esta tesis la dedicada a Dios, ya que gracias a él he tenido la opción de completar mi vocación, a mi madre, esposa e hijos ya que estuvieron constantemente cerca ofreciéndome su ayuda y guía para hacer de mí un individuo superior, a mis hermanos y sobrinos por sus palabras, a mis compañeros y esa multitud de individuos que de alguna manera se han sumado al cumplimiento de mis objetivos.

Gabriel Mamani de la Cruz

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios expreso mi gratitud quien supo guiarme por buen camino

Agradezco a la Universidad María Auxiliadora por la oportunidad de ser parte y lograr mi objetivo de ser profesional

Al Dr. Pineda Pérez Neuman Mario, por orientarnos y apoyarnos en el desarrollo de la investigación.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b>	07
<b>ABSTRACT</b>	08
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	09
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
II.1 Enfoque y diseño de la investigación	18
II.2 Población, muestra y muestreo	18
II.3 Variables de la investigación	18
II.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	19
II.5 Plan metodológico para la recolección de datos	19
II.6 Procesamiento del análisis estadístico	21
II.7 Aspectos éticos	21
<b>III. RESULTADOS</b>	23
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	31
IV.1 Discusión de resultados	31
IV.2 Conclusiones	34
IV.3 Recomendaciones	35
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	36

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
Tabla 1. Resultados del ensayo de pH	23
Tabla 2. Resultados del ensayo de solubilidad	23
Tabla 3. Resultados del ensayo fitoquímico	24
Tabla 4. Halos de inhibición de ensayo microbiológico en <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	25
Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico	26
Tabla 6. Prueba de normalidad por el test de Shapiro-Wilk	27
Tabla 7. Comparación de medias por el ANOVA	28
Tabla 8. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey	30



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Páginas</b>
ANEXO A. Operacionalización de variables	42
ANEXO B. Técnica e instrumentos de recopilación de datos	43
ANEXO C: Matriz de consistencia	45
ANEXO D: Informe de laboratorio	47
ANEXO E: Certificado taxonómico	48
ANEXO F: Evidencia de campo	49
ANEXO G: Certificado de agar Mueller Hinton	66
ANEXO H: Certificado de análisis de cepa <i>E. coli</i>	70
ANEXO I: Certificado de análisis de cepa <i>S. aureus</i>	72

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*).

**Materiales y métodos:** Investigación de tipo experimental, explicativo, prospectivo y cuantitativo, con una población de 20 arbustos y una muestra vegetal de 2000 gramos de hojas de *Psidium guajava* L. (Guayaba), asimismo se obtuvo de extracto seco de 21.2 g.

**Resultados:** Los metabolitos secundarios que se identificaron en la prueba de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” fueron antraquinonas, compuestos fenólicos, alcaloides, lactonas, taninos, antocianinas, saponinas y flavonoides. Mediante la prueba de ANOVA ( $p < 0,05$ ) y Tukey, se mostró como resultado diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales al 5, 15 y 25% comparado con el control (Etanol 70°) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales al 5, 15 y 25% comparado con el control (Etanol 70°) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Conclusión:** El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” presenta actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y no presenta actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*).

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, *Psidium guajava* L. y *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

**Objective:** to determine the antimicrobial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* L. "Guava" against Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli*).

**Materials and methods:** Experimental, explanatory, prospective and quantitative research, with a population of 20 bushes and a plant sample of 2000 grams of leaves of *Psidium guajava* L. (Guava), also a dry extract of 21.2 g was obtained.

**Results:** The secondary metabolites that were identified in the phytochemical screening test of the ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* L. "Guava" were anthraquinones, phenolic compounds, alkaloids, lactones, tannins, anthocyanins, saponins and flavonoids. Through the test of ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey, the result was a statistically significant difference between the experimental groups at 5, 15 and 25% compared to the control (Ethanol 70°) compared to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. On the other hand, no significant differences were found between the experimental groups at 5, 15 and 25% compared to the control (Ethanol 70°) compared to *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Conclusion:** The ethanolic extract of the leaves of *Psidium guajava* L. "Guava" has antibacterial activity against strains of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and has no antibacterial activity against strains of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*).

**Keywords:** Antimicrobial activity, *Psidium guajava* L. and *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

## I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la resistencia microbiana a nivel mundial, es debido al uso inapropiado e indiscriminado de medicamentos, la prevalencia de microorganismos patógenos y resistentes en humanos es cada vez mayor, por lo que supone un riesgo contra la salud de la población, asimismo se ha observado de diferentes infecciones bacterias como la septicemia, transmisión sexual y diarreas, por lo tanto, presentan altos índices de resistencia frente a los antibióticos a nivel global, como en el caso de la *Escherichia coli* que es una cepa resistente a las fluoroquinolonas y otros antibióticos<sup>1</sup>. Según la OMS la prevalencia anual de diarreas a nivel global se sitúa en 1.500 millones de casos, la cual ha sido calificado que el 70% tiene origen por la ingesta de alimentos contaminados con diferentes tipos de microorganismos<sup>2</sup>. *Staphylococcus aureus* y otras bacterias Gram positivas son causa habitual de infecciones y resistencia bacteriana, pacientes con *Staphylococcus aureus* resistentes frente a metilina muestran un 64% más posibilidad de fallecer en comparación con pacientes con infecciones susceptibles a los medicamentos<sup>1</sup>. En los últimos años, han aparecido numerosos mecanismos de resistencia a los antibióticos tales como modificación de receptores, hidrólisis, eflujo por parte de las bacterias Gram negativas a los betalactámicos (monobactámicos, carbapenémicos, penicilinas y cefalosporinas), reprogramación de la biosíntesis del peptidoglucano por parte de las bacterias Gram positivas hacia los glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina) entre otras<sup>3</sup>. Se estima que en el mundo mueren alrededor de 700.000 personas a consecuencia de la resistencia microbiana, si no se interviene, el número de muertos a nivel mundial por la resistencia microbiana hacia el 2050 será 10 millones de persona por año<sup>4</sup>.

La resistencia microbiana a los fármacos es una amenaza para la salud mundial, el cual afecta a muchas personas, sin embargo el uso indiscriminado de antibióticos en el hombre y los animales, el aumento de trasplantes de órganos, tratamientos con inmunosupresores procedentes de las unidades de terapia intensiva, la falta de política de antibióticos en el uso racional, la prolongación de tratamientos, la falta de normas de higiene epidemiológica en las instituciones de salud, falta de comité de antibióticos, poca actualización del

profesional médico, fenómenos de migración por parte del hombre, influyen en la salud del hombre, contribuyen al fenómeno de la resistencia a los antibióticos. Estos factores descritos ejercen una fuerte influencia en la problemática de la resistencia a los antibióticos, en las instituciones de salud, centros hospitalarios y comunidad<sup>5</sup>. Debemos mencionar que el uso inadecuado de antibióticos suministrados al hombre trae resistencia bacteria, generando su propio mecanismo de defensa, además, los fallos de prescripción causan aproximadamente un fallecido diariamente y perjudican a alrededor de 1,3 millones de individuos anualmente.

La OMS estima que el coste a escala mundial derivado a los defectos en fármacos es de US \$ 42000 millones al año, en promedio casi un 1% del consumo mundial del bienestar<sup>6</sup>. Cada vez es más preocupante los efectos secundarios y la ineficacia que puedan presentar los medicamentos para su uso, por tal razón una de las alternativas es el uso de terapias complementarias o naturales la cual viene aumentando cada año, se calcula aproximadamente que alrededor del 80% la población total utiliza la medicación convencional como alternativa para la atención primaria de salud<sup>7</sup>.

En el Perú, la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina es similar a la de otras regiones <sup>8</sup> y frente a los aminoglucósidos introducida por *Escherichia coli* es de 27,1%<sup>9</sup>. En la región Madre de Dios no existe mucha investigación del uso terapéutico de la guayaba.

La actividad antimicrobiana de un compuesto es la capacidad de impedir la multiplicación de las bacterias<sup>10</sup>, así mismo los antimicrobianos son sustancias sintéticas o naturales el cual son utilizados con fines terapéuticos para tratar diferentes enfermedades infecciosas originadas por microorganismos patógenos<sup>11</sup>, puede ser demostrada por efecto inhibitorio de una sustancia en cuestión cuando se evalúa frente a un patógeno (formación de halos de inhibición), para evaluar una sustancia o compuesto químico que presente propiedades antimicrobianas, se han descrito pruebas estandarizadas que determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a un compuesto o sustancia, entre los diferentes métodos más sobresalientes tenemos al método de dilución y el método de difusión<sup>12</sup>, las especies vegetales con actividad

antimicrobiana se deben principalmente por la existencia de diversos contenidos de metabolitos secundarios fenólicos<sup>13</sup>, la extracción de compuestos se basa a partir de material vegetal triturado como hojas, corteza, tallos, raíz, semillas o frutos sometidos con solventes orgánicos, vapor de agua, mezclas de agua y disolventes orgánicos con la finalidad de obtener diversos compuestos químicos<sup>14</sup>.

El extracto etanólico es un compuesto adquirido mediante sustancias triturada, seca y sin refinar de origen vegetal cuya técnica de extracción se da a través de un proceso de maceración la cual tiene contacto con un disolvente como el etanol, seguido de la eliminación de dicho disolvente por un proceso físico, la cual se realiza a temperatura ambiente con agitaciones esporádicas<sup>15</sup>. En las plantas y frutas se pueden encontrar muchos compuestos antioxidantes el cual se incluyen los compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas y tocoferoles, aproximadamente solo el 20% de las plantas han sido utilizados en estudios farmacéuticos impactando en el sistema de salud de manera positiva para el tratamiento de diversas enfermedades<sup>16</sup>.

La Guayaba (*Psidium guajava L.*) Es un arbusto perdurable, pertenece a la familia de las mirtáceas, se caracteriza por tener una estatura variable entre 3 a 10 metros que llena los lugares tropicales, tradicionalmente se aplica para el tratamiento de diversas enfermedades como úlceras, heridas en la piel, lesiones, diarreas, obesidad, cólera entre otros, se ha informado que el concentrado de la hoja de guayaba posee actividad quelante, antioxidante, antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas<sup>17</sup>. Las bacterias son organismos unicelulares el cual la tinción de Gram proporciona un sistema de clasificación en bacterias Gram positivas y Gram negativas, estas diferencias le confieren diferentes propiedades a la célula<sup>18</sup>.

Yahaya A. et al (2019) determinaron el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos y etanólicos de *Psidium guajava L.* frente a *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana se realizó por el método de disco de difusión (Técnica de Kirby-Bauer). Los resultados del extracto acuoso a concentración de 200 mg/dl, mostraron una zona de inhibición (halo) con un promedio de 16.3mm, los resultados del extracto etanólico a la misma concentración revelo un área de

23.3 mm, mientras que la zona más baja a una composición de 50 mg/ml del concentrado acuoso y etanólico fue en promedio de 10.6 mg/ml y 11.3 mg/ml respectivamente. Se concluye que las hojas contienen compuestos bioactivos ricos en flavonoides, antraquinonas, aminoácidos, taninos, alcaloides y compuestos fenólicos la cual sugieren que esta puede ser usado como una alternativa como agente quimioterapéutico<sup>19</sup>.

Ortega J. et al (2018) Evaluaron el efecto antimicrobiano de las sustancias alcohólicas de las hojas de *Psidium guajava* (Guayaba). El proceso de maceración de las hojas duro 15 días y el solvente extractivo utilizado fue etanol al 70%. Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico evidenciaron la existencia de taninos, flavonoides, glucósidos y en menor proporción cumarinas. Para establecer el valor antimicrobiano de la sustancia alcohólica fue necesario utilizar una cepa controlada de *Staphylococcus aureus* con designación ATCC 6538; con el método difusión en disco (Técnica de Kirby-Bauer), se hicieron preparaciones de 5 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml donde se encontró que la preparación de 20 mg/ml formo un radio de inhibición de mayor diámetro en promedio de 12.5 mm considerando una sensibilidad intermedia, sin embargo, a una preparación de 5 mg/ml el diámetro de inhibición fue de 10.51 mm el cual se consideró como resistente. Finalmente se concluye que la sustancia alcohólica de guayaba expresa efecto inhibitorio en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 <sup>20</sup>.

Ara J. et al (2017) Determinaron la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. frente a cinco patógenos transmitidos por alimento como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhi*. Se empleó el método de disco de difusión (Técnica de Kirby-Bauer) para realizar la acción antibacteriana de cuatro concentraciones diferentes al 10%, 50%, 75% y 100%. Los resultados mostraron que microorganismos como *Staphylococcus aureus* a una preparación de 100% tuvo una zona de inhibición promedio de 12.67 mm, mientras que a una preparación del 50% se formó un halo de inhibición estándar de 9.33 mm, a diferencia con *Escherichia coli* quien formó un halo de inhibición promedio de 13.5 al 100%, mientras que al 50% formo un halo promedio de 10.17 mm. Se concluye que la preparación al 10% no se mostró actividad antibacteriana, sin

embargo, las preparaciones elevadas de extractos de *Psidium guajava L.* mostraron capacidad de inhibir el crecimiento evidenciando actividad antibacteriana<sup>21</sup>

Escobar A. et al (2019) Determinaron la acción antimicrobiana del extracto de hojas de *Psidium guajava L.* (Guayaba) frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Cándida albicans* ATCC 10231. Se utilizó el método de dilución en discos con concentraciones de hojas de *Psidium guajava L.* Los resultados demostraron que la cepa ATCC de *Escherichia coli*, fue resistente a todas las concentraciones utilizadas presentando un halo de inhibición entre 7.6 a 13,4 mm. La cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* fue sensible a la preparación al 100% presentando un halo de inhibición de 22.5 mm, la cepa ATCC de *Cándida albicans* fue sensible a la preparación al 100% presentando un halo de 19.6 mm. La concentración de 60 y 80% tiene una sensibilidad intermedia con halos de inmunidad de 16.4 y 17.5 mm. Como medicamento de control se utilizó la ciprofloxacina el cual alcanzo un halo de 47.00 mm para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se concluye que las concentraciones menores no presentan actividad antimicrobiana<sup>22</sup>

Cruz H. et al (2018) realizaron un estudio in vitro para establecer si la concentración alcohólica de las hojas de *Psidium guajava L.* (Guayaba) posee acción antibacteriana, sobre Lactobacilos y Estreptococos Mutans. Se empleó el método socavado, la preparación al 42mg/ml 105mg/ml, 210mg/ml, 315mg/ml, 420mg/ml, presentó un halo inhibitor de 10.6mm al 12.5mm con un porcentual de eficacia al 100%. Se concluye que la clindamicina 2ug utilizado como control se evidencio que no hay diferencia significativa entre el grupo experimental y control sobre estas cepas<sup>23</sup>.

Villanueva G. (2019) determinaron la acción antibacteriana in vitro en distintas concentraciones del extracto alcohólico de la Guayaba (*Psidium guajava L.*) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923 mediante la técnica Kirby Bauer (disco de difusión), el proceso de maceración fue por una semana, luego a partir de ahí se prepararon concentraciones de 420 mg/ml, 315 mg/ml, 210 mg/ml, 105 mg/ml, y 42 mg/ml, los resultados evidenciaron que a una



concentración de 42 mg/ml formo un halo estándar de 10.6 mm, sin embargo a una preparación de 420 mg/ml generó un halo estándar 12.5 mm, el cual según la escala de Duraffourd evidencia sensibilidad a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se estableció que la inhibitoria de base (CMI) del concentrado alcohólico de la guayaba en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 42 mg/ml mediante absorbancia, sin embargo, el foco bactericida de base (CMB) del extracto alcohólico fue de 420 mg/ml existiendo efecto bactericida. Se concluye que el concentrado alcohólico de la Guayaba posee impacto antibacterial en la mejora del *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 <sup>24</sup>

El presente estudio se justifica en el aspecto teórico, ya que aportará información científica actualizada sobre la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Escherichia coli*).

En el ámbito práctico los resultados de este estudio servirán para que la industria farmacéutica pueda proponer la elaboración de fármacos naturales para mitigar estas infecciones que afecta a nivel de la salud pública.

En el ámbito metodológico se utilizará el método de difusión por agar siendo una técnica validada y estandarizada para el estudio de propiedades antibacterianas de productos naturales.

El objetivo general de la presente investigación es determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922).

La hipótesis general es:

El extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Enfoque y diseño de la investigación

Por existir una relación de asociación entre las variables, este estudio tiene carácter analítico y cuantitativo, además es transversal prospectivo, ya que la medición de la variable independiente se realizó en un momento determinado.

El método empleado es el deductivo, ya que permitió deducir conclusiones lógicas a partir de hipótesis, yendo de lo general a lo particular<sup>26</sup>.

El diseño de la investigación fue experimental porque el investigador controló y manipuló la variable independiente. Las muestras designadas en el estudio fueron en forma aleatoria y luego se efectuó una medición con la variable respectiva<sup>27</sup>.

### II.2. Población, muestra y muestreo

La población de estudio estuvo comprendida por 20 arbustos de *Psidium guajava* L. (Guayaba) en diferente estado fenológico localizado en el eje carretero vía interoceánica de Perú - Brasil del Departamento Madre De Dios, provincia Tambopata, Distrito Tambopata.

La muestra vegetal estuvo constituida por 2000 gramos de hojas, las muestras biológicas fueron cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, obtenidas de laboratorios Microbiológicas.

El tipo de muestreo fue probabilístico el cual se usó el método de selección aleatorio, se seleccionaron al azar un pequeño grupo de plantas de una gran población existente de *Psidium guajava* L. (Guayaba), para recolecta de la muestra se consideró los siguientes criterios de exclusión (hojas de mal estado, deformes, contaminados por insectos y hongos) y criterios de inclusión (hojas de buen estado y exclusivos de la Región Madre de Dios en el eje carretero).

### II.3. Variables de investigación

**Variable independiente:** Extracto etanólico de *Psidium guajava* L.

Compuesto químico obtenido a través de un proceso de maceración, posterior filtrado y dilución de la planta *Psidium guajava* L. (Guayaba)

**Variable dependiente:** Actividad antimicrobiana.

Capacidad de un antibiótico o sustancia para inhibir el crecimiento de una cepa microbiana.

#### **II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos**

La técnica para la obtención del concentrado etanólico de *Psidium guajava* L. (Guayaba) fue por maceración, la cual consistió en colocar las hojas seleccionadas, luego fueron lavadas, secadas y trituradas en un frasco de boca utilizando etanol como solvente. Se utilizó la técnica de coloración y precipitación para identificar diferentes compuestos fenólicos presentes en la muestra según su fitoquímica de Olga Lock de Ugaz<sup>28-29</sup>; los datos fueron registrados en el formato A. Para determinar el efecto antimicrobiano se utilizó el método de difusión en agar (Kirby Bauer)<sup>30</sup> y los datos fueron registrados en el formato B.

#### **II.5. Plan metodológico para la recolección de datos**

En primer lugar, la muestra vegetal estuvo conformada por hojas de *Psidium guajava* L. (Guayaba) el cual fueron recolectados vía carretera interoceánica Perú – Brasil del Departamento Madre de Dios, luego se conservaron en condiciones óptimas y se llevó al Laboratorio biológico y análisis clínico Santa Rosa EIRL, en ese lugar se realizó la selección de las muestras conservadas.

Las hojas verdes que no presenten daño, fueron seleccionadas y lavadas con abundante agua y se desinfectaron con hipoclorito de sodio; posteriormente se purgó mediante agua destilada y se dejó a escurrir durante 3 horas.

Luego se procedió a realizar el secado, este proceso consistió en eliminar gran parte de agua de la muestra, esto se realizó debido a que la existencia de agua es el primordial causante de la alteración de la planta recolectada. En el momento en que disminuye la cantidad de agua en hojas, los catalizadores frenan su movimiento quedando retenidos y la planta queda protegida,

trabajando con el ciclo de extracción. Posteriormente la muestra fue distribuida sobre bandejas de papel Kraft el cual fue secado por 24 horas empleando una estufa con aire recirculante a una temperatura de 40°C, pasado ese tiempo las hojas fueron sometidas a trituración manual y mecánica.

Para la preparación del concentrado etanólico de *Psidium guajava* L. (Guayaba) se empleó el método de maceración, el cual una vez triturada la muestra, se introdujo en un recipiente que presente boca ancha y presente tapa hermético, luego se agregó el disolvente el cual se tapó y agitó vigorosamente, posteriormente se dejó por 10 días con agitaciones esporádicas, pasado ese tiempo el contenido fue filtrado, acondicionado en una bandeja plana y colocado en una estufa a 45°C para la evaporación del solvente y obtener el extracto seco. Una vez obtenida el extracto seco se realizaron preparaciones de 50 mg/ml, 150 mg/ml y 250 mg/ml para los ensayos respectivos.

Para la identificación de metabolitos secundarios, se desarrolló una cromatografía de papel y posteriormente un tamizaje fitoquímico. Una pequeña alícuota del extracto fue sometido a la acción de los reactivos de color y precipitación con la finalidad de identificar flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas, terpenos entre otros.

Para identificar el efecto antimicrobiano se usó el método de difusión en agar (Kirby Bauer), primero se preparó el medio de cultivo Mueller Hinton siguiendo las especificaciones de fabricación, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos, luego se plaqueó en placas Petri asépticas el cual se dejó enfriar y solidificar, luego se refrigeró para su posterior uso. Luego se reactivaron las cepas bacterianas *Escherichia coli* en agar MacConkey y *Staphylococcus aureus* en agar base, los inoculo se prepararon con la ayuda de asa Kohle el cual se tomó 3 a 5 colonias de cada cepa y fueron depositadas en un recipiente de ensayo que contenga aproximadamente 5 ml de solución salina asépticas, homogenizada hasta alcanzar la turbidez según la escala de MC Farland que es equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, una vez preparado el inoculo se procedió a sembrar en placas Petri por extenuación en estría con el apoyo de una torunda aséptica de algodón en toda la interfaz del agar, a continuación este se dejó secar por 4 a 6 minutos, los discos de susceptibilidad

fueron elaborados con papel filtro Whatman N°5, con la ayuda de una micropipeta se impregnarán 20 ul de las concentraciones a estudiar del extracto, luego se impregnaron en las placas Petri, luego fueron llevados a incubación por 24 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo se constató la presencia de halos de inhibición.

Para la preparación de los discos se emplearon discos de papel whatman N° 5 de 6 mm de diámetro previamente estériles.

Cada uno de los discos fue embebido con 20 uL de muestra de la siguiente manera:

- Discos embebidos con extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* l. 25%
- Discos embebidos con extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* l. 15%
- Discos embebidos con extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* l. 5%
- Discos embebidos con alcohol de 70°
- Discos de Vancomicina de 30 ug.
- Discos de Ciprofloxacino 5 ug

Según el disco de susceptibilidad antimicrobiana establecidos por la empresa que distribuye fármacos en discos en microgramos (ug) para investigaciones.

Posteriormente los discos fueron puestos sobre la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado con las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Luego las placas se incubaron durante 24 horas en posición invertida a 37°C dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos.

Finalmente, en la interpretación de resultados: La lectura de los halos de inhibición se realizó con ayuda de un vernier.

## **II.6. Procesamiento del análisis estadístico**

Respecto al desarrollo de los datos se usó una estadística descriptiva en la cual la información recolectada se procesó en una hoja de cálculos Excel, se presentaron cuadros de distribución frecuencial, medidas de dispersión, desviación estándar y análisis de varianza. En las comparativas con múltiples entre los tratamientos se utilizó la prueba estadística Anova y Tukey. Ambas pruebas con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ).

## **II.7. Aspectos éticos**

La presente tesis es de tipo experimental, todos los resultados hallados y demostrados en este estudio son absolutamente verdaderos, los investigadores aplicaron los altos valores de la ética y las buenas prácticas de investigación. La matriz de resultados puede ser solicitada en cualquier momento por las autoridades de la universidad y podrán ser revisadas si así lo requiere por los diferentes asesores que participan en el programa.

Los investigadores se responsabilizan de alguna información que no sea cierta en su trabajo de investigación, asimismo, las diferentes fuentes bibliográficas consultadas fueron citadas de manera correcta para reconocer el aporte de los otros investigadores y no menoscabar sus trabajos o quitarles autoría.

### III. RESULTADOS

Los análisis realizados en el presente estudio son:

#### III.1. Análisis de pH

Tabla 1. Resultados del ensayo de pH

N°	ANALISIS	RESULTADO
1	pH	6.0

Los resultados de pH muestran 6.0 para el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba".

#### III.2. Prueba de Solubilidad

Tabla 2. Resultados del ensayo de solubilidad

N°	SOLVENTE USADO	RESULTADO
1	Diclorometano	+
2	Butanol	+
3	Metanol	++
4	Éter de petróleo	-
5	Etanol 96	+
6	Agua destilada	+
7	Cloroformo	+
8	Etanol 70	+++

- (Insoluble); + (Poco soluble); ++ (Medianamente soluble); +++ (Muy soluble)

El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" fue muy soluble en etanol 70°, medianamente soluble en metanol y poco soluble en disolventes orgánicos apolares como el diclorometano, cloroformo y alcohólicos como el butanol y el etanol 96°.

### III.3. Tamizaje fitoquímico

Tabla 3. Resultados del ensayo fitoquímico para identificar metabolitos secundarios

N°	REACTIVOS	METABOLITO	RESULTADO
1	Gelatina	Taninos	+++
2	Espuma	Saponinas	+++
3	Wagner	Alcaloides	+++
4	Dragendorff	Alcaloides	+++
5	Baljet	Lactonas $\alpha$ , $\beta$ -insaturadas	+++
6	Borntrager	Antraquinonas	+
7	NaOH 10%	Antocianinas	+
8	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	+
9	Gelatina-sal	Taninos	+++
10	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
11	Shinoda	Flavonoides	+++
12	Mayer	Alcaloides	++

(-): Ausencia; (+): Mínima; (++) : Mediana (+++) : Abundante presencia

En la tabla 3 se puede observar que en las pruebas de Dragendorff, Wagner, Baljet, Cloruro férrico, Gelatina, Fehling A y B, Espuma, Shinoda las identificaciones fueron positivas, hallándose lo siguiente: alcaloides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas y compuestos fenólicos, taninos, saponinas y flavonoides.



### III.4. Ensayo microbiológico

Tabla 4. Halos de inhibición de ensayo microbiológico en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	5%	15%	25%	Vancomicina 30ug	Etanol 70°
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,67	11,72	13,16	20,25	6
	9,66	11,70	13,18	20,21	6
	9,69	11,71	13,19	20,20	6
	9,70	11,74	13,23	20,21	6
	9,67	11,72	13,24	20,20	6
<b>Media</b>	<b>9,67</b>	<b>11,72</b>	<b>13,20</b>	<b>20,21</b>	<b>6</b>
Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	5%	15%	25%	Ciprofloxacino 5 ug	Etanol 70°
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	6	6	41,25	6
	6	6	6	41,24	6
	6	6	6	41,16	6
	6	6	6	41,21	6
	6	6	6	41,23	6
<b>Media</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>41,21</b>	<b>6</b>

Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición.  
Concentración del inóculo:  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL

En la tabla 4 se evidencia los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto hace evidencia que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo vancomicina con 20,21 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, el grupo experimental al 25 % evidenció un halo de inhibición medio de 13,20 mm, seguido de los extractos al 15 y 5% con halos de inhibición medios de 11,72; y 9,67 mm.

Por otro lado, el ensayo frente a *Escherichia coli* evidenció que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo ciprofloxacino con 41,21 mm frente a *Escherichia coli*. Sin embargo, los grupos experimentales al 25 %, 15 % y 5 % indicaron halos de inhibición medios de 6.00 mm, para todos los grupos experimentales.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico

<b>Descriptivos</b>			
			<b>Estadístico</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Media		<b>12,1620</b>
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	<b>10,1837</b>
		Límite superior	<b>14,1403</b>
	Media recortada al 5%		<b>12,0554</b>
	Mediana		<b>11,7200</b>
	Varianza		<b>22,969</b>
	Desv. Estandar		<b>4,79260</b>
	Mínimo		<b>6,00</b>
	Máximo		<b>20,25</b>
	Rango		<b>14,25</b>
	Rango intercuartil		<b>3,57</b>
	Asimetría		<b>,563</b>
	Curtosis		<b>-,531</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Media		<b>13,0436</b>
	95% de intervalo de	Límite inferior	<b>7,1088</b>
		Límite superior	<b>18,9784</b>

	confianza para la media		
	Media recortada al 5%		<b>11,8680</b>
	Mediana		<b>6,0000</b>
	Varianza		<b>206,718</b>
	Desv. Estandar		<b>14,37770</b>
	Mínimo		<b>6,00</b>
	Máximo		<b>41,25</b>
	Rango		<b>35,25</b>
	Rango intercuartil		<b>,00</b>
	Asimetría		<b>1,597</b>
	<b>Curtosis</b>		<b>,593</b>

En la tabla 5 se evidencia la estadística descriptiva con 95% de intervalo de confianza para las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) correspondientemente.

Para determinar la docimasia de las hipótesis planteadas es indispensable saber si la distribución de los resultados del ensayo microbiológico in vitro es normal o no, para esto se usó la prueba estadística de Shapiro-Wilk ubicada en la tabla 6.

Tabla 6. Prueba de normalidad por el test de Shapiro-Wilk

<b>Pruebas de normalidad</b>			
	<b>Shapiro-Wilk</b>		
	Estadístico	gl	<b>Sig.</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	,866	25	<b>,004</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	,494	25	<b>,000</b>
<b>a. Corrección de significación de Lilliefors</b>			

La tabla 6 evidencia que el valor de la significancia asintótica bilateral es menor al 0.05 ( $p < 0,05$ ) según el test de Shapiro-Wilk para los resultados del ensayo

microbiológico in vitro. Esto es evidencia de que no existe distribución normal en los resultados.

Tabla 7. Comparación de medias por el ANOVA.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Entre grupos	4961,230	4	1240,308	4883100,488	<b>,000</b>
	Dentro de grupos	,005	20	,000		
	<b>Total</b>	<b>4961,235</b>	<b>24</b>			
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Entre grupos	551,249	4	137,812	332879,783	<b>,000</b>
	Dentro de grupos	,008	20	,000		
	<b>Total</b>	<b>551,257</b>	<b>24</b>			

Ya que no se evidenció distribución normal de los resultados, se ejecutó un estadístico inferencial para determinar diferencia de medias mediante el análisis de varianzas (ANOVA). La tabla 7 muestra un valor de significancia asintótica bilateral menor al 0.05 para los resultados del ensayo microbiológico in vitro con las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición medio de todos los grupos en el ensayo microbiológico según el estadístico ANOVA.

Para determinar si existen diferencias entre los halos de inhibición medio entre los grupos mediante múltiples comparaciones se utilizó el estadístico de Tukey. La tabla 8 muestra que los valores de significancia asintótica bilateral son mayores al 0.05 en las comparaciones entre los grupos al 5, 15 y 25 % frente al grupo control (Etanol 70°) en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Escherichia coli*. Esto es evidencia de que no existe discrepancia estadísticamente significativa entre los grupos de experimentación y el control. Sin embargo, se evidencia una divergencia significativamente importante entre el grupo Ciprofloxacino y los grupos experimentales que favorece al grupo Ciprofloxacino. Esto es evidencia de que los grupos experimentales al 5, 15 y 25 % no presentan efecto inhibitor del crecimiento de la cepa *Escherichia coli*.

Por otro lado, los valores de la significancia asintótica bilateral son menores al 0.05 en las comparaciones entre los grupos al 5, 15 y 25 % frente al grupo control (Etanol 70°) y grupo Vancomicina en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*. Esto es evidencia de que si existe divergencia significativamente importante entre los grupos experimentales y el control. Sin embargo, se evidencia una discrepancia significativamente importante entre el grupo Vancomicina y los grupos experimentales que favorece al grupo Vancomicina. Esto es evidencia de que los grupos experimentales al 5, 15 y 25 % si presentan efecto inhibidor del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus*.

Tabla 8. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey							
	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Etanol 70°	Ciprofloxacino 5 ug	-35,21800*	,01008	,000	-35,2482	-35,1878
		Ext. 5 %	,00000	,01008	1,000	-,0302	,0302
		Ext. 15 %	,00000	,01008	1,000	-,0302	,0302
		Ext. 25 %	,00000	,01008	1,000	-,0302	,0302
	Ciprofloxacino 5 ug	Etanol 70°	35,21800*	,01008	,000	35,1878	35,2482
		Ext. 5 %	35,21800*	,01008	,000	35,1878	35,2482
		Ext. 15 %	35,21800*	,01008	,000	35,1878	35,2482
		Ext. 25 %	35,21800*	,01008	,000	35,1878	35,2482
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Etanol 70°	Vancomicina 30 ug	-14,21400*	,01287	,000	-14,2525	-14,1755
		Ext. 5 %	-3,67800*	,01287	,000	-3,7165	-3,6395
		Ext. 15 %	-5,71800*	,01287	,000	-5,7565	-5,6795
		Ext. 25 %	-7,20000*	,01287	,000	-7,2385	-7,1615
	Vancomicina 30 ug	Etanol 70°	14,21400*	,01287	,000	14,1755	14,2525
		Ext. 5 %	10,53600*	,01287	,000	10,4975	10,5745
		Ext. 15 %	8,49600*	,01287	,000	8,4575	8,5345
		Ext. 25 %	7,01400*	,01287	,000	6,9755	7,0525

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## IV. DISCUSION

### IV.1. Discusión de resultado

En el presente estudio del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava L.* “Guayaba” frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*), el primer ensayo fue la prueba de solubilidad, en los resultados mostraron que el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava L.* “Guayaba”, fue muy soluble en etanol 70°, medianamente soluble en metanol y poco soluble en disolventes orgánicos apolares como el diclorometano, cloroformo y alcohólicos como el butanol y el etanol 96°. Esto es evidencia de la afinidad que posee el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava L.* “Guayaba” por el solvente alcohólico al 70°; y en cuanto al ensayo del tamizaje fitoquímico fueron los alcaloides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas y compuestos fenólicos, taninos, saponinas y flavonoides los principales metabolitos con mayor presencia, empleando el método según Olga Lock<sup>25</sup>, esto es evidencia de las posibles acciones microbiológicas que posee esta planta frente a las cepas antibacterianas.

Los resultados del estudio fitoquímico de la presente investigación coinciden con el de Yahaya A. *et al* (2019) el cual realizaron el estudio con los extractos acuosos y etanólicos de *Psidium guajava L.* con fines microbiológicos el cual identificaron algunos compuestos bioactivos que incluyen; Alcaloides, Flavonoides, Antraquinonas, Aminoácidos, Saponinas, Taninos, Glucósido y Compuesto Fenólico. Sin embargo, a pesar de ser provenientes de diferentes lugares como de la vía carretera interoceánica Perú – Brasil del Departamento Madre de Dios la especie vegetal de la presente investigación, esto coincide con la de Yahaya A. *et al*; el cual es originario de la ciudad de Kano en Nigeria<sup>19</sup>

De igual importancia coincide con el estudio de Ortega J. *et al* (2018) en cual, a través del tamizaje fitoquímico de las hojas de guayaba, identificaron la presencia de compuestos fenólicos que son relacionados de la actividad antibacteriana. Cabe destacar que las plantas fueron recolectadas en la ciudad de Guayaquil en Ecuador a diferencia del presente estudio que fue proveniente de Perú<sup>20</sup>

Por otro lado, difiere de los resultados del estudio de Ccosco y Zavaleta (2020) el cual realizaron la marcha fitoquímica del extracto etanólico de las semillas de *Psidium guajava* L. (Guayaba) el cual presentaron como resultados la presencia de taninos, triterpenos, Aminoácidos y Esteroides<sup>31</sup>

Finalmente, coincide con los resultados de la investigación de Apaza y Carhuapoma (2021) quienes realizaron el estudio fitoquímico del extracto etanólico de la pulpa fresca de *Psidium guajava* L, el cual presentaron compuestos fenólicos, antocianinas, taninos, alcaloides, azúcares reductores, flavonoides, triterpenos, éster, lactona  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados, carbohidratos<sup>32</sup>

Los estudios realizados con *Psidium guajava* L. (Guayaba) coinciden en su mayoría sobre la composición fitoquímica de los metabolitos secundarios, a pesar de tener orígenes diferentes, por otro lado, se asemejan en su composición fitoquímica en los ensayos realizados en hojas, semillas y frutos, esto trae como consecuencia favorable el uso integral de esta planta para fines medicinales en la salud de la población que lo consuma.

El ensayo microbiológico in vitro para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" a las concentraciones de 5%, 15% y 25% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, evidenció que el extracto al 25% generó un halo de inhibición medio de 13,20 mm, seguido de los extractos al 5% y 15% con halos de inhibición medios de 9,67 y 11,72 mm. Respectivamente. Además, se evidenció que los 3 grupos experimentales presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) por las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. Por lo tanto, según la escala de Duraffourd esta cepa bacteriana tiene una sensibilidad límite para los 3 extractos.

De igual importancia coincide con la investigación de Villanueva G. (2019) sobre la acción antimicrobiana in vitro del extracto alcohólico de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus*, evidenciaron que en base a la escala de Duraffourd se obtiene que la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue sensible en todas las concentraciones del extracto alcohólico, siendo la menor utilizada de 42mg/ml la Mínima Inhibitoria (CMI). A pesar de proceder de



diferentes lugares de recolección de la muestra, poseen resultados muy similares respecto a la actividad antibacteriana<sup>24</sup>

De la misma manera coincide con el estudio de Ccosco y Zavaleta (2020) quienes emplearon el método de Kirby-Bauer, el cual evidenciaron que se considera que no hubo actividad antibacteriana ya que tiene una sensibilidad igual que el control (alcohol de 96%). Cabe destacar que el estudio de Ccosco y Zavaleta fueron con las semillas de Guayaba y el presente estudio con las hojas, por lo tanto, hay una diferencia respecto a que en las semillas existe actividad antibacteriana a concentraciones mayores y con las hojas se evidencia actividad a partir de concentraciones menores, esto sería debido a que existe mayor concentración de metabolitos en las hojas a diferencia de las semillas de guayaba<sup>31</sup>

Por otro lado, el ensayo microbiológico in vitro para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" a las concentraciones de 5%, 15% y 25% frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, evidenció que el extracto al 5%, 15% y 25% generaron un halo de inhibición medio de 6,00 mm. Además, se evidenció que los 3 grupos experimentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) a través de las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. Por lo tanto, según la escala de Duraffourd esta cepa bacteriana tiene una sensibilidad nula para los 3 extractos.

De igual importancia coincide con el estudio de Ara. J. et al (2017) quienes determinaron la actividad antimicrobiana contra cinco patógenos transmitidos por los alimentos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (BTCC 19), *Shigella sonnei* (BTCC) y *Salmonella typhi* (BTCC 197) utilizando el método de difusión en disco en cuatro concentraciones diferentes: 10%, 50%, 75% y 100%, los extractos de guayaba mostraron una mayor actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas en comparación con las bacterias Gram negativas, ninguno de los extractos (10%) mostró actividad antibacteriana frente a estos patógenos<sup>21</sup>

De la misma manera coincide con el estudio de Escobar A. et al (2019) quienes determinaron el efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. (Guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC

25922 y *Cándida albicans* ATCC 10231, demostrando que la cepa ATCC de *Escherichia coli*, fue resistente a todas las concentraciones utilizadas en el ensayo, evidenciando que no existe diferencias significativas en el estudio realizado ( $p > 0.05$ )<sup>22</sup>

Finalmente coincide con el estudio de García y Ángeles (2020) quienes encontraron que los extractos de las plantas medicinales como: *Aloysia citriodora* “cedrón”, *Psidium guajava* “guayaba”, *Plantago major* “llantén”, *Taraxacum officinale* “diente de león” son negativas para *Escherichia coli* sin embargo inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, donde se observó un efecto positivo, evidenciándose halos de inhibición, siendo el mayor (23.3 mm) con *Aloysia citriodora* y el menor (9 mm) con *Matricaria chamomilla*<sup>33</sup>

Esto se interpreta que el uso como antibacteriano de origen natural de *Psidium guajava* L. (Guayaba) es principalmente frente a infecciones por bacterias Gram positivas y que existen escasos estudios que indiquen el uso efectivo frente a infecciones por bacterias Gram negativas, demostrando que es una alternativa natural en el tratamiento de algunos procesos infecciosos que aquejen a la comunidad peruana.

## IV.2. Conclusiones

1. El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” presenta actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y no presenta actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*).
2. Los metabolitos secundarios que se identificaron en la prueba de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” fueron antraquinonas, compuestos fenólicos, alcaloides, lactonas, taninos, antocianinas, saponinas y flavonoides.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” al 5, 15 y 25% no poseen efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

4. El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" al 5, 15 y 25% si poseen efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
5. El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" al 5, 15 y 25% no superan el efecto inhibidor de la vancomicina frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
6. El extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" al 5, 15 y 25% no superan el efecto inhibidor del ciprofloxacino frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

### **IV.3. Recomendaciones**

- Realizar investigaciones con el extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" frente a otros microorganismos que ocasionan diferentes infecciones.
- Realizar investigaciones en el ámbito microbiológico con las semillas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" para comprobar la utilidad integral de su actividad antibacteriana.
- Comparar la potencia antibacteriana de las hojas de *Psidium guajava* L. "Guayaba" de diferentes lugares de procedencia
- Fomentar el uso tradicional de *Psidium guajava* L. "Guayaba" como coadyuvante en infecciones cutáneas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS: Organización Mundial de la salud [Internet]. Suiza: OMS; Resistencia a los antimicrobianos. 2021 [citado el 10 de agosto 2021] disponible en:  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#>
2. OPS: Organización Panamericana de la salud [Internet]. Argentina:OPS c2018. (Citado el 10 de agosto 2021) disponible en:  
[https://www.paho.org/arg/dmdocuments/publicaciones/OPSARG\\_folletoRAM2019Final.pdf%0D](https://www.paho.org/arg/dmdocuments/publicaciones/OPSARG_folletoRAM2019Final.pdf%0D)
3. Serra A. Resistencia microbiana. Un problema de salud a nivel mundial. [Internet]. 2017 Apr [citado el 10 de agosto 2021]; 16 (3): 310-311. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729519X2017000300001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2017000300001&lng=es).
4. OMS: Organización mundial de la salud [Internet]. Ginebra: OMS; c2017 [Citado el 11 de agosto 2021]. Disponible en:  
<https://www.who.int/es/news/item/29-03-2017-who-launches-global-effort-to-halve-medication-related-errors-in-5-years>
5. MINSA: Ministerio de salud. Boletín Epidemiológico del Perú [Internet]. Perú: MINSA; c2018 (Citado el 11 de agosto 2021) Disponible en:  
<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/52.pdf>
6. González J. Maguiña C. González F. La resistencia a los antibióticos [Internet]. 2019 Apr [Citado el 11 de agosto 2021]: 36 (2): 145-151. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172859172019000200011&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172859172019000200011&lng=es).
7. Maldonado C. Paniagua N. Bussmann R. Zenteno F. Fuentes A. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19) [Internet]. 2020

[citado el 11 de agosto del 2021]; 55 (1): 1-5. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S160525282020000100001&lng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160525282020000100001&lng=es)

8. MINSA: Ministerio de Salud del Perú. Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Perú: MINSA; c2017 [Citado el 12 de agosto 2021] Disponible en:<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf>.
9. Miranda J. Pinto J. Faustino M. Sánchez B. Ramírez F. Resistencia antimicrobiana de uropatógenos en adultos mayores de una clínica privada de Lima [Internet]. 2019 Apr [citado el 12 de agosto 2021]; 36 (1): 87-92. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172646342019000100013&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342019000100013&lng=es). <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3765>.
10. García D. Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género amaranthus aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo diciembre de 2013 – mayo de 2014 [Tesis]. Ecuador Universidad Nacional de Chimborazo, 2015 disponible en:  
<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1305/1/unach-ec-Lab.clin-20150004.pdf>
11. Sarasti D. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal moringa oleífera frente a microorganismos patógenos. [Tesis]. Ecuador: Universidad Central de Ecuador, 2019. disponible en:  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15167/1/T-UCE-0008-QF0532018.pdf>
12. Herrera L. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. [Internet]. 1999 Apr [citado el 12 agosto 2021]; 34 (1): 33-41. Disponible en:

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=en).

13. Cotrado D. Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. anís frente a *Salmonella typhi* ATCC 6539 [Tesis]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 2016, disponible:  
[http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1959/1114\\_2016\\_cotrado\\_apaza\\_dy\\_faci\\_biologia\\_microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1959/1114_2016_cotrado_apaza_dy_faci_biologia_microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
14. Carrión A. García C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica [Tesis]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010. Disponible:  
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
15. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de amazonas. [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2021. disponible en:  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Altemimi A. Lakhssassi N. Baharlouei A. Watson D. Lightfoot D. Phytochemicals: Extracción, aislamiento, e Identificación de compuestos bioactivos de extractos de planta. [Internet]. 2017 Apr [citado el 14 de agosto 2021]; 6(4): 42. Disponible en:  
<https://www.mdpi.com/2223-7747/6/4/42>.
17. Laily N. Kusumaningtyas R. Sukarti I. Rini K. la potencia de las hojas de Guava *Psidium guajava* (L.) como ingrediente inmunoestimulador funcional. [Internet]. 2015 Apr [citado el 15 de agosto 2021]; 14: 301-307. Disponible en:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619615000431#bibl0005>
18. Mai-Prochnow A. Clauson M. Hong J. Murphy A. las bacterias Gram positivo y Gram negativo difieren en su sensibilidad al plasma frio. [Internet]. 2016 Apr

[Citado el 15 agosto 2021]; 6: 201 Disponible en:  
<https://doi.org/10.1038/srep38610>

19. Yahaya A., Ali M., El-Hassan F. y Jido A. actividad antibacteriana de extracto de guayaba (*Psidium guajava* L.) sobre *Staphylococcus aureus* aislado de pacientes con infecciones de tracto urinario que acudieron a un hospital de tercer nivel. [Internet]. 2019 Apr [Citado el 09 junio 2021]; 14(1): 47-51, disponible en:  
<https://www.ajol.info/index.php/swj/article/view/208428>
20. Ortega J., Madrigal J. Evaluación de la actividad antimicrobiano del extracto alcohólico de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.). [Tesis]. Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2018. Disponible en:  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/27926/1/BCIEQ-T0241%20Ortega%20P%c3%a9rez%20Jackeline%20Alexandra%3b%20Madrigal%20Vera%20Jimmy%20Alfredo.pdf>
21. Ara J., Faruk H. y Mowlah A. Efectos antibacterianos de los extractos de guayaba (*Psidium guajava* L.) contra patógenos transmitidos por los alimentos. [Internet] 2017 Apr. [citado 06 de enero 2017]; 6 (1): 1-5. disponible en:  
[https://www.researchgate.net/profile/JasminFarhana2/publication/314265134\\_Antibacterial\\_Effects\\_of\\_Guava\\_Psidium\\_guajava\\_L\\_Extracts\\_Against\\_Food\\_Borne\\_Pathogens/links/5b391c7e0f7e9b0df5e454e6/Antibacterial-Effects-of-Guava-Psidium-guajava-L-Extracts-Against-Food-Borne-Pathogens.pdf](https://www.researchgate.net/profile/JasminFarhana2/publication/314265134_Antibacterial_Effects_of_Guava_Psidium_guajava_L_Extracts_Against_Food_Borne_Pathogens/links/5b391c7e0f7e9b0df5e454e6/Antibacterial-Effects-of-Guava-Psidium-guajava-L-Extracts-Against-Food-Borne-Pathogens.pdf)
22. Escobar A. Ccasa E. Efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. (GUAYABA) Sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Cándida albicans* ATCC 10231. [Tesis] Arequipa: Universidad Privada Autónoma del Sur; 2018. Disponible en:  
<http://repositorio.upads.edu.pe/bitstream/handle/UPADS/58/TESIS%20ADALSA%20ESCOBARELVIRA%20CCASA%20%20copia.pdf?sequence=1&isAlloved=y>

23. Cruz H, y Flores G. Actividad antibacteriana in vitro del extracto alcohólico de las hojas de Guaya (*Psidium Guajava L.*), sobre *Lactobacilos spp* y *Streptococos mutans*. [Tesis]. Huancayo: Universidad Peruana los Andes; 2018 Disponible en:  
[https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/6040/1/rep\\_mehu\\_goly\\_villanueva\\_efecto\\_antibacteriano\\_in\\_vitro\\_extracto\\_alcoholico\\_psidium\\_guajava\\_l\\_guayaba\\_sobre\\_staphylococcus\\_aureus.pdf](https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/6040/1/rep_mehu_goly_villanueva_efecto_antibacteriano_in_vitro_extracto_alcoholico_psidium_guajava_l_guayaba_sobre_staphylococcus_aureus.pdf)
24. Villanueva Z. Efecto antibacteriano in Vitro del extracto alcohólico de *Psidium Guajava L.* (Guayaba) sobre *Staphylococcus Aureus*. [Tesis]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2019 Disponible en:  
[https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/6040/1/rep\\_mehu\\_goly\\_villanueva\\_efecto\\_antibacteriano\\_in\\_vitro\\_extracto\\_alcoholico\\_psidium\\_guajava\\_l\\_guayaba\\_sobre\\_Staphylococcus\\_aureus.pdf](https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/6040/1/rep_mehu_goly_villanueva_efecto_antibacteriano_in_vitro_extracto_alcoholico_psidium_guajava_l_guayaba_sobre_Staphylococcus_aureus.pdf)
25. Cegarra J. Metodología de la investigación científica y tecnológica. 1st ed. Madrid: Díaz de Santos; 2004. 372 p. Disponible en:  
<https://cienciaenlautn.files.wordpress.com/2018/08/cegarra-metodologacc81-de-la-investigaciocc81n-cienticc81fica-y-tecnolocc81gica-cap-2-3-y-4-unidad-1.pdf>
26. Hernández R, Mendoza C. Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. [Internet]. 2019 Apr. [citado junio 2019]; 9 (18): 1-4. Disponible en:  
[http://virtual.cuautitlan.unam.mx/rudics/wpcontent/uploads/2019/02/RUDICSv9n18p92\\_95.pdf](http://virtual.cuautitlan.unam.mx/rudics/wpcontent/uploads/2019/02/RUDICSv9n18p92_95.pdf)
27. Amiel J. Metodología y diseño de la investigación científica. 1st ed. Ruiz M, editor. Lima: Fondo editorial de la Universidad Científica del Sur; 2014. 1–329 p.
28. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de amazonas [tesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2004. disponible en:



<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

29. Juárez M. Identificación de metabolitos secundarios de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de Agua) del Rio Chira, Sullana. [Tesis]. Sullana: Universidad San Pedro. Sullana 2018. Disponible en:  
[http://repositorio.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/9260/Tesis\\_60128.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/9260/Tesis_60128.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
30. MINSA: Ministerio de Salud e Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. [Internet] Lima: MINSA; c2002 (Citado el 15 de agosto 2021) Disponible en:  
[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manual\\_s](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manual_s)
31. Ccoscco J y Zavaleta E. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de semillas *Psidium guajava* L. (Guayaba) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis]. Lima: Universidad Interamericana; 2019. Disponible en:  
<http://repositorio.unid.edu.pe/handle/unid/40>
32. Apaza S y Carhuapoma D. Cuantificar el ácido ascórbico de los extractos etanólicos de la pulpa fresca de *Solanum sessiliflorum* dunal, *Psidium guajava* L., *Averrhoa carambola* L. en la selva central – Lima -2020. [Tesis]. Huancayo: Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt; 2020. Disponible en:  
<https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/handle/ROOSEVELT/288>
33. García F, Ángeles M. Efecto del extracto de plantas medicinales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Científica UNTRM [Internet]: 2020 Apr [citado 12 octubre 2020]; 3 (3), 1-5. disponible en:  
<http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/CNI/article/view/633>

## ANEXOS

### ANEXO A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	N° DE ÍTEMS	VALOR
<b>Variable independiente:</b> Extracto etanólico de <i>Psidium guajava L.</i>	Compuesto químico obtenido a través de un proceso de maceración, posterior filtrado y dilución de la planta <i>Psidium guajava L.</i>	El extracto etanólico será evaluado a través de la difusión en diferentes concentraciones	Concentraciones del extracto	50 mg/ml 150 mg/ml 250 mg/ml	Intervalo	No Aplica	Mg/ml
<b>Variable dependiente:</b> Actividad antimicrobiana del extracto <i>Psidium guajava L.</i>	Capacidad de un antibiótico o sustancia para inhibir el crecimiento de una cepa microbiana	La actividad antimicrobiana se medirá a través de halos de inhibición o susceptibilidad con la interacción del extracto	Inhibición determinada por el diámetro de los halos.	Negativo sensible	Nominal	No Aplica	Milímetros

## ANEXO B. Técnica e instrumentos de recopilación de datos

### B-1 INSTRUMENTO PARA MARCHA FITOQUIMICA

Instrumentos de recolección de datos para el tamizaje fitoquímica y determinar la presencia de metabolitos secundarios

Marcha fotoquímica			
Ficha de trabajo			
Muestra problema			
Fecha			
Metabolitos	Método	Presencia de cambio de color	Aplicación (contiene/no contiene)
Flavonoides			
Compuestos fenólicos			
Alcaloides			
Saponinas			
Terpenos			
Taninos			
Otros			

Fuente: Condori, M. et 2019. CITAS modificadas por los autores.

### B-2 INSTRUMENTO PARA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Registro del diámetro (mm) de los halos de inhibición para las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Psidium guajava L.* (Guayaba)

<b>Fecha:</b>						
<b>Cepa Bacteriana:</b> <i>Escherichia coli</i>			<b>Código ATCC</b>			
CONCENTRACIONES	Diámetro de halos de inhibición (mm)					Promedio
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	
50 mg/ml						
150 mg/ml						
250 mg/ml						
<b>Fecha:</b>						
<b>Cepa Bacteriana:</b> <i>Staphylococcus aureus</i>			<b>Código ATCC</b>			
CONCENTRACIONES	Diámetro de halos de inhibición (mm)					Promedio
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	
50 mg/ml						
150 mg/ml						
250 mg/ml						
<b>CONTROL:</b> CIPROFLOXACINO			<b>Marca:</b>			
CONCENTRACIONES	Diámetro de halos de inhibición (mm)					Promedio
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	
5 mg						

## ANEXO C. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Presenta actividad antimicrobiana el extracto etanólico de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a bacterias Gram positivas <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y Gram negativas <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a bacterias Gram positivas ( <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923) y Gram negativas ( <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922).	El extracto etanólico de hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas ( <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923) y Gram negativas ( <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922).
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
¿Presenta metabolitos secundarios el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba"	Identificar los metabolitos secundarios responsables que presente actividad antimicrobiana del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a las cepas de <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	El extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. presenta metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.
¿Qué actividad antimicrobiana presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a bacterias Gram positivas <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923?	Conocer la actividad antimicrobiana que presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias <i>Sthaphylococcus aureus</i> ATCC 25923.
¿Qué actividad antimicrobiana presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a bacterias Gram negativa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?.	Conocer la actividad antimicrobiana que presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. "Guayaba" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>El extracto etanólico de las hojas de Psidium guajava L. "Guayaba" presenta actividad antimicrobiana frente a Escherichia coli ATCC 25922.</i>

¿Qué actividad antimicrobiana presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” sobre bacterias Gram positivos <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en comparación con la vancomicina?	Comparar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en comparación con vancomicina.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” supera el efecto inhibitor de la vancomicina frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.
--	---	--

¿Qué actividad antimicrobiana presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” sobre bacterias Gram negativas <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en comparación con el ciprofloxacino?	Comparar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en comparación con Ciprofloxacino.	El extracto etanólico de las hojas de <i>Psidium guajava</i> L. “Guayaba” supera el efecto inhibitor del ciprofloxacino frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.
--	---	--

**PROCEDIMIENTO PARA COLECTA DE DATOS USANDO EL CUESTIONARIO**

**PROCEDIMIENTO PARA COLECTA DE DATOS USANDO EL PARA LA PRUEBA DE CROMATOGRFÍA Y MARCHA FITOQUIMICA**

Para la prueba de cromatografía se utilizará el formato A el cual emplea el RF de las sustancias aisladas.  
 Para la prueba de marcha fitoquímica se utilizará el formato de B el cual está conformado por las pruebas coloraciones y resultados.  
 Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizará el formato C donde indica los halos de inhibición se produce por la muestra del estudio.

## ANEXO D. INFORME DE LABORATORIO



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"


### Informe de Resultados

Solicitado por: Llamosa Maldonado Jesús María  
 Mamani de la Cruz Gabriel  
 Muestra: Extracto de hojas de *Prunum Guajava L.*  
 Cantidad: 21.2 gr  
 Fecha de ensayo: 05-11-2021

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	50 mg/ml	150 mg/ml	250 mg/ml	Vancomicina 30ug	Etolol 70%
Staphylococcus aureus ATCC 25923	9.67	11.72	13.16	20.22	6
	9.66	11.70	13.18	20.21	6
	9.69	11.71	13.19	20.20	6
	9.70	11.74	13.23	20.21	6
	9.67	11.72	13.24	20.20	6
Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	50 mg/ml	150 mg/ml	250 mg/ml	Ciprofloxacino 5 ug	Etolol 70%
Escherichia coli ATCC 25922	6	6	6	41.23	6
	6	6	6	41.24	6
	6	6	6	41.16	6
	6	6	6	41.21	6
	6	6	6	41.23	6

\*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

\*Concentración del inóculo:  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL

  
 Lic. T.M. Walter A. Sín Rodríguez  
 CTMP. 10808

## ANEXO E. CERTIFICADO TAXONÓMICO

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C.B.P. N° 3796  
Cel: 963689079  
Email: jocande@gmail.com



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO - C.B.P. N° 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORIAL N° 8311-2013-MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:

Que, LLAMOZA MALDONADO JESÚS MARÍA y MAMANI DE LA CRUZ GABRIEL; tesisistas en la Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente del eje carretero vía interoceánica del Perú - Brasil del departamento Madre de Dios, provincia y distrito de Tambopata, donde es conocida con el nombre vulgar de "guayaba", la muestra fértil con flores y frutos ha sido estudiada e identificada con el nombre científico de *Psidium guajava* L. Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), este Sistema de clasificación considera a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida (Chasse, MW y JL, Reusel, 2009), la muestra vegetal estudiada se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

Reino: Plantae  
División: Angiospermae  
Clase: Equisetopsida  
Subclase: Magnoliidae  
Superorden: Rosanae  
Orden: Myrtales  
Familia: Myrtaceae  
Género: *Psidium*  
Especie: *Psidium guajava* L.

Nombre vulgar: "guayaba"

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 06 de noviembre del 2021

  
José R. Campos de la Cruz  
BIÓLOGO  
C.B.P. 3796

JR. SANCHEZ SILVA N° 116- piso 2, Urb. Santa Luzmila, Lima 07  
Email: jocande@gmail.com; jrcamposil@ruboo.es



## ANEXO F. EVIDENCIAS DE CAMPO

### INFORME DE PROCESAMIENTO DE MUESTRA

#### Muestra:

- *Hojas de Psidium guajava L.*
1. Recojo de muestra
    - Fecha 15-10-21
  2. Recepción de muestra
    - Fecha: 16-10-21
    - Cantidad recibida: 2201.8 g
  3. Tratamiento y extracción de la droga vegetal
    - 3.1. Tratamiento de la droga vegetal



Con el fin de adecuar la muestra para el posterior proceso de preparación del extracto hidroalcohólico, se realizaron las siguientes operaciones previas:

#### a. Selección y Limpieza

Se eliminó cuidadosamente la tierra que pudiera estar adherida sobre la superficie de las hojas, así como aquellas que estuvieran en mal estado o con signos de contaminación microbiana o por insectos.



Proceso separación hojas deterioradas

b. Lavado

Con este proceso se eliminó todos los vestigios de tierra que pudieran haber quedado sobre las hojas aplicando un flujo continuo de agua potable a temperatura ambiente, posteriormente se desinfectó empleando una solución de hipoclorito de sodio, se enjuagó con agua destilada y se dejó a escurrir durante 3 horas.



Lavado con agua potable



Desinfección con solución de hipoclorito de sodio



Enjuague con agua destilada



Bandeja de escurrido

### c. Secado

Este proceso consiste en eliminar gran parte del agua de la especie. Esto debido a que la presencia de agua es el principal responsable de la alteración de la planta recolectada. Al disminuir la cantidad de agua, las enzimas detienen su actividad, quedan inhibidas y la planta se conserva. Así mismo facilita el proceso de extracción.

En este caso la muestra fue distribuida sobre bandejas de papel kraft y secada por 24 horas empleando una estufa con aire recirculante a una temperatura de 40 °C.

- Tiempo de secado: 24 horas
- Temperatura de secado: 40 °C
- Peso obtenido luego de proceso: 927.8 g



Hojas frescas sobre bandejas de papel kraft



Estufa a 40 °C



Hojas secas luego de proceso de secado



#### d. Molienda

La muestra una vez seca fue sometida a trituración mecánica empleando un mortero y pilón de porcelana, con la finalidad de reducir el tamaño de partículas y aumentar el número de las mismas para hacer más eficiente el proceso de extracción al incrementar la superficie de contacto.

- Peso obtenido luego de molienda: 926.8 g



Proceso de molienda

### 3.2. Extracción

#### a. Macerado

El proceso de extracción se realizó macerando, dentro de un frasco ámbar, el material obtenido luego de la molienda con etanol de 70°. El proceso de maceración se realizó durante 10 días, sometiéndolo a agitación mecánica cada 12 horas.

- Cantidad de muestra a macerar: 200 g
- Solvente: etanol 70°
- Cantidad de solvente: 1000 mL
- Días de macerado: 10 días



Proceso de maceración

b. Filtrado

El líquido resultante del proceso de maceración fue filtrado empleando papel de filtro whatman N°1 y un embudo de vidrio.

- Cantidad líquido filtrado: 700 ml

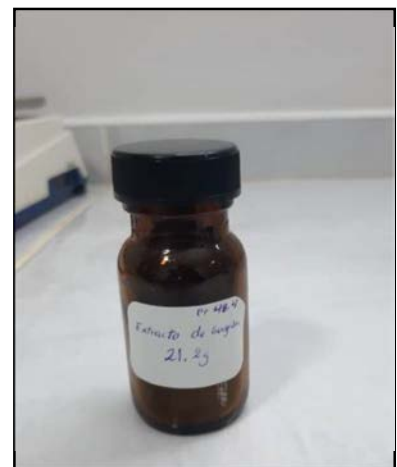
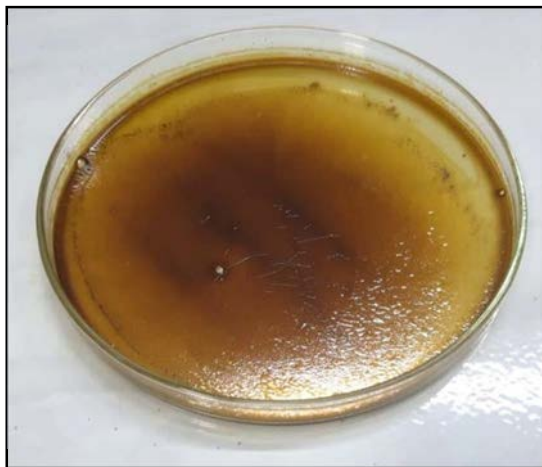


Proceso de filtración

c. Obtención de extracto seco

Para facilitar la evaporación del disolvente, el líquido filtrado fue vertido sobre placas Petri de vidrio y fue llevado a estufa de aire re circulante a una temperatura de 40°C hasta sequedad.

- Cantidad líquido a secar: 700 ml
- Temperatura: 40°C
- Tiempo de secado: 24 horas
- Cantidad extracto obtenido: 21.2 g



Proceso de obtención de extracto seco

# INFORME ENSAYO MICROBIOLÓGICO

## I. MÉTODO

Método: Difusión en disco - Kirby Bauer

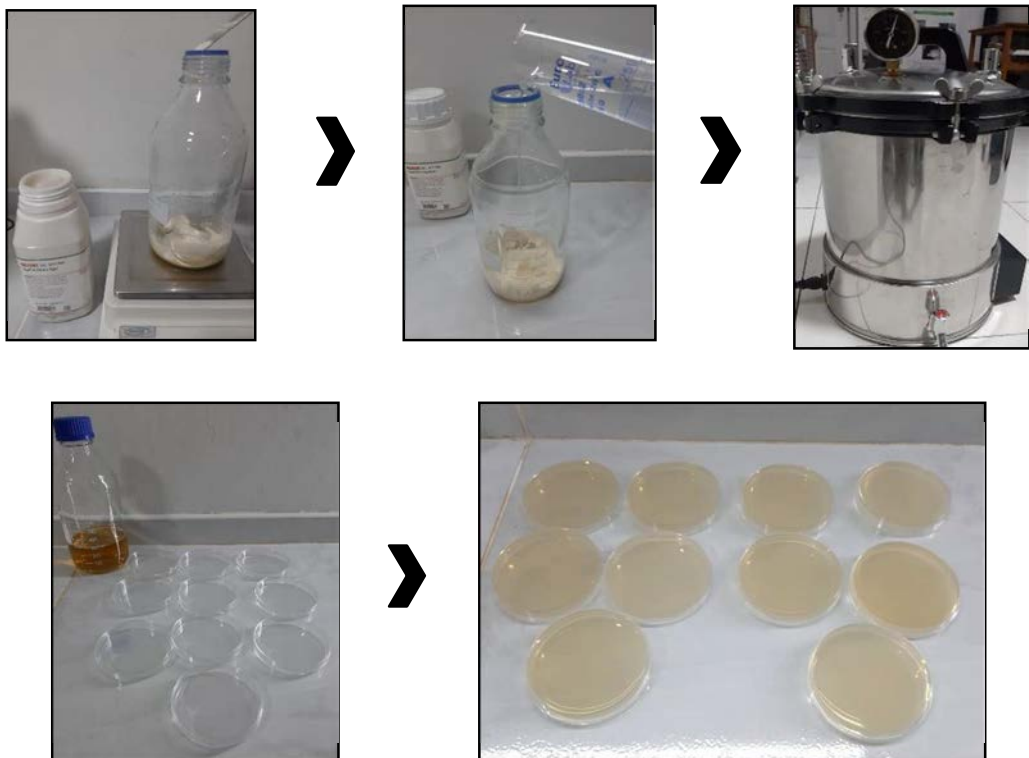
Consiste en depositar sobre la superficie de una placa de Petri con agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes sustancias antibióticas.

### 1. Preparación de Medio de Cultivo

#### 1.1 Agar Mueller Hinton

El medio de cultivo fue preparado partiendo de la base deshidratada y siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

- a. Se pesó 7.6 de Agar Mueller Hinton deshidratado y se adicionó 200 ml de agua destilada, posteriormente se procedió a calentar con agitación constante hasta lograr la disolución total del medio de cultivo, por último, se esterilizó empleando autoclave sometiendo al medio de cultivo a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.
- b. Una vez finalizado el proceso en autoclave se dejó enfriar hasta que el medio de cultivo alcanzó una temperatura entre 45°C – 50°C y se distribuyó en placas Petri estériles de 90 x 15 mm.





## 2. Activación de la cepa: Kwik-stik microbiológicos - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Para preparar el inóculo se empleó el producto Kwik-stik microbiológicos que contiene a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* liofilizada en un pelet.

- a. El Kwik-stik tiene en la parte superior una ampolla con líquido hidratante, el cual fue liberado al apretar una sola vez la mencionada ampolla que se encuentra en la tapa. Luego de realizar esta operación el Kwik-stik se mantuvo en posición vertical para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad, que contiene el gránulo.
- b. Por último, se presionó la parte inferior de la unidad para lograr una suspensión homogénea.
- c. De inmediato se procedió a saturar el hisopo, que contiene el producto, con el material hidratado y se transfirió a una placa con agar TSA, los cuales fueron incubados a 37 °C. durante 24 horas.

## 3. Método de preparación del inóculo

- a. Se realizó la suspensión directa, en solución salina (cloruro de sodio 0.9%), de colonias obtenidas de cada una de las placas anteriormente incubada durante 24 horas.



*Staphylococcus aureus*



*Escherichia coli*

- b. La turbidez resultante fue inmediatamente ajustada comparándola de manera visual con la turbidez del estándar 0.5 de Mc. Farland.



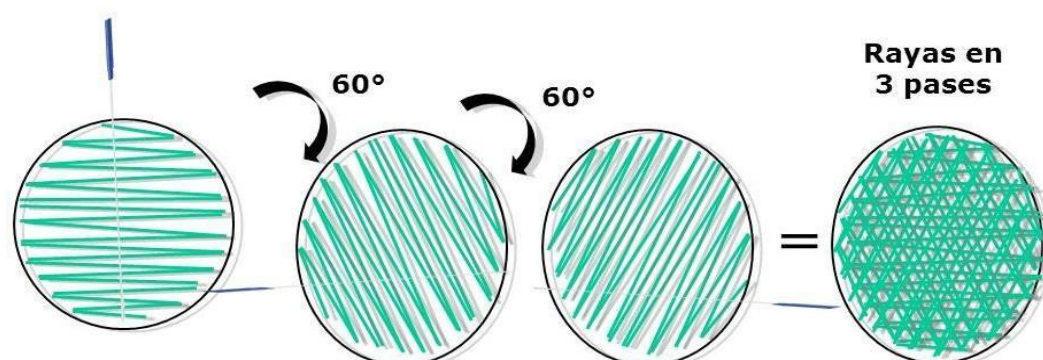
*Staphylococcus aureus*

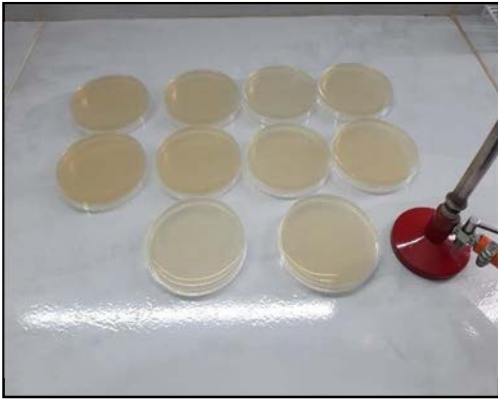


*Escherichia coli*

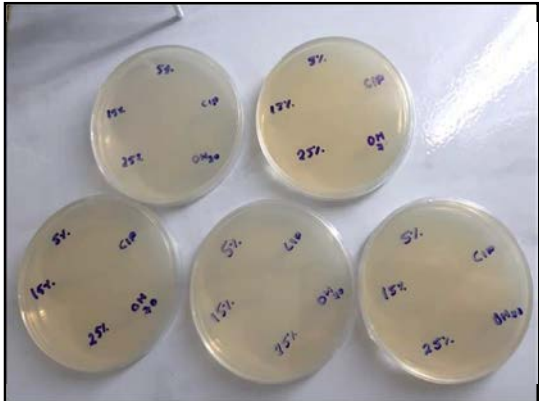
#### 4. Inoculación de placas

- Dentro de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a sumergir un hisopo estéril en la suspensión obtenida; el hisopo se rotó varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo y por encima del nivel del líquido, esto con la finalidad de remover el exceso de inóculo.
- Posteriormente se inoculó sobre la superficie seca del agar Muller hinton para esto se realizaron estrías en tres direcciones diferentes rotando la placa 60° cada vez, esto con la finalidad de asegurar una distribución uniforme del inóculo.
- Previamente todas las placas fueron marcadas para posteriormente colocar los discos.

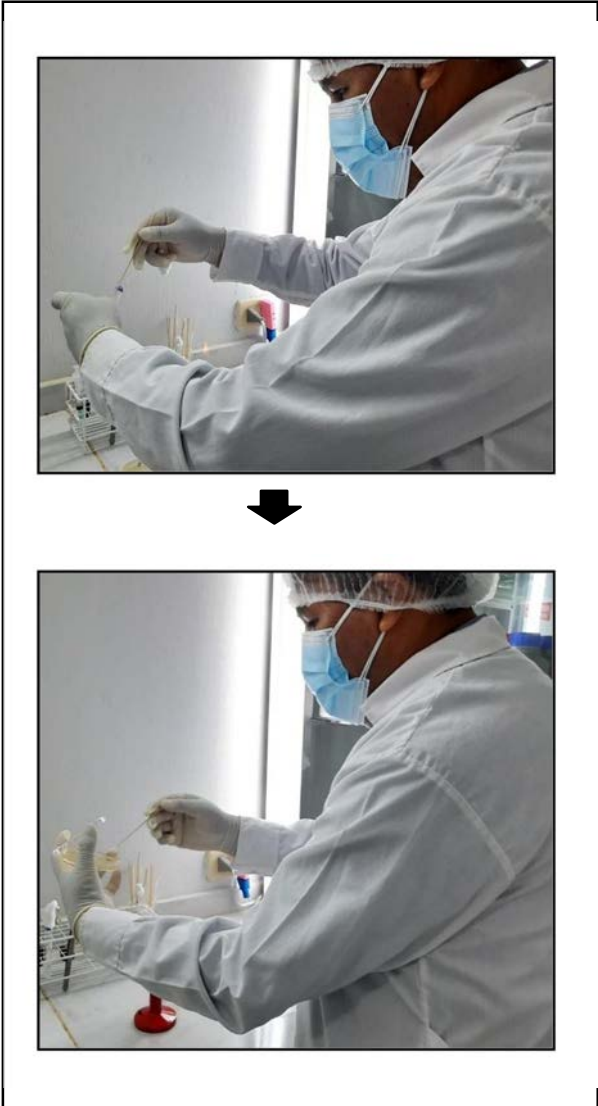




Agar Mueller Hinton



Rotulado de placas



Siembra de placas con *E. coli*



Siembra de placas con *S. aureus*

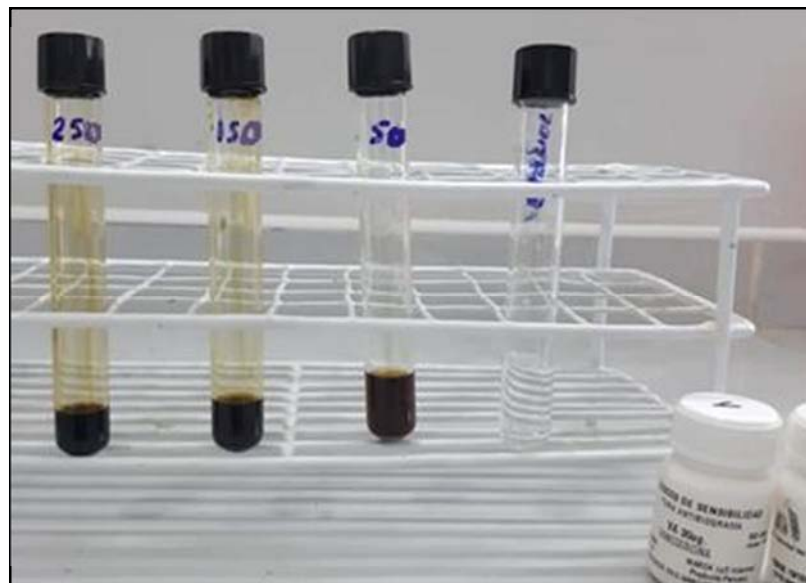
## 5. Preparación de discos de sensibilidad

Para la preparación de los discos se emplearon BLANK DISC – Liofilchem de 6 mm de diámetro previamente estériles.

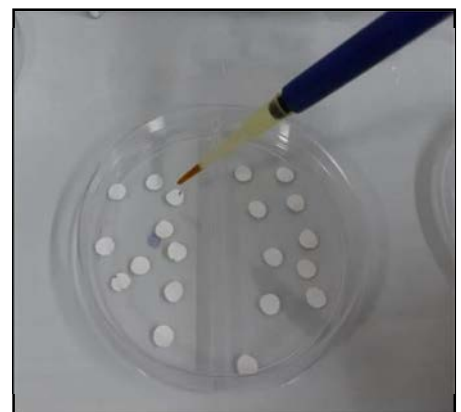
Cada uno de los discos fue embebido con 20 uL de muestra de la siguiente manera:

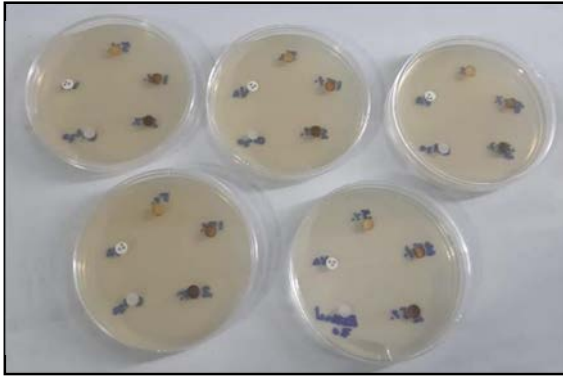
- Discos embebidos con extracto de hojas de guayaba 50mg/ml
- Discos embebidos con extracto de hojas de guayaba 150mg/ml
- Discos embebidos con extracto de hojas de guayaba 250mg/ml
- Discos embebidos con alcohol de 70°
- Discos de ciprofloxacino de 5 ug.
- Discos de vancomicina de 30 ug.

Según el disco de susceptibilidad antimicrobiana establecidos por la empresa thermoscientific que distribuye fármacos en discos en microgramos (ug) para investigaciones.

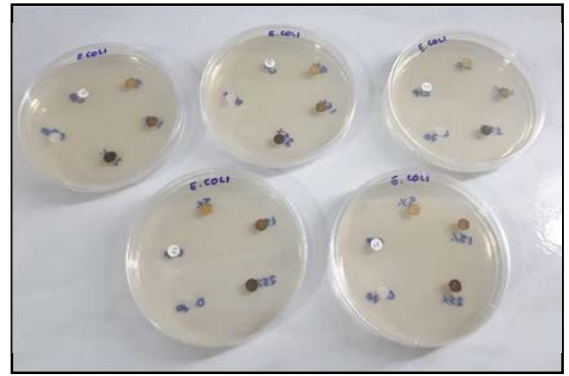


Posteriormente los discos fueron puestos sobre la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado con las cepas de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*





Placas con *S. aureus* con discos



Placas con *E. coli* con discos

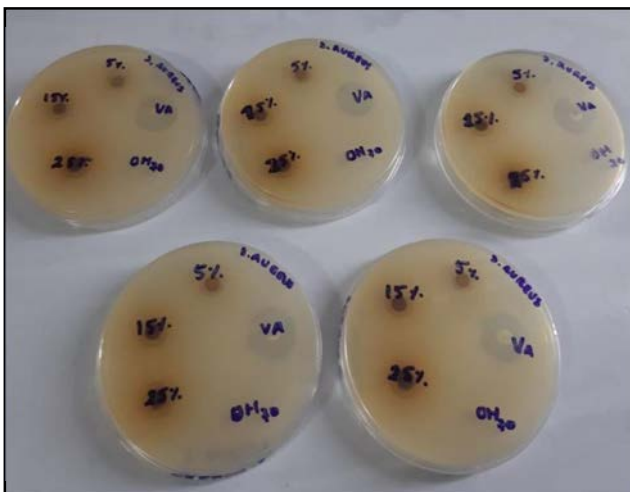
## 6. Incubación

Las placas se incubaron durante 24 horas en posición invertida a 37°C dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos.

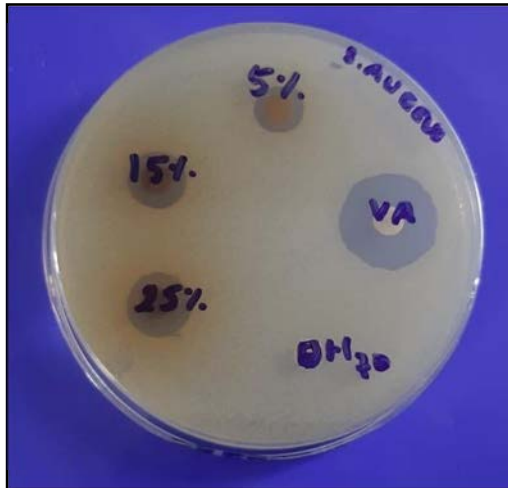


## 7. Lectura de resultados

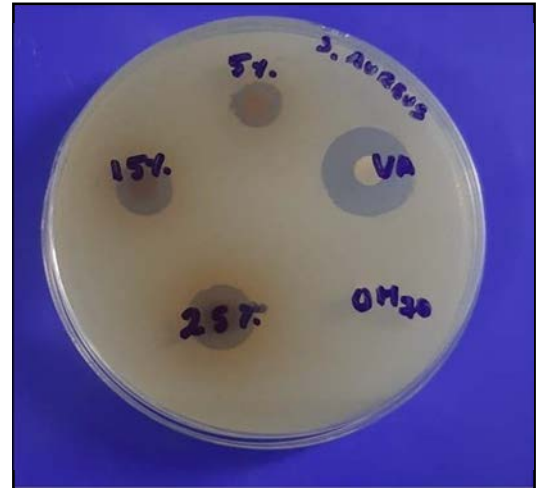
Halos de inhibición de los 5 grupos fueron medidos empleando un vernier.



Resultados de placas inoculadas con *S. aureus*



Placa N°1



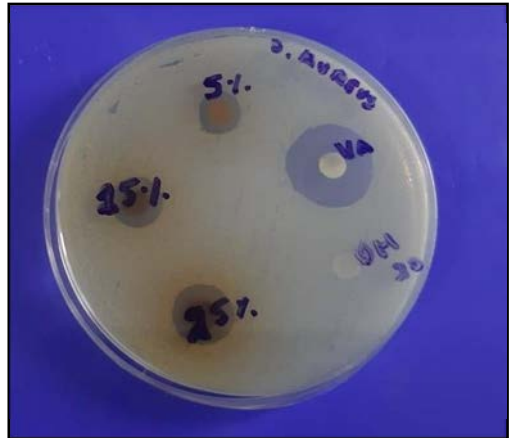
Placa N°2



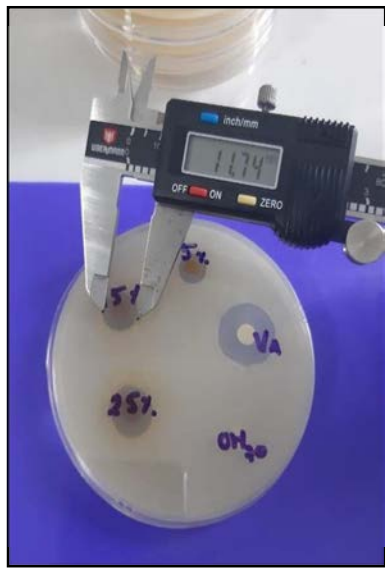
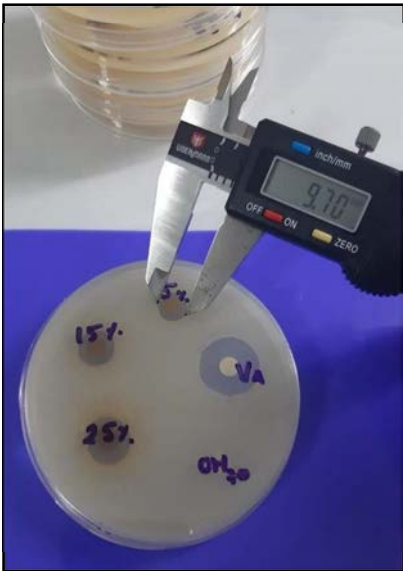
Placa N°3



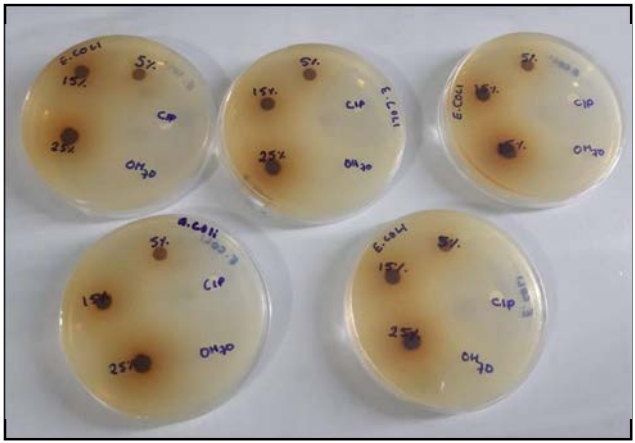
Placa N°4



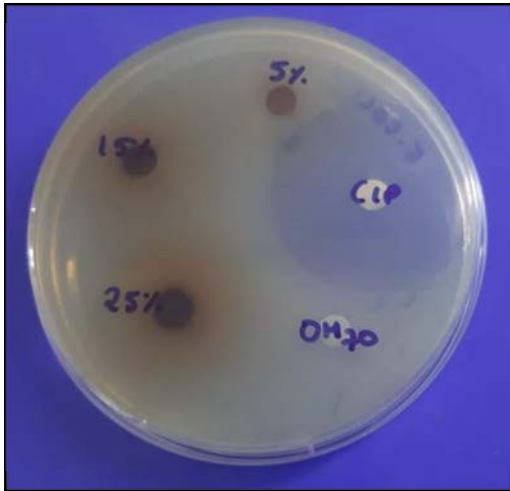
Placa N°5



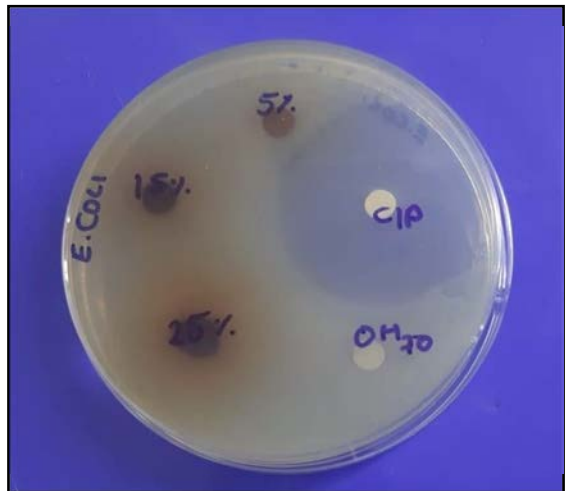
Medida de halos de inhibición de sustancias experimentales enfrentadas con *S. aureus*



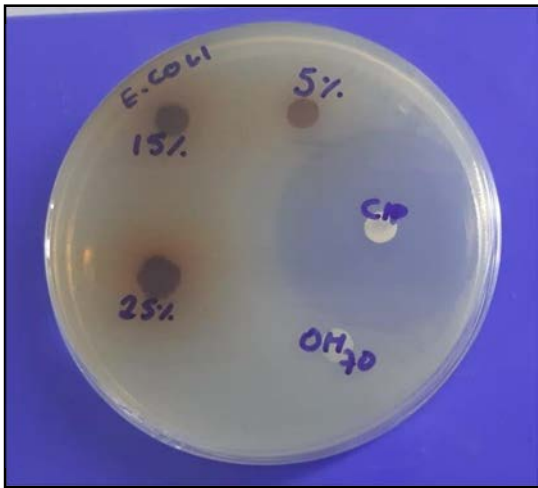
Resultados de placas inoculadas con *E. coli*



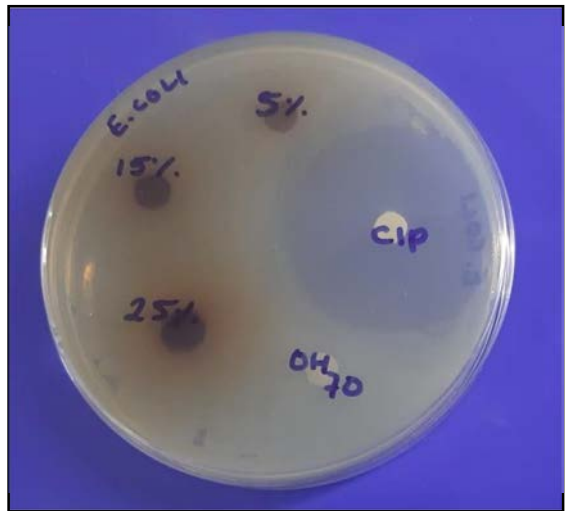
Placa N°1



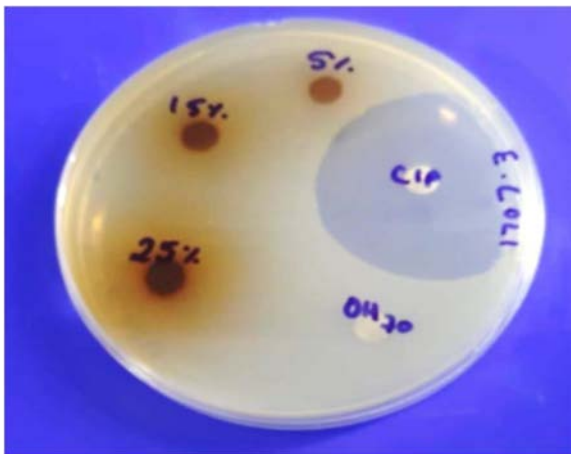
Placa N°2



Placa N°3



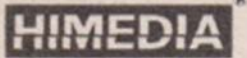
Placa N°4



Placa N°5



## ANEXO G. CERTIFICADO DE AGAR MUELLER HINTON



Certified : ISO 9001:2008, ISO 13485-2012 and WHO GMP

**HiMedia Laboratories Private Limited**  
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086  
 Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

### Certificate of Analysis, Quality and Conformity

<b>Material Code : M173</b>	<b>Material Name : Mueller Hinton Agar</b>	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

#### Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow

#### Gelling

Firm, comparable with 1.7% agar gel.

#### Colour and Clarity of prepared medium

Light amber coloured clear to slight opalescent gel forms in Petri plates.

#### Reaction

Reaction of 3.8% w/v aqueous solution at 25°C.

#### pH

pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.37

#### Cultural Response

Cultural characteristics observed after incubation at 30-35°C for 18 -24 hours for bacterial cultures. For testing *S.pneumoniae* : The medium was supplemented with 5% Sheep blood and incubated at 35°C for 16-18 hours at 5% CO<sub>2</sub> For testing *H.influenzae* : Yeast extract & 2 vials /l of *Haemophilus Growth Supplement* (FD117 containing 15 mg/l of Haematin+ 15 mg/l of NAD) and incubated at 35°C for 20-24 hours at 5% CO<sub>2</sub>

#### Antibiotic Sensitivity test

Various discs were tested for standard ATCC strains and zone of inhibition were measured after an incubation 30-35°C for 18 hours. (As per the latest CLSI Protocol M6 & Standards as per the current CLSI M100)

#### Thymine/Thymidine Content

# The zones for these discs are indicative of the Thymine/Thymidine content of the medium.

#### Divalent Cation Content

\* The zones for these discs are indicative of the Divalent Cation content of the medium

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
<b>Escherichia coli ATCC 25922(WDCM 00013)</b>						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	80	94%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	16-22 mm	21mm
<i>Cefotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	29-35 mm	34mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	15-21 mm	20mm
<i>Chloramphenicol C 30 mcg</i>	-	-	-	-	21-27 mm	26mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	30-40 mm	38mm

**HiMedia Laboratories Private Limited**

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code : M173</b>	<b>Material Name : Mueller Hinton Agar</b>	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

<i>Gentamicin GEN 10 mcg</i>	-	-	-	-	19-26 mm	25mm
<i>Sulphafurazole SF 300 mcg</i>	-	-	-	-	15-23 mm	21mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-25 mm	24mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

**Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034)**

<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	79	91%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	35mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	28mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	29mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	30mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Pristinomycin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	27mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	20mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	24-32 mm	30mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

**Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)**

<i>Growth promoting</i>	81	luxuriant	78	96%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	21mm
<i>Ceftazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	28mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	20mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	26mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	24mm

**Escherichia coli ATCC 35218**

<i>Growth promoting</i>	82	luxuriant	77	93%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	21mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	17mm

**HiMedia Laboratories Private Limited**

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code : M173</b>	<b>Material Name : Mueller Hinton Agar</b>	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	16mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	28mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	23mm
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29212 (WDCM 00087)</b>						
<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	80	90%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	29mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm	27mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	# 17 mm	23mm
<b>Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA) (WDCM 00211)</b>						
<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	85	0	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone
<b>Sterptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)</b>						
<i>Growth promoting</i>	81	luxuriant	76	93%	-	-
<b>Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)</b>						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	80	94%	-	-
<b>Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,NAD &amp; Hematin)</b>						
<i>Growth promoting</i>	83	luxuriant	78	93%	-	-

- . ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- . NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency

**Control Media :**

- . For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/Horse blood.
- . For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

- . All ISO 11133 : 2014 (E) control strains are included in the Quality parameter
- . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is certified for ISO 9001-2008, ISO 13485-2012 and WHO GMP.

. Information for BSE/TSE Risk: The material was subjected to pH  $\leq$  7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

HiMedia Laboratories Private Limited

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

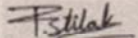
**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code : M173</b>	<b>Material Name :</b> Mueller Hinton Agar	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

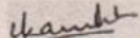
**STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED**

This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications. The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particular use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

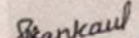
This document has been produced electronically and is valid

  
Prachi Rathwar

Microbiologist/Sr.Executive  
Microbiologist

  
Urvashi M. Kohate

Asst./Dy/QC Manager

  
Dr. Santosh Kaul

Dy/QA Manager

22.12.2017


# ANEXO H. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE CEPA E. COLI



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0335 <b>Lot Number:</b> 335-506** <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™* <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2022/3/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Mary L Bowman <b>Release Date:</b> 2020/4/8
---	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough  <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Medium:</b> SBAP  <b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm  <div style="text-align: right;">                       Amanda Kuperus                      Quality Control Manager                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </div>
---	---

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: 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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2020-03-27T11:51:17.542 KLH

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
C7 (+++) (A)	335-506	Escherichia coli	2.55

Comments:


closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

# ANEXO I. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE CEPA S. AUREUS



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-486** Reference Number: ATCC® 25923™* Passage from Reference: 3	<b>Expiration Date:</b> 2022/5/31 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2020/7/2
---	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic <b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	<b>Medium:</b> SBAP  <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm  <div style="text-align: right;">                           Amanda Kuperus                          Quality Control Manager                          AUTHORIZED SIGNATURE                     </div>

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: 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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.







## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2020-07-01T13:51:52.526 ads

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A2 (+++) (A)	360-486	Staphylococcus aureus	2.47

Comments:

n/a
-----