

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA
PERUANA**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

Para Optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE *Geranium ayavacense* SOBRE
Escherichia coli, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-
2013”.**

PRESENTADO POR

Bach. RÍOS GÓMEZ, Neiser Manuel

Bach. DÁVILA VALLES, Rully Glider

ASESORES

Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.

Ing. Jorge Ysaac Villacrés Vallejo MSc.

**IQUITOS - PERÚ
2014**

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013”.

Bach. RÍOS GÓMEZ, Neiser Manuel; Bach. DÁVILA VALLES, Rully Glider

RESUMEN

Geranium ayavacense Willd. ex H.B.K (Pasuchaca) es utilizado como medicina natural para el tratamiento de diversas enfermedades, recientes estudios demuestran sus propiedades antidiabéticas, pero poco se ha estudiado sus demás propiedades como la antibacteriana. Razón por la cual el objetivo principal del presente trabajo es evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso liofilizado *Geranium ayavacense*, sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana se determinó mediante la prueba de sensibilidad, utilizando la técnica de disco difusión en medio sólido. La planta entera de *Geranium ayavacense*, fue colectada en el distrito de Huaraz, departamento de Ancash. La misma fue disecada y pulverizada para obtener el extracto acuoso, posteriormente sometido a un proceso de liofilización. Se elaboraron discos de sensibilidad con el extracto acuoso liofilizado a concentraciones entre 100 y 900mg/ml. Los cuales fueron enfrentados a las colonias en crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por el método de macrodilución. Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos. La más alta actividad antibacteriana se obtuvo sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, a una concentración de 900mg/ml del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, el cual produjo un halo de inhibición de 19mm. Todas las cepas estudiadas tuvieron cierto grado de sensibilidad al extracto acuoso liofilizado. La CMI sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* fue de 8.00mg/ml, siendo este el menor valor obtenido respecto a las otras cepas estudiadas.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, extracto, halo, sensibilidad, gentamicina.

“IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY of *Geranium ayavacense* on *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013”.

Bach. RÍOS GÓMEZ, Neiser Manuel; Bach. DÁVILA VALLES, Rully Glider

SUMMARY

Geranium ayavacense Willd. ex H.B.K (Pasuchaca) is used like natural medicine for the treatment of several diseases, recently studies demonstrate its anti-diabetes properties, but it has studied very little about its other properties like the antibacterial, which the main goal of this personal introduction is to evaluate the antibacterial activity in vitro lyophilized aqueous extract *Geranium ayavacense*, on *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The antibacterial activity was determined through the test the sensibility, using the technique of diffusion disk in solid state. The entire plant of *Geranium ayavacense*, it was collected in Huaraz district, department of Ancash. It was dissected and pulverized to obtain the aqueous extract posteriorly subjected to a process of lyophilization. The sensibility disks were elaborated with the lyophilized aqueous extract to concentrations between 100 and 900mg/ml, which they were faced to the colonies in growth of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration (CMI). It was determined for the method of macro dilution. It was made the statistical analysis of the obtained results the highest antibacterial activity is obtained about the growth of *staphylococcus aureus*, to a concentration of 900mg/ml of the lyophilized aqueous extract of *Geranium ayavacense*, which it produced a halo of inhibition of 19mm. all the studied stocks had certain degree of sensibility to lyophilized aqueous extract, the CMI about the growth of *staphylococcus aureus* was of 8mg/ml, this was the less value obtained with respect to the other studied stocks.

Key words: Antibacterial activity, extract, halo, sensibility, gentamicin.

DEDICATORIA

*A mis padres Mario Ríos y
Rosalía Gómez, por sus
enseñanzas, sus exigencias,
por todo el amor y la
confianza que me brindan.*

*A mis hermanos Karina,
Moises, José, César y en
especial a Daniel, por todo el
apoyo y porque siempre están
ahí.*

*A mis tíos Felicita, Manuel,
Clay, Bethy, Iris, Julio, Elia
y a mis abuelos Cesar y Lidia.*

*A mis padres Glider Rene
Dávila Monzón y Gladis
Romí Valles Chota, por sus
apoyo incondicional, el amor
y la paciencia hacia mi
persona.*

*A mi abuelita Carmen
Monzón Zambrano, por todo
el amor y la ternura que me
ha sabido transmitir.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por proveernos de salud, sabiduría e inteligencia, para poder realizar este trabajo, sin tu bendición nada hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional De La Amazonía Peruana (UNAP), por habernos acogido en sus aulas, y brindarnos el conocimiento y formación profesional. A nuestros profesores por compartir con nosotros sus conocimientos y experiencias.

Al Instituto De Medicina Tradicional (IMET - ESSALUD), por facilitarnos sus laboratorios, los equipos, los materiales y la asesoría para poder ver realizado este proyecto de tesis.

A nuestros asesores Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong e Ing. Jorge Ysaac Villacrés Vallejo MSc., quienes estuvieron con nosotros puliendo y mejorando nuestras ideas en beneficio de la investigación que desarrollamos.

A mis jurados Q.F Luis Alberto Vilchez Alcalá, Q.F Mario Javier De La Cruz Flores y Q.F Rocio Bardales Soria, por saber guiarnos en el desarrollo de esta investigación.

Nora, Fredy y Stefano, gracias por su apoyo en el desarrollo de la parte experimental, del proyecto de tesis.

Gracias a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización del presente proyecto de tesis.

INDICE

CONTENIDO	pág.
Resumen	2
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Lista de cuadros	9
Lista de tablas	10
Lista de gráficos	12
Lista de siglas y abreviaturas	14
CAPÍTULO I	
1. Introducción	15
1.1. Problema de investigación	17
1.2. Objetivos	17
CAPÍTULO II	
2. Marco teórico	18
2.1. Marco referencial	18
2.1.1. Antecedentes	18
2.2. Marco conceptual	21
2.2.1. Generalidades de la planta	21
2.2.2. Generalidades de los microorganismos	25
2.2.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	25
2.2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.3. Definiciones operacionales	41
2.3.1. Variables	41
2.3.1.1. Variable independiente	41
2.3.1.2. Variable dependiente	41
2.3.1.3. Variable interviniente	41
2.3.2. Indicadores	41

2.3.2.1. Indicadores de la variable independiente	41
2.3.2.2. Indicadores de la variable dependiente	41
2.3.2.3. Indicadores de la variable interviniente	41
2.3.3. Operacionalización de la variable independiente	42
2.3.4. Operacionalización de la variable dependiente	43
2.3.5. Operacionalización de la variable interviniente	44
2.4. Hipótesis	45

CAPÍTULO III

3. Metodología de la investigación	46
3.1. Tipo de estudio	46
3.2. Diseño de investigación	46
3.3. Método	47
3.3.1. Método de difusión en medio sólido	47
3.3.2. Concentración inhibitoria mínima	48
3.4. Población y muestra	50
3.4.1. Población vegetal	50
3.4.2. Población bacteriana	50
3.5. Procedimientos, técnica e instrumentos de recolección de datos	52
3.5.1. Procedimiento de recolección de datos	52
3.5.1.1. Recolección de la muestra vegetal	52
3.5.1.2. Preparación del pulverizado vegetal	52
3.5.1.3. Preparación del extracto acuoso	52
3.5.1.4. Liofilización	52
3.5.1.6. Preparación de los discos de sensibilidad	53
3.5.1.14. Preparación del inóculo	57
3.5.1.16. Aplicación de los discos	58
3.5.1.17. Incubación	58
3.5.1.18. Lectura e interpretación	59
3.5.1.19. Determinación de la concentración inhibitoria mínima	60
3.6. Materiales e instrumentos	61
3.6.1. Material vegetal	61
3.6.2. Material biológico	61
3.6.3. Equipos	61

3.6.4.	Medios de cultivo y reactivos químicos	62
3.6.5.	Materiales de laboratorio	62
3.7.	Procesamiento de la información	63
3.8.	Medidas de bioseguridad	64
3.9.	Recomendaciones generales y precauciones	65
3.9.1.	Precauciones eléctricas	65
3.9.2.	Limpieza de las superficies externas	66
3.9.3.	Actividades dependientes de la temperatura	66

CAPÍTULO IV

4.	Resultados	67
4.1.	Actividad antibacteriana	67
4.2.	Discusión	85
4.3.	Conclusiones	87
4.4.	Recomendaciones	88
4.5.	Bibliografías	89
4.6.	Anexos	97

LISTA DE CUADROS

Cuadro 01.- Operacionalización de la variable independiente	42
Cuadro 02.- Operacionalización de la variable dependiente	43
Cuadro 03.- Operacionalización de la variable interviniente	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 01.- Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.....	59
Tabla 02.- Clasificación de la actividad antimicrobiana según su concentración mínima inhibitoria.....	60
Tabla 03.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> a diferentes concentraciones.....	68
Tabla 04.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> , sobre el crecimiento de las colonias de <i>Enterococcus faecalis</i>	72
Tabla 05.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> , sobre el crecimiento de las colonias de <i>Escherichia coli</i>	73
Tabla 06.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> , sobre el crecimiento de las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Tabla 7.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> , en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de <i>Enterococcus faecalis</i>	78
Tabla 08.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de <i>Geranium ayavacense</i> , en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de <i>Escherichia coli</i>	79

Tabla 09.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.....80

Tabla 10.- Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* (expresado en mg/ml), sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.....84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.....69

Gráfico 02.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.....69

Gráfico 03.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.....70

Gráfico 04.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.....70

Gráfico 05.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.....75

Gráfico 06.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.....75

Gráfico 07.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.....76

Gráfico 08.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*

a 900mg/ml, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.....76

Gráfico 09.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.....81

Gráfico 10.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.....81

Gráfico 11.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.....82

Gráfico 12.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.....82

Gráfico 13.- Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* (expresado en mg/ml), sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.....84

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

Término	Sigla/abreviatura
Grados Celsius	°C
Centímetro	cm
Milímetro	mm
Milígramo	mg
Litro	L
Mililitro	ml
Microlitro	μl
Unidad Formadora de Colonia	UFC
Concentración Mínima Inhibitoria	CMI
Metros sobre el nivel del mar	M.S.N.M
Instituto Nacional de Salud	INS
American Type Culture Collection	ATCC
National Committee for Clinical Laboratories Standards	NCCLS
Organización Mundial de la Salud	OMS

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una crisis de proporciones mundiales provocada por las enfermedades infecciosas, amenaza ganancias duramente obtenidas en la salud y la esperanza de vida. Las enfermedades infecciosas son ahora los mayores exterminadores de niños y de adultos jóvenes en el mundo. Producen más de 13 millones de defunciones al año, una de cada dos defunciones en los países en desarrollo.⁽¹⁾

Los microorganismos enteropatógenos como *Escherichia coli*, son causantes de una gran parte de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo como es el caso de nuestro país y más de nuestra región siendo la más afectada por estas clases de bacterias enteropatógenos. Otros microorganismos como *Enterococcus faecalis*, son causante del 15% de las infecciones intrahospitalarias registradas por el Instituto Nacional de Salud (INS), *Staphylococcus aureus* es responsable del 50% y *Pseudomona aeruginosa* del 70% de dichas infecciones.⁽²⁾

La resistencia de la mayoría de los agentes patógenos causantes de estas enfermedades a los medicamentos de primera línea como las penicilinas, varía entre cero y casi el 100%. En algunos casos, la resistencia a los medicamentos de segunda y tercera línea afecta de manera significativa el resultado del tratamiento. A esto se suma, la significativa carga mundial de las infecciones nosocomiales resistentes, los nuevos problemas de la resistencia a los antivíricos y los problemas cada vez mayores de la farmacorresistencia de las enfermedades parasitarias desatendidas que afectan a las poblaciones pobres y marginadas.⁽³⁾

El uso de la medicina alternativa hoy en día, está muy extendido; ya no es patrimonio de sociedades con historia cultural tradicional, como la nuestra. En una encuesta realizada en los Estados Unidos, un tercio de los encuestados

refirió haber usado al menos una terapia no convencional. El uso de terapias alternativas en otros países desarrollados también es elevado. Informes indican que un 46% de los australianos, así como 49% de franceses y 70% de canadienses han utilizado alguna de esas terapias. En Alemania, uno de cada tres alemanes ha utilizado alguna terapia alternativa, siendo la acupuntura y la homeopatía las más empleadas. ⁽⁴⁾

La riqueza de la biodiversidad amazónica, representa un potencial de mayor importancia tanto para el patrimonio mundial, como para la medicina. Actualmente, se estima que sólo la mitad de las especies de plantas han sido identificadas. Muchos medicamentos elaborados en los países occidentales proceden de plantas amazónicas. Recordemos que las propiedades de las plantas medicinales, bien conocida por los pueblos indígenas, son el objeto de la biopiratería de las empresas farmacéuticas. ⁽⁵⁾

El Perú posee una gran diversidad de especies, a pesar de los registros incompletos y fragmentados. En lo que respecta a la flora, se calculan unas 25 mil especies (10% del total mundial) de las cuales un 30% son endémicas. Es el quinto país en el mundo en número de especies; primero en número de especies de plantas de propiedades conocidas y utilizadas por la población (4 400 especies); y décimo en especies domesticadas nativas (128). ⁽⁶⁾

1.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Tendrá actividad antibacteriana *in vitro* el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013?

1.2 OBJETIVOS.

1.2.1 GENERAL.

- ❖ Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013.

1.2.2 ESPECÍFICOS.

- ❖ Determinar el porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, respecto al antibiótico control.
- ❖ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 MARCO REFERENCIAL

2.1.1 ANTECEDENTES.

Guerrero, J., Ortiz, Z. Peralta, L y Pérez F. (2013), realizaron un estudio comparativo de la actividad antibacteriana de las hojas de **Geranio hiedra** especie perteneciente a la familia Geraniaceae, sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*, utilizando como control positivo la Clorhexidina. Emplearon el método de difusión en agar y obtuvieron como resultado que la más alta actividad antibacteriana del **Geranio hiedra** se registró a una concentración de 400mg/ml y la más baja a 25mg/ml del extracto acuoso, en comparación con la Clorhexidina; con efecto similar a una concentración de 200mg/ml.⁽¹³⁾

Delgado, H; Villacrez, I. (2012). realizaron el Tamizaje Fitoquímico de las especies vegetales del Plan Operativo IMET-ESSALUD. Obteniendo los siguientes compuestos que han sido aislados de *Geranium ayavacense*. Antocianinas, antracenos, alcaloides, aceites esenciales (Geraniol), esteroides, taninos, flavonoides y Azucres reductores (Celulosa y Almidón).⁽²²⁾

Bussmann, R., Douglas, S, Pérez, F. y Díaz, D. (2008), estudiaron la actividad antibacteriana de 171 especies de plantas medicinales entre ellas al *Geranium ayavacense*, conducidos bajo condiciones de laboratorio en una clínica privada de Trujillo, Perú. Los extractos de las 171 especies fueron enfrentados contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, usando el método de difusión en agar; 14 especies fueron probadas como extractos acuosos y 78 especies como extractos alcohólicos, demostrando su actividad al menos contra una de las bacterias. Los resultados demostraron que muchas de las plantas usadas contra infecciones no tienen ninguna actividad

antibacteriana, mientras que las usadas para diversos propósitos rindieron actividad substancial. Sin embargo se debe considerar que estos remedios tradicionalmente se preparan como mixturas de diversas plantas en donde los compuestos se complementan unos con otros por lo que las pruebas biológicas necesitan ser ampliadas para cubrir tales preparaciones. ⁽¹¹⁾

Alanis, A. (2006), evaluó la actividad antibacteriana de 26 plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de la diarrea y disentería. Utilizó como método una adaptación del bioensayo descrito por Gavan y Barry. Los extractos obtenidos de las diferentes plantas medicinales fueron enfrentados a ocho cepas bacterianas enteropatógenas, entre ellas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* O157:H7. De las 26 plantas evaluadas los extractos de *Caesalpinia pulcherria*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *cocos nucifera*, *Geranium mexicanum*, *Hippocratea excelsa* y *Punica granatum* fueron activas contra todas las bacterias, además de presentar en algunas cepas los mejores porcentajes de inhibición. Con respecto a las dos cepas de *Escherichia coli*, los extractos acuosos que mostraron el mayor porcentaje de inhibición fueron los extractos de *Ch. pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* y *P. granatum*, siendo la más activa el extracto de *Geranium mexicanum* con porcentajes de inhibición superior al 50% frente a las dos cepas. ⁽³⁹⁾

Castañeda, B. Manrique, R. e Ibáñez, L.(2005), realizaron un estudio fitoquímico y farmacológico de plantas con efecto hipoglicemiante, el screening fitoquímico lo realizaron según el método descrito por **Ciulei** mientras que el efecto hipoglicemiante lo determinaron en ratas con diabetes aloxánica. Los resultados evidenciaron la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y esteroides en abundancia en el extracto metanólico de Pasuchaca mientras que los niveles de glucosa alteradas por el aloxano fueron reducidas por los extractos de Cuticuti y Pasuchaca. ⁽²¹⁾

Castro, A. Choquesillo, F. Bell, C. Palomino, R. Ramos N, Félix L y Colaboradores (2002), estudiaron metabolitos secundarios de plantas

medicinales con efecto hipoglucemiante donde determinaron el cromo como factor de tolerancia a la glucosa; concluyeron que en los extractos acuosos en caliente de: *Phyllantys niruri* L. (Chancapiedra), *Geranium dielsianum* Knut (Pasuchaca), *Gentianella alborosea* G. (Hercampure), *Otholobium pubescens* (Culen) *Smallantus sonchifolia* (Yacón), *Chlorophora tinctoria* (Mora) y *Taraxacum officinalis* W (Diente de león), donde lograron determinar vía analítica cualitativa la presencia del cromo, con el reactivo difenilcarbazida manifestándose a través de una coloración violeta o rojo. El análisis cuantitativo se determinó por Espectrofotometría de Absorción Atómica con los siguientes resultados en ppm: *Gentianella alborosea* G. (Hercampure) 0.030, *Geranium dielsianum* Knut (Pasuchaca) 0.010, *Phyllantus niruri* L. (Chancapiedra) 0.050, *Chlorophora tinctoria* (Mora) 0.027, *Taraxacum officinalis* W. (Diente de León) 0.039, *Otholobium pubescens* (Culen) 3.2321, *Smallantus sonchifolia* (Yacón) 0.041. ⁽²⁰⁾

2.2 MARCO CONCEPTUAL.

2.2.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA

Hierba silvestre que crece en la sierra del Perú por encima de los 3,000 metros sobre el nivel del mar, es uno de los legados más valiosos de nuestros ancestros del incanato como una bebida purificadora de la sangre. Sus cualidades benéficas han traspuesto las fronteras y actualmente decenas de laboratorios, nacionales y extranjeros, se dedican a su comercialización en forma micropulverizada y encapsuladas, aunque su presencia es obligada en los mercados naturistas y herbolarios.



Figura 1: *Geranium ayavacense*

Clasificación taxonómica de *Geranium ayavacense* “Pasuchaca”.

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Geraniales
Familia	:	Geraniaceae
Género	:	<i>Geranium</i>
Especie	:	<i>Geranium ayavacense</i> Willd. exH.B.K. ⁽¹⁴⁾

Distribución.

Ancash, Huánuco y Piura.

Sinonimias.

Geranium partitum Willd.

Nombres comunes.

Pasuchaca, pulipunche, andacushman.

Descripción botánica.

Hierbas perennes de raíces delgadas o demasiadas ramificadas, que están unidas a las hojas basales y numerosas ramificaciones ascendentes difusamente geniculadas. Tallos procumbentes, de varios decímetros de longitud; entre nudo aproximadamente de 15 cm de longitud, filosos, puberulentos. Hojas con muy fino indumento, orbiculares, palmadamente 7-partidas, generalmente hacia la base; lóbulos irregulares, bi o trilaciniados; las secciones laterales iguales en longitud, lineales, submucronados; hojas caulinares cortamente pecioladas con estipulas triangular-lanceoladas. Flores solitarias, axilares de 3-

10 mm de longitud, pubescentes. Sépalos ovados-oblongos, ligeramente acuminados, puberulentos y largamente ciliados. Pétalos ovobados, blanquecinos; 5 estambres. Fruto esquizocarpico de hasta 18 mm de longitud.
(14)

Características geográficas.

Suelos: arcilloso, limo-arcilloso, franco-limo-arcilloso o llanos de muy poco declive, alternando con las plantas almohadilladas o arrochetadas de la jalca o puna. ⁽¹⁴⁾

Características climáticas.

Geranium ayavacense se desarrolla bajo las siguientes condiciones climatológicas:

- ❖ Clima : Frio
- ❖ Temperatura : 5 a 22°C
- ❖ Precipitación : 500 a 2500 mm
- ❖ Humedad : 60 a 80% ⁽¹⁴⁾

Características Fito geográficas.

- ❖ Distribución altitudinal : 3000 a 4000 m.s.n.m
- ❖ Distribución latitudinal : 3° 30´-11° L.S.
- ❖ Distribución por departamentos : Piura, Ancash y Huánuco. ⁽¹⁴⁾

Características fenológicas:

- ❖ Época de floración : Mayo a Julio
- ❖ Época de fructificación : Julio a Septiembre.
- ❖ Forma de propagación : Semillas. ⁽¹⁴⁾

Componentes químicos.

- ❖ Taninos, esteroides, flavonoides, antocianinas, antraceno, compuestos reductores, celulosa, almidón. ^(15, 16)

Usos tradicionales.

▪ Propiedades medicinales:

- ❖ Febrífugo.
- ❖ Neumonía.
- ❖ Colagoga.
- ❖ Tónico hepático. ⁽¹⁴⁾

▪ Forma de uso.

- ❖ Cocción e infusión.

2.2.2 GENERALIDADES DE LOS MICROORGANISMOS ESTUDIADOS.

2.2.2.1 *Enterococcus faecalis*.

Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Lactobacillales
Familia	: Enterococcaceae
Género	: Enterococcus (ex Thiercelin&Jouhaud 1903) Schleifer&Kilpper-Bälz 1984
Especie	: <i>Enterococcus faecalis</i> (Orla-Jensen 1919). Schleifer&Kilpper-Bälz 1984

Características

Los Enterococcus son cocos Gram positivos, inmóviles y catalasa negativos. La especie Enterococcus fue introducida en la taxonomía a mediados de los años 1980. La colonización característica del aparato gastrointestinal es lo que originó el nombre dado de enterococo, aunque también se les puede aislar en la cavidad bucal, tracto genitourinario, vías respiratorias superiores y piel, también se encuentra en las superficies del entorno ambiente, en el agua y en la vegetación. Con anterioridad, los Enterococcus, se englobaban en el grupo serológico "D". A diferencia de la mayor parte de los Streptococcus, los Enterococcus son fácilmente cultivables, en muchos medios de cultivo habituales y son oportunistas clásicos que presentan un potencial patógeno relativamente escaso. ⁽¹⁷⁾

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram positiva comensal, que habita el tracto gastro intestinal de humanos y otros mamíferos. Como otras spp. del género Enterococcus, *Enterococcus faecalis* puede causar infecciones

comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital, actúa como patógeno oportunista en pacientes de avanzada edad con enfermedades subyacentes graves y en aquellos inmunocomprometidos que han estado hospitalizados por periodos prolongados, en los que se usaron dispositivos invasivos o que recibieron terapia antimicrobiana de amplio espectro. A pesar de su baja virulencia, puede ser causante de infecciones del tracto urinario, sangre, abdomen, heridas y catéteres. La existencia de enterococos se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a virtualmente todos los antibióticos en uso. Estos microorganismos se han convertido actualmente en notorios patógenos nosocomiales.⁽¹⁸⁾

Factores de patogenicidad.

Existen diferentes determinantes de patogenicidad de *Enterococcus faecalis*, entre ellos podemos mencionar: Citolisinas, factores de agregación que permite la adherencia con otros Enterococcus, proteasas como gelatinasa con actividad endopeptidasa, hialuronidasa que es un factor de difusión y actividad mucopolisacarida, AS – 48 bacteriocina activa frente a otras bacterias. Debido a que la mayoría de los enterococcus son tolerantes a la acción de los betalactámicos y glucopeptidos, es necesario la sinergia bacteriana entre algunos de estos antibióticos y un aminoglucósido para tratar las infecciones más graves.⁽¹⁹⁾

2.2.2.2 *Escherichia coli*

Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacterias
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>Escherichia coli</i> (<i>E. freundii</i>) <u>Migula</u> , 1895

Características

Escherichia coli es la bacteria más constantemente encontrada en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra sin causar daño. Por el contrario muchas cepas de *Escherichia coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas, que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas patógenas, por lo que la colonización del intestino es benéfica para el hospedero. ⁽⁴⁰⁾

La *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. ⁽⁷⁾ con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricos. ⁽⁴⁰⁾ esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *E. coli* productoras de diarrea. La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología

molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos. ⁽⁷⁾

Escherichia coli es la especie predominante de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: Infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica. ⁽⁴⁰⁾

Factores de patogenicidad.

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. El cuadro II muestra algunos serotipos más frecuentemente asociados con los grupos patógenos. ⁽⁷⁾

Al colonizar tejidos estraintestinales, *E. coli* produce procesos inflamatorios piógenos similares a otras bacterias y, en ocasiones, de mayor intensidad por los factores propios de estas bacterias. Se mencionó que es la bacteria que produce más infecciones en heridas en los hospitales. Puede infectar las vías respiratorias y las meninges, como consecuencia de una invasión a circulación sanguínea. Las septicemias por *E. coli* son muy preocupante por la gravedad de su pronóstico. ⁽⁴⁰⁾ Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas la *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia. Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por *E. coli* debido a que carecen anticuerpos IgM. La septicemia también puede presentarse como consecuencia de infección del aparato urinario. ⁽⁴¹⁾ Las infecciones urinarias son producidas por *E. coli* en más del 70% de los casos, según algunas estadísticas. Cuando hay una perforación intestinal, son las responsables de la peritonitis consecutiva a dicha lesión. ⁽⁴⁰⁾

Enfermedades causadas por *Escherichia coli*.

a) Infecciones del aparato urinario.

La *E. coli* es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable de casi 90% de las infecciones urinarias primarias en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos incluyen poliuria, disuria, hematuria y piuria. El dolor en el flanco se asocia con infección de la parte superior del aparato. Ninguno de estos síntomas o signos es específico de la infección por *E. coli*. Las infecciones urinarias pueden producir bacteriemia con signos clínicos de septicemia. ⁽⁴¹⁾

Por lo general, la *E. coli* nefropatógena produce una hemolisina. La mayor parte de las infecciones se deben a un pequeño número de tipos de antígeno O de *E. coli*. El antígeno K parece ser importante en la patogenia de la infección de la parte superior del aparato. La pielonefritis se asocia con un tipo específico de pili, los pili P, que se unen con la sustancia P del grupo sanguíneo. ⁽⁴¹⁾

b) Enfermedades diarreicas asociadas con *E. coli*.

La *E. coli* causante de diarrea es muy común en todo el mundo. Estas *E. coli* se clasifican por las características de sus propiedades de virulencia y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos delgado y grueso son codificados por genes situados en los plásmidos de manera similar, con frecuencia las toxinas son mediadas por plásmidos o por fagos. ⁽⁴¹⁾

Las enterocolitis producidas por *E. coli* se deben a los siguientes mecanismos patogénicos: 1) *E. coli* enteropatógena (EPEC); 2) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); 4) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); 5) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y; 6) *E. coli* difusamente adherente (DAEC). ⁽⁴⁰⁾

***E. coli* enteropatógena**

Tiene distribución mundial, se relaciona con brotes de diarrea en guardanías y hospitales infantiles en verano. En el intestino se adhiere de manera localizada a las células del epitelio, causando señales de transducción asociadas con los cambios producidos por la adherencia íntima de la bacteria. ⁽⁴⁰⁾

La transmisión es fecal-oral, coloniza el intestino delgado, por adherencia localizada a través de fimbrias BFP, forma en el enterocito un pedestal y se adhiere herméticamente a la superficie de la mucosa del intestino delgado y grueso. La adherencia a las células epiteliales induce señales de transducción y genera incremento en los niveles de calcio intracelular, que inhibe la absorción de sodio y cloro intestinal, produce acumulación de actina polimerizada debajo del sitio de adhesión con disolución del glicocálix y aplanamiento de la microvellosidades. La activación de la cinasa conduce a cambios en la secreción de agua y electrolitos. La bacteria se adhiere íntimamente con la membrana epitelial, lo cual conduce a la disrupción del citoesqueleto. ⁽⁴⁰⁾

El diagnóstico se hace mediante cultivo a partir de las heces y la serotipificación de las cepas aisladas. En el estudio del moco fecal a veces se encuentran leucocitos polimorfonucleares, aunque con la prueba de lactoferrina son más frecuentemente positivos. Actualmente se reconocen 13 serotipos O y 56 serogrupos H. ⁽⁴⁰⁾

El tratamiento consiste en la corrección de la deshidratación y en formas severas el uso de antimicrobianos, como aminoglucósidos, gentamicina, colimicina, neomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y subsalicilato de bismuto. ⁽⁴⁰⁾

***E. coli* enterotoxigénica**

Es causa común de diarrea en países en vías de desarrollo y diarrea leve a moderada-severa en lactantes. Produce un síndrome similar al cólera en adultos, y origina la diarrea del viajero. A demás provoca daño mediante su

adhesión y producción de enterotoxinas termolábiles y/o termoestables. La termolábil estimula la adenilciclase, que activa la proteína quinasa, dependiente de AMPc. Esto da como resultado la salida de líquidos y electrolitos dentro de la luz intestinal, por incremento de la permeabilidad que invierte el flujo de líquidos hacia este sitio. Mientras, la termoestable actúa sobre la guanilato ciclase, alterando la absorción de cloro y sodio, que se acumula en la luz intestinal. ⁽⁴⁰⁾

Las manifestaciones clínicas inician con distensión abdominal, y posteriormente diarrea acuosa, comúnmente sin fiebre, dolor abdominal y vomito frecuente. Las evacuaciones no presentan moco, pus, sangre ni leucocitos y generalmente son más de diez evacuaciones al día. ⁽⁴⁰⁾

Cuando *E. coli* ha colonizado el intestino, se une a las membranas celulares intestinales y elabora una o más enterotoxinas. La enterotoxina termolábil es una proteína de peso molecular elevado, oligomérica, constituida por una subunidad A y cinco subunidades B idénticas. Inmunológicamente esta relaciona con la toxina del cólera en cuanto a su estructura, antigenicidad y mecanismo de acción. Las enterotoxinas termoestables son proteínas de bajo peso molecular, monoméricas, y con múltiples residuos de cistina; mientras que los enlaces disulfuro le confieren su termoestabilidad. ⁽⁴⁰⁾

El diagnóstico microbiológico consiste en el aislamiento de *E. coli* de heces y también se debe realizar la detección de toxinas. Para la identificación de la toxina termoestable se encuentra disponible comercialmente métodos por RIA y ELISA. La toxina termolábil se identifica mediante ensayos inmunológicos como ELISA, aglutinación en látex, aglutinación en látex reversa pasiva, prueba de radioinmunoensayo enzimático y coaglutinación. ⁽⁴⁰⁾

En todos los grupos de edad el tratamiento está dirigido al reemplazo de líquidos y electrolitos, ya que la enfermedad se autolimita por sí sola en casi todos los pacientes, a la semana de haberse instalado. Solo en casos de deshidratación severa el paciente deberá ser hidratado rápidamente por vía intravenosa. La combinación de trimetoprim-sulfametoxazol más loperamida, o

ciprofloxacina y ofloxacina, han sido efectivas en el tratamiento de diarrea del viajero en adultos, sin embargo esto no es válido para el paciente pediátrico, por las restricciones de uso de la loperamida y las quinolonas en estas edades. (40)

***E. coli* enterohemorrágica**

El reconocimiento de estas cepas se derivó de observar la asociación entre los cuadros de diarrea con colitis hemorrágica en dos brotes y el serotipo inusual en ese tiempo – *Escherichia coli* O157:H7 – con vinculación clínica posterior al síndrome urémico hemolítico en humanos. (40)

Es uno de los patógenos más frecuentes entre los casos de diarrea con sangre. Se ha encontrado que los pacientes que presentan este tipo de diarrea tienen mayor probabilidad de desarrollar el síndrome urémico hemolítico. El principal reservorio es el tracto intestinal del ganado vacuno y la carne contaminada (sobre todo en carne para hamburguesas) – cocinada deficientemente. Otros animales también pueden ser reservorios, entre los que se incluyen las ovejas, cerdos, perros, pollos y gaviotas. La transmisión más importante es por alimento o agua y de persona a persona. (40)

Produce verotoxina, así denominada por su efecto citotóxico sobre las células vero, una línea de células renales del mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina. La *E. coli* enterohemorrágica se ha asociado con colitis hemorrágica, una variedad grave de diarrea. (41)

El periodo de incubación es de aproximadamente cuatro días (uno a ocho días). La enfermedad se caracteriza por un síndrome con notable diarrea acuosa, inicialmente sin sangre, dolor abdominal y fiebre de corta duración. Se ha reportado vomito en la mitad de los pacientes. En los días siguientes, la diarrea es sanguinolenta, copiosa, se incrementa el dolor abdominal tipo cólico y comúnmente es afebril. El promedio de duración de la enfermedad es de diez días, con resolución sin secuelas aparentes, pero puede progresar al síndrome urémico hemolítico, que comprende un grupo de alteraciones: anemia

hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda, que pueden ocurrir simultáneamente. ⁽⁴⁰⁾

En el estudio del moco fecal, los polimorfonucleares se encuentran presentes en menos del 50% de los pacientes. En la rectosigmoidoscopia se observa una combinación de eritema y edema con una mucosa friable. En el enema baritado se observan “espasmos” del colon ascendente y transversal, lo que traduce el edema de la submucosa. Debido a que estos organismos son rápidamente eliminados del tubo digestivo, la oportunidad de detectarlos disminuye en relación con el tiempo de toma de la muestra, por lo que es recomendable tomarla antes de los cinco a siete días de la enfermedad. ⁽⁴⁰⁾

La utilidad de uso de antibióticos no ha sido completamente estudiada, pero es factible que el trimetoprim-sulfametoxazol pueda reducir la severidad y duración de la enfermedad. El empleo de fosfomicina se ha asociado con la disminución del riesgo de presentar síndrome urémico hemolítico, pero los resultados aún no son conclusivos. Los agentes anti-motilidad, como la loperamida, están condicionados. ⁽⁴⁰⁾

***E. coli* enteroinvasiva**

Tiene la capacidad de colonizar el epitelio de la mucosa, producir necrosis focal con desprendimiento de mucosa y lesiones sangrantes que se manifiestan por materias fecales de color oscuro. Este grupo de cepas de *E. coli* produce la enfermedad gastrointestinal por su capacidad de invadir las células del epitelio intestinal, donde posteriormente se multiplican y causan daño. ⁽⁴⁰⁾

Produce una enfermedad muy similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta más comúnmente en los niños de los países en desarrollo y en las personas quienes viajan a dichos países. Igual que la *Shigella*, las cepas de *E. coli* enteroinvasiva no fermentan la lactosa o la fermentan tardíamente y carecen de motilidad. ⁽⁴¹⁾

Se transmite de persona a persona. Afecta más a escolares, adolescentes y adultos, raramente a lactantes, y su distribución es mundial. Tiene predilección por la mucosa colónica. Una vez que penetra las células epiteliales, parece que se multiplica localmente en forma intracelular. Lo anterior condiciona la lisis de las vacuolas endocíticas, con movimiento direccional bacteriano a través del citoplasma y extensión a las células epiteliales adyacentes. ⁽⁴⁰⁾

Clínicamente, los datos claves para el diagnóstico son el síndrome febril y disenteriforme. El estudio del moco fecal muestra gran cantidad de leucocitos fecales de tipo polimorfonuclear. La única forma de obtener el diagnóstico específico es mediante el cultivo de heces, pero la diferenciación con *Shigella* u otra especie patógena de *E. coli* es difícil. ⁽⁴⁰⁾

El reemplazo de líquidos es una medida terapéutica en diarrea por *E. coli* enteroinvasiva, en caso de deshidratación. La terapia antibiótica recomendada es la misma que se emplea por los casos de *Shigella*. ⁽⁴⁰⁾

***E. coli* enteroagregativa**

Causa diarrea aguda y crónica en personas de los países en desarrollo. Estos organismos también son causantes de enfermedades producidas por alimentos contaminados, en países industrializados. Se caracteriza por su patrón de adherencia a células humanas. ⁽⁴¹⁾

Las cepas de *E. coli* enteroagregativa se adhieren a la mucosa intestinal y favorecen la secreción del moco, atrapando a las bacterias en la película mucosa. La adherencia de los organismos al moco se ha demostrado *in vitro* y en voluntarios, aunque su papel en la patogenia es incierto. La infección por *E. coli* enteroagregativa se acompaña por efectos citopáticos sobre la mucosa intestinal, se acortan las vellosidades, hay necrosis en las puntas vellosas, una respuesta inflamatoria leve, y edema e infiltración mononuclear de la submucosa. Las evidencias histopatológicas y moleculares sugieren que las cepas enteroagregativas elaboran una citotoxina que conduce al daño celular. ⁽⁴⁰⁾

Cuadro clínico: se ha reportado la presencia de diarrea acuosa, mucoide, de tipo secretor, comúnmente sin sangre (solo en una tercera parte de la población se presenta con sangre), de volumen escaso y asociada con fiebre de baja intensidad y raramente vomito. La deshidratación es frecuente. ⁽⁴⁰⁾

Diagnóstico: la enfermedad debe sospecharse en casos de brotes, cuando la cepa de *E. coli* identificada pertenezca al serotipo O44:H18; y ante cuadros de diarrea persistente, con cultivos positivos seriados y predominancia del organismo. En el estudio de citología del moco del moco fecal no se detectan polimorfonucleares. ⁽⁴⁰⁾

Tratamiento: es común la resistencia a los antibióticos y el tratamiento aún no ha sido determinado. ⁽⁴⁰⁾

***E. coli* difusamente adherente**

Estas cepas de *Escherichia coli* fueron consideradas como una categoría independiente de *E. coli* enteropatogénica diferente a las enteroagregativas, por lo que las denominan difusamente adherentes. ⁽⁴⁰⁾

En la actualidad, no está completamente demostrada la asociación estadísticamente significativa de esta cepa con alguna enfermedad. Se le ha encontrado en niños de edades entre uno y cinco años (pero no menores de esta edad). Se desconocen las razones de la predilección por la edad y los mecanismos de transmisión. En Francia se ha reportado entre pacientes hospitalizados, por lo que se considera que puede ser un patógeno importante en los países desarrollados. ⁽⁴⁰⁾

En el estudio del moco fecal no se detectan leucocitos fecales. El diagnóstico de laboratorio se basa en la demostración del patrón característico de adherencia de tipo difusamente adherente. Se han utilizado fragmentos de polinucleótidos derivados del gen *daaC* (empleado como sonda) en técnicas de sonda de ADN, identificado falso positivos.

c) Septicemia

Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, la *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia. Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por *E. coli* debido a que carecen de anticuerpos IgM. La septicemia también puede presentarse como consecuencia de infección del aparato urinario. ⁽⁴¹⁾

d) meningitis

La *E. coli* y los estreptococos del grupo B son las principales causas de meningitis en los lactantes. Casi 75% de la *E. coli* procedente de casos de meningitis posee el antígeno K1, el muestra reacción cruzada con el polisacárido capsular del grupo B de la *N. meningitidis*. El mecanismo de virulencia asociado con el antígeno K1 aún no se comprende. ⁽⁴¹⁾

2.2.2.3 *Staphylococcus aureus*

Taxonomía

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Cocci
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus Rosenbach 1884
Especie	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Características

Reconocidos por primera vez por Koch en 1878, descritos y cultivados por Pasteur en 1880, son bacterias en forma de grano que se agrupan en racimos,

de lo cual se deriva su nombre. Son Gram positivos, no forman esporas, *pilis* ni flagelos; algunas cepas pueden formar capsulas en condiciones especiales y son aerobios y anaerobios. ⁽⁴⁰⁾

El género *staphylococcus* comprende actualmente 32 especies y quince subespecies. ⁽⁴⁰⁾ Las tres de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. El primero es coagulasa-positivo, que lo diferencia de otras especies. ⁽⁴¹⁾. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas. ⁽⁸⁾

La importancia médica de esta bacteria radica en que es el agente etiológico de un gran número de infecciones en el hombre. Pueden producir procesos inflamatorios supurativos en casi cualquier tejido, los cuales son desde muy leves, hasta de alta gravedad y muerte, además son fabricantes de toxinas que provocan cuadros clínicos de muy diversas manifestaciones. Otro aspecto muy importante es que con gran facilidad pueden desarrollar resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es de gran peligro. Sobre todo en enfermos hospitalizados e infectados por cepas hospitalarias, altamente resistentes. ⁽⁴⁰⁾

Factores de patogenicidad

El *Staphylococcus aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis ⁽⁹⁾. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres. ⁽¹⁰⁾

El prototipo de una lesión estafilocócica es el forúnculo y otros abscesos localizados. Los grupos de *S. aureus* establecidos en un forúnculo piloso conducen a necrosis tisular (factor dermonecrosante). Se produce coagulasa que solidifica fibrina alrededor de la lesión y dentro de los linfocitos; como resultado se forma una pared que limita el proceso; esta se refuerza por la acumulación de células inflamatorias y más tarde de tejido fibrosos. En el centro de la lesión el tejido necrosado sufre licuefacción (incrementada por hipersensibilidad tardía) y los abscesos “apuntan” en la dirección de menor resistencia. El drenaje del líquido central del tejido necrosado va seguido por llenado lento de la cavidad con tejido de granulación y por último cicatrización. ⁽⁴¹⁾

Los estafilococos también causan enfermedad por las toxinas que elaboran, sin infección invasora aparente. La exfoliación bulosa, el síndrome de piel escaldada, se atribuye a la producción de toxina exfoliativa. El síndrome de choque tóxico se relaciona con la toxina-1 del síndrome de choque tóxico. ⁽⁴¹⁾

Datos clínicos

Una infección estafilocócica localizada se presenta como un “grano”, infección de un folículo piloso, o absceso. Frecuentemente hay una reacción inflamatoria intensa, localizada y dolorosa, que muestra supuración central y cicatriza con rapidez cuando el pus se drena. La pared de fibrina y las células que rodean el centro del absceso tienden a evitar la propagación de los microorganismos y no deben romperse por manipulación o traumatismo. ⁽⁴¹⁾

La infección con el *S. aureus* también puede resultar de la contaminación directa de una herida, por ejemplo, infección por estafilococo de las heridas posoperatorias o infección después de traumatismo (osteomielitis crónica subsecuente a fractura abierta, meningitis después de fractura del cráneo). ⁽⁴¹⁾

Si el *S. aureus* se disemina y sobreviene bacteriemia pueden producirse endocarditis, osteomielitis hematógena aguda, meningitis o infección

pulmonar. Los cuadros clínicos correspondientes semejan los observados en otras infecciones de origen hematógeno. La localización secundaria dentro de un órgano o sistema se acompaña de síntomas y signos de la difusión del órgano y de intensa supuración focal. ⁽⁴¹⁾

El síndrome de choque tóxico se manifiesta por inicio brusco de fiebre alta, vómito, diarrea, mialgia, erupción escarlatiniforme e hipotensión con insuficiencia cardíaca y renal en los casos más graves. Con frecuencia se presenta en los primeros cinco días de la menstruación en mujeres jóvenes que usan tampón, pero también en niños o en varones con infección estafilocócica en las heridas. El síndrome puede recidivar. El *S. aureus* asociado con el síndrome de choque tóxico se puede encontrar en la vagina, tampones, heridas, en otras infecciones localizadas o en la garganta, pero casi nunca en el torrente sanguíneo. ⁽⁴¹⁾

Diagnóstico

Se basa en el hallazgo de la bacteria y su identificación en el laboratorio. El estudio bacteriológico de las muestras de las lesiones comprende estudio bacterioscópico y cultivo. Es estudio bacterioscópico debe practicarse en todos los casos porque se puede obtener el resultado en unos cuantos minutos, y con esta orientación hacer el tratamiento de inmediato. ⁽⁴⁰⁾

El cultivo se hace en agar sangre de carnero, agar *staphylococcus* 110, agar nutritivo, agar manitol sal, caldo nutritivo, caldo con infusión de cerebro y corazón, etc. De estos, preferimos el agar sangre de carnero, el agar *Staphylococcus* 110 y agar manitol sal. ⁽⁴⁰⁾

La mayoría de la especie son anaerobios facultativos. Cuando se desarrollan en aerobiosis tiene un sistema completo de citocromos, pero en anaerobiosis fermentan azúcares con producción de ácido láctico, pero no de gas. En agar sangre las colonias son redondas de 1 a 3 mm. de diámetro, convexas, de color blanco o con un tinte ligeramente amarillento. Generalmente las de tinte

amarillento se encuentran rodeadas por una zona de hemolisis y corresponden a *Staphylococcus aureus*.⁽⁴⁰⁾

Tratamiento

El antimicrobiano de primera elección es aquel que sea resistente a las betalactamasas, ya que cerca del 50% de las cepas actualmente son productoras de estas enzimas. La metilcilina se ha convertido en un indicador de resistencia, ya que las cepas metilcilino resistentes son poco vulnerables a varios antimicrobianos. Los antimicrobianos que se utilizan son: dicloxacilina, cefalosporinas, vancomicina, teicoplanina, linesolid (oxizolidononas) y ketólidos, además, se pueden asociar aminoglucósidos como amikacina y netilmicina, con lo que se logra sinergia. Muchas de las lesiones en los tejidos blandos, aparte del tratamiento antimicrobiano, requieren de manejo quirúrgico para el drenaje del material purulento.⁽⁴⁰⁾

2.3 DEFINICIONES OPERACIONALES.

2.3.1 VARIABLES.

2.3.1.1 Variable Independiente:

- ❖ Extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*.

2.3.1.2 Variable Dependiente:

- ❖ Actividad antibacteriana de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

2.3.1.3 Variable interviniente:

- ❖ Cepas bacterianas puras de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

2.3.2 INDICADORES.

2.3.2.1 Indicadores de la variable independiente:

- ❖ Concentración del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*.

2.3.2.2 Indicadores de la variable dependiente:

- ❖ Halo de inhibición producido por los discos de sensibilidad.
- ❖ Presencia de precipitado en el fondo del tubo de ensayo.
- ❖ Turbidez del medio de cultivo.

2.3.2.3 Indicadores de la variable interviniente:

- ❖ Crecimiento bacteriano.

2.3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE (X)

CUADRO N° 01

VARIABLE INDEPENDIENTE (X)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Extracto acuoso de liofilizado de <i>Geranium ayavacense</i> .	Producto de la extracción por decocción de la especie vegetal para luego ser congelado y liofilizado.	Producto obtenido por un proceso de liofilización, el que se utilizará para elaborar soluciones a diferentes concentraciones.	Concentración del extracto acuoso liofilizado de <i>Geranium ayavacense</i> .	<p>1. Prueba de sensibilidad: Concentración de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900mg/ml.</p> <p>2. Prueba de sensibilidad: Concentración de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25mg/ml</p>	<p>Intercalar.</p> <p>Tipo cuantitativo.</p>

2.3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE (Y)

CUADRO N° 02

VARIABLE DEPENDIENTE (Y)	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	INDICE	ESCALA
Actividad antibacteriana de <i>Geranium ayavacense</i> sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Capacidad de una sustancia cualquiera para inhibir el crecimiento y/o producir la muerte de una o más bacterias.	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidad bacteriana Grado de susceptibilidad de los microorganismos frente al extracto de la especie vegetal en estudio, con la formación de un halo de inhibición. Concentración inhibitoria mínima Es la mínima concentración con la cual el extracto de la especie vegetal en estudio es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos. 	<p>Diámetro en milímetros (mm) del halo inhibición.</p> <p>Presencia de precipitado en el fondo del tubo de ensayo.</p> <p>Turbidez del medio de cultivo.</p>	<p>1. Grado de sensibilidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> Inactivo <40% Poco activo 40-50% Moderado activo 51-75% Buena actividad >76% <p>2. Capacidad inhibitoria.</p> <ul style="list-style-type: none"> Inactivo >16mg/ml Poco activo 6-15mg/ml Moderado activo 1-5mg/ml Buena actividad <1mg/ml 	<p>Intercalar</p> <p>Tipo cuantitativo</p>

2.3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INTERVINIENTE.

CUADRO N° 03

VARIABLE INTERVINIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	ESCALA	CATEGORIA
Cepas bacterianas puras de <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Bacterias que han sido aisladas, identificadas, purificadas y clasificadas según la clasificación ATCC.	Crecimiento bacteriano	<ul style="list-style-type: none"> • Cepa pura de <i>Escherichia coli</i>. • Cepa pura de <i>Enterococcus faecalis</i> • Cepa pura de <i>staphylococcus aureus</i>. 	Cualitativa Nominal

2.4 HIPÓTESIS.

El extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, tiene actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1 TIPO DE ESTUDIO.

- ❖ **Experimental:** Se controló deliberadamente las variables para delimitar relaciones entre ellas. Se recopiló datos para comparar las mediciones de comportamiento de un grupo experimental, con las mediciones de un grupo control.

- ❖ **Analítico:** Se estableció relaciones entre las variables dependientes e independientes con la finalidad de obtener diversas conclusiones.

- ❖ **Prospectivo:** En el registro de información se tomó en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

- ❖ **Longitudinal:** Se estudió las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.

3.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

En el presente estudio se utilizó un muestreo aleatorio simple, y se distribuyó aleatoriamente las concentraciones del extracto acuoso sobre los microorganismos objeto de estudio, teniéndose en cuenta los siguientes parámetros fisicoquímicos:

- ❖ Esterilización de laboratorios con luz ultravioleta durante 2 horas.
- ❖ Medios de cultivos con pH de 7.2 – 7.4.
- ❖ Autoclavado a 121°C y 1 atm de presión por 15min.
- ❖ Conservación de las cepas bacterianas en refrigeradoras (4-8°C).

- ❖ Siembra de los cultivos en cabinas de bioseguridad (flujo de aire entre 45 – 55 pies/min.)
- ❖ Incubación de las placas en incubadoras a 35 - 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 18-24 horas.

3.3 MÉTODO.

3.3.1 Método de difusión en medio sólido.

Prueba de sensibilidad para *Staphylococcus aureus*.

- ❖ Medio de cultivo: Agar Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Suspensión de la colonia de *Staphylococcus aureus* en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en Agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
- ❖ Grupos experimentales: Extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900mg.
- ❖ Grupo control positivo: Gentamicina de 10ug.
- ❖ Grupo control negativo: Agua destilada.

Prueba de sensibilidad para *Enterococcus faecalis*.

- ❖ Medio de cultivo: Agar Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Suspensión de la colonia de *Enterococcus faecalis* en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

- ❖ Grupos experimentales: Extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900mg.
- ❖ Grupo control positivo: Gentamicina de 10ug.
- ❖ Grupo control negativo: Agua destilada.

Prueba de sensibilidad para *Escherichia coli*.

- ❖ Medio de cultivo: Agar Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Suspensión de la colonia de *Escherichia coli* en solución salina al 0.9 % a partir de un cultivo en agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
- ❖ Grupos experimentales: Extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900mg.
- ❖ Grupo control positivo: Gentamicina de 10ug.
- ❖ Grupo control negativo: Agua destilada.

3.3.2 Concentración inhibitoria mínima.

Prueba para determinar la concentración inhibitoria mínima de *Staphylococcus aureus*.

- ❖ Medio de cultivo: Caldo Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Dilución al 1% de la suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* en solución salina al 0.9% a partir de un cultivo en agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

- ❖ Grupos experimentales: Tubos de ensayo conteniendo el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25mg/ml.
- ❖ Grupo control: Tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo y el inóculo bacteriano.

Prueba para determinar la concentración inhibitoria mínima de *Enterococcus faecalis*.

- ❖ Medio de cultivo: Caldo Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Dilución al 1% de la suspensión bacteriana de *Enterococcus faecalis* en solución salina al 0.9% a partir de un cultivo en agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
- ❖ Grupos experimentales: Tubos de ensayo conteniendo el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25mg/ml.
- ❖ Grupo control: Tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo y el inóculo bacteriano.

Prueba para determinar la concentración inhibitoria mínima de *Escherichia coli*.

- ❖ Medio de cultivo: Caldo Mueller Hinton.
- ❖ Inóculo: Dilución al 1% de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* en solución salina al 0.9% a partir de un cultivo en agar Tripticasa de Soya de 18 – 24 h de incubación. Ajustando la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
- ❖ Grupos experimentales: Tubos de ensayo conteniendo el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25mg/ml.

- ❖ Grupo control: Tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo y el inóculo bacteriano.

3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA.

3.4.1 Población vegetal.

- ❖ Constituido por el conjunto de plantas de *Geranium ayavacense*.

Muestra vegetal.

- ❖ 1kg del pulverizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*.

Criterios de inclusión.

- ❖ Plantas adultas.
- ❖ Plantas sanas.
- ❖ Plantas en buen estado de conservación.
- ❖ Plantas libre de excremento animal.

Criterios de exclusión.

- ❖ Plantas infestadas por microorganismos.
- ❖ Plantas secas o en mal estado de conservación.
- ❖ Plantas con resto de excremento animal.

3.4.2 Población bacteriana.

- ❖ El estudio se realizó en cepas bacterianas puras de, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923, provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

Muestra bacteriana.

- ❖ Colonias de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*; que se emplearán para la preparación del inóculo bacteriano.

Criterios de inclusión.

- ❖ Colonias que reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- ❖ Colonias con resultado positivo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.

Criterios de exclusión.

- ❖ Colonias que no reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- ❖ Colonias con resultado negativo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.
- ❖ Colonias con presencia de contaminantes.

3.5 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICA E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

3.5.1 Procedimiento de recolección de datos.

3.5.1.1 Recolección de la muestra vegetal.

- ❖ La planta entera de *Geranium ayavacense*, fue colectada en el distrito de Huaraz perteneciente al departamento de Ancash.

3.5.1.2 Preparación del pulverizado vegetal.

- ❖ Se usó la planta entera.
- ❖ Se cortó en pequeños fragmentos.
- ❖ Luego, se secó al medio ambiente x 5 días.
- ❖ Se volvió a pesar y luego se procedió a pulverizar, haciendo uso de una licuadora de cuchillas de acero inoxidable.
- ❖ El pulverizado se guardó en frascos oscuros para su utilización posterior.

3.5.1.3 Preparación de extracto acuoso.

- ❖ Se llevó a cabo mediante la cocción del pulverizado de la planta entera a una temperatura entre 70-80 °C, durante dos horas, empleando como liquido extractivo el agua; luego se filtró con algodón y se dejó en refrigeración por tres días para que sedimente, luego se eliminó el sedimento, se filtró y concentró a una determinada temperatura.

3.5.1.4 Liofilización.

- ❖ Se colocó las muestras en frascos especiales que soportan grandes presiones.

- ❖ Se congeló las muestras a una temperatura de -42°C .
- ❖ Luego se colocó en el equipo de Liofilización por un tiempo de 72 horas.
- ❖ Se retiró para su conservación al medio ambiente.

3.5.1.5 Preparación de los extractos a diferentes concentraciones.

- ❖ Se procedió hacer el cálculo de las concentraciones para cada extracto a utilizar.
- ❖ Se pesó 2.5 gr. de extracto liofilizado y se disolvió en 2.5 ml. de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/ml.
- ❖ A partir de esta solución stock se procedió a preparar las siguientes concentraciones: 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400mg/ml, 500mg/ml, 600mg/ml, 700mg/ml, 800mg/ml y 900mg/ml.

3.5.1.6 Preparación de los discos de sensibilidad con el extracto vegetal.

- ❖ Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman N° 3 y se empleó un perforador convencional. Estos discos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmosfera de presión por 15 minutos.
- ❖ Luego, se procedió agregar a cada uno de los discos 10 μl de las concentraciones de los extractos vegetales, las que se dejaron secar a 45°C por espacio de 24 horas.

3.5.1.7 Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland).

- ❖ Se agregó 0,5 ml de una solución de BaCl_2 0,048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175% P/V) a 99,5mL de una solución de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.

- ❖ Se verificó la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625nm sea de 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.
- ❖ Luego se distribuyó de 4 ml a 6 ml en tubos de ensayo con tapa de rosca o tapón de jebe, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- ❖ Se ajustó bien las tapas o tapones, anotó la fecha de preparación y almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente.
- ❖ Antes de ser usado se agitó vigorosamente utilizando en un agitador mecánico.
- ❖ Se verificó mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, para el control respectivo.

3.5.1.8 Preparación del Agar Nutritivo.

- ❖ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 23gr en 1lt de agua destilada.
- ❖ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.
- ❖ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ❖ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ❖ Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se dejó solidificar en forma de pico de flauta.
- ❖ Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 6.8 ± 0.2 a temperatura ambiente.

3.5.1.9 Preparación del Agar Trypticasa de Soya.

- ❖ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 40gr en 1lt de agua destilada.

- ❖ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.
- ❖ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ❖ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ❖ Luego se repartió el medio en placas Petri y se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- ❖ Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.3 ± 0.2 a temperatura ambiente.

3.5.1.10 Preparación del Caldo Trypticasa de Soya.

- ❖ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 30gr en 1lt de agua destilada.
- ❖ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el polvo.
- ❖ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ❖ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ❖ Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se dejó reposar a temperatura ambiente.
- ❖ Se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.3 ± 0.2 a temperatura ambiente.

3.5.1.11 Preparación del Agar Mueller Hinton.

- ❖ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 34gr en 1lt de agua destilada.
- ❖ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.
- ❖ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ❖ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.

- ❖ Luego se repartió el medio en placas Petri colocando entre 25 a 30ml del medio para las placas de 100mm de diámetro interno, de manera que el grosor del agar en la placa fue de 4mm.
- ❖ Se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- ❖ Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.

3.5.1.12 Preparación del Caldo Mueller Hinton.

- ❖ Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 21gr en 1lt de agua destilada.
- ❖ Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el polvo.
- ❖ A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- ❖ Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- ❖ Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se dejó reposar a temperatura ambiente.
- ❖ Se midió el pH, el valor del mismo se encontró entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.

3.5.1.13 Selección de los discos de sensibilidad antibiótica (control positivo)

La selección del antibiótico que se utilizó como control positivo se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- ❖ Eficacia clínica documentada.
- ❖ Representatividad de una familia de antibióticos.
- ❖ Disponibilidad de criterios técnicos fiables para la determinación *in vitro* de su eficacia clínica.
- ❖ Estabilidad de la molécula en los discos para antibiograma.

- ❖ Presencia en el mercado nacional.
- ❖ Importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana.

3.5.1.14 Preparación del inóculo.

- ❖ Se seleccionó cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en placa.
- ❖ Se procedió a tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfirió a un tubo que contiene de 4 a 5ml de Caldo Trypticase de Soya.
- ❖ Se incubó el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta alcanzar la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- ❖ Luego se ajustó la turbidez del inóculo con una solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se usó una luz apropiada y se observó los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- ❖ La suspensión preparada contiene aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL.

3.5.1.15 Inoculación de las Placas.

- ❖ Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.
- ❖ Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 1). Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a

temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

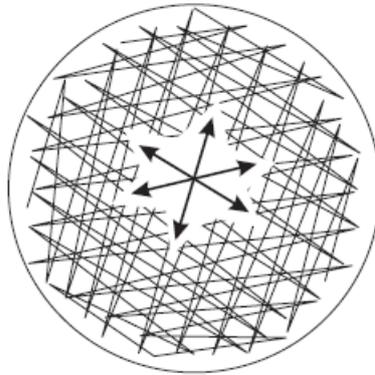


Figura 1. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.

3.5.1.16 Aplicación de los discos.

- ❖ Se colocó los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
- ❖ Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). Se colocaron 5 discos en la placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición.

3.5.1.17 Incubación.

- ❖ Se incubó las placas en posición invertida entre 35°C – 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.
- ❖ Luego del tiempo recomendado de incubación (Anexo 1) se examinó cada placa y midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

3.5.1.18 Lectura de las placas e interpretación de los resultados.

- ❖ Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Se observó la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.
- ❖ El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.

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

Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

TABLA N° 01

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	<40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	>76%

3.5.1.19 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.

- ❖ El ensayo se realizó empleando un inóculo diluido al 1% de la cepa estandarizada, este inóculo contiene aproximadamente 106 UFC/ml.
- ❖ Se preparó una solución madre del extracto vegetal liofilizado a una concentración de 5.120mg/ml.
- ❖ Se organizó una batería de 12 tubos de ensayo de los cuales en el primer tubo se depositó 1.8ml de caldo Mueller Hinton y en los otros 11 tubos se depositó 1ml del mismo caldo.
- ❖ Se añadió 0.2 ml. de la solución madre al tubo que contiene 1.8 ml. de caldo. A partir de este tubo se preparó diluciones dobles seriadas tomando 1 ml. del 1er. tubo (512mg/ml) transfiriéndolo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se depositó 1ml al tercer tubo (128mg/ml.) y así sucesivamente hasta el tubo 12, del cual se tomó 1ml. y se descartó.
- ❖ Se añadió a cada tubo 1ml del inóculo que contiene aproximadamente 106ufc/ml.
- ❖ Se incubó los tubos a 35 - 37°C durante 18 horas y luego se procedió a determinar la C.M.I.

Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración mínima inhibitoria.

TABLA N° 02

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA
Inactivo	>16 mg/ml
Poco activo	6 – 15 mg/ml
Moderado activo	1 – 5 mg/ml
Buena actividad	< 1 mg/ml

3.6 MATERIALES E INSTRUMENTOS.

3.6.1 Material vegetal.

- ❖ Especie vegetal *Geranium ayavacense*.

3.6.2 Material biológico.

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

3.6.3 Equipos

- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Cámara de reflujo laminar
- ❖ Cámara fotográfica Digital.
- ❖ Campana de Seguridad
- ❖ Cocina eléctrica
- ❖ Estufa de cultivo a 35°C
- ❖ Horno para esterilización
- ❖ Mechero de vidrio de alcohol.
- ❖ Refrigerador de 2-8°C
- ❖ Agitador magnético
- ❖ Espectrofotómetro

3.6.4 Medios de cultivo y reactivos químicos.

- ❖ Agar Nutritivo.
- ❖ Agar Tripticasa de Soya.
- ❖ Caldo Tripticasa de Soya.
- ❖ Agar Mueller Hilton.
- ❖ Caldo Mueller Hinton.
- ❖ Cloruro de Bario.
- ❖ Ácido sulfúrico concentrado.
- ❖ Cristal violeta.
- ❖ Lugol.
- ❖ Acetona.
- ❖ Safranina.
- ❖ Fucsina básica.
- ❖ Etanol q.p.
- ❖ Etanol 96 %.

3.6.5 Materiales de laboratorio.

- ❖ Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc
- ❖ Pipetas 1 y 10 cc
- ❖ Placas petri de 10 cm.
- ❖ Placas petri de 4 cm.
- ❖ Tubos de ensayo.
- ❖ Asa de inoculación.
- ❖ Disco de sensibilidad.
- ❖ Discos estériles de 6 mm de diámetro.

- ❖ Embudos de vidrio.
- ❖ Espátula mediana.
- ❖ Guantes quirúrgicos N° 7 ½
- ❖ Gradillas para tubos de ensayo.
- ❖ Hisopos estériles.
- ❖ Mascarillas descartables.
- ❖ Papel filtro Whatman N° 3.
- ❖ Tips descartables.
- ❖ Micropipetas automáticas de 250, 500 y 1000 ul.
- ❖ Marcador indeleble.
- ❖ Papel toalla.
- ❖ Tijeras.
- ❖ Vernier o regla graduada en mm.

3.7 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.

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

- ❖ Se calculó la media y la desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, obtenido el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, que se presentan mediante tablas y gráficos. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$; aplicando el programa SPSS versión 17.0 y las diferencias entre las medidas de los grupos fueron analizadas mediante el test de comparación múltiple. Valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.
- ❖ Se calculó el porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado *Geranium ayavacense* en la prueba de actividad antimicrobiana por el

método de disco difusión, estos valores se presentan en tablas, gráficos y clasificados de acuerdo a las especificaciones del cuadro 2.

- ❖ Las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas del extracto liofilizado de *Geranium ayavacense*, se presentan en tablas y gráficos para facilitar la visualización y están clasificados de acuerdo a las especificaciones del cuadro 3. Se realizó el análisis de varianza (ANVA) utilizando el programa estadístico SPSS v 17.0 y las diferencias entre las medidas de grupos se analizaron mediante el test de comparación múltiple. Valor $p < 0.05$ se considerado como significativo.

3.8 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

El personal involucrado en los diferentes procesos aplicó las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad, aplicable al personal, uso y desecho de sustancias y materiales, acceso a los locales , y el medio ambiente. Las bacterias que fueron objeto de ensayo en el presente trabajo de investigación se trabajaron en un nivel 2 de bioseguridad.

Las principales medidas de bioseguridad incluyen:

- ❖ Ingreso restringido al laboratorio.
- ❖ Utilizar siempre guardapolvo o mandilones de laboratorio en la zona de trabajo.
- ❖ El guardapolvo no debe de salir de la zona del laboratorio, salvo para enviarlo a lavar.
- ❖ Está prohibido comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicarse cosméticos en el laboratorio.
- ❖ Lavarse las manos luego de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- ❖ Utilizar siempre guantes estériles y mascarillas.
- ❖ Utilizar zapatos protectores que cubran completamente los pies (no usar sandalias o zapatos abiertos).

- ❖ El procesamiento de las muestras debe realizarse sobre una superficie de trabajo cubierta con papel absorbente plastificado o papel de filtro.
- ❖ Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas por el operador antes y después de cada actividad.
- ❖ Todos los desechos del laboratorio deben descontaminarse adecuadamente, antes de eliminarlos en solución desinfectante o ser autoclavados a 121°C durante 20 minutos, o incinerarse.
- ❖ El material infeccioso debe ser fácilmente identificado como tal y ser esterilizado lo antes posible.

3.9 RECOMENDACIONES GENERALES Y PRECAUCIONES.

Cada instrumento tiene sus propias características y por lo tanto indicaciones específicas de mantenimiento y su respectivo control de calidad; sin embargo, hay recomendaciones generales que son aplicables a todo equipo de laboratorio como:

3.9.1 Precauciones eléctricas:

- ❖ Todo equipo eléctrico debe estar apropiadamente conectado a tierra y no sobrecargar los circuitos, así como debe controlarse al menos una vez al año o cada vez que se va a conectar un nuevo equipo a la línea de electricidad.
- ❖ Los equipos de funcionamiento continuo como estufas, refrigeradoras, congeladores etc deben conectarse a un generador eléctrico de emergencia.
- ❖ Designar a una persona para que se encargue del mantenimiento preventivo de un determinado equipo.
- ❖ El personal de laboratorio debe informar de cualquier choque eléctrico con el uso de un aparato.
- ❖ Los cordones de los equipos deben controlarse en forma regular .

3.9.2 Limpieza de las superficies externas:

- ❖ Utilizar toallas de material suave embebidas con alguna solución desinfectante como alcohol de 70%, desinfectante fenólico correctamente diluido u otro desinfectante cualquiera.
- ❖ Si se usa desinfectante, enjuagar profundamente con agua para retirar los residuos de la solución de limpieza, sobre todo si se usa hipoclorito de sodio para evitar corrosiones.

3.9.3 Actividades dependientes de la Temperatura:

- ❖ En los equipos que funcionan con regulación térmica se deben tener en cuenta las tolerancias recomendadas para cada equipo: incubadoras ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), baños de agua ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), refrigeradoras ($4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$), congeladores estándar ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), autoclaves empleados en microbiología $121^{\circ}\text{C}/ 15 \text{ min}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), y en cabinas de bioseguridad (tener en cuenta que la velocidad del flujo de aire debe estar entre los límites de tolerancia de 45 – 55 pies/min).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

4.1.1 A continuación se realiza un análisis descriptivo de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900mg/ml. Por el método de disco difusión.

El diámetro promedio de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* se muestra en la tabla N° 6 y los gráficos N° 1, 2, 3 y 4, en los que se puede observar lo siguiente:

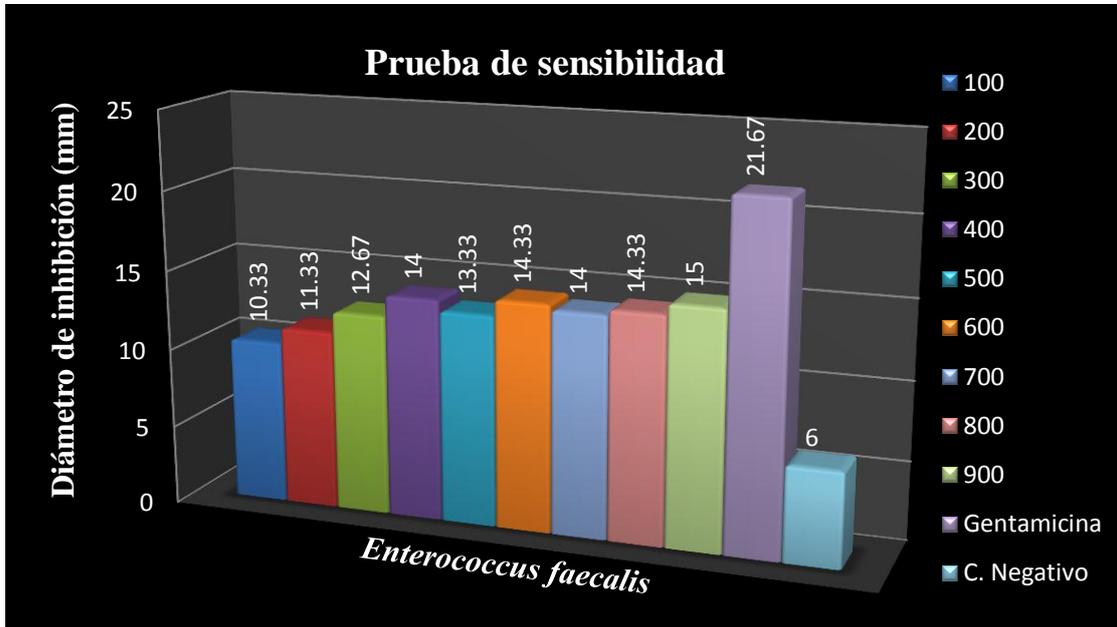
- ❖ El tamaño de los halos de inhibición producidos por el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, aumenta conforme se incrementa la concentración del mismo. Esta afirmación es constante en las tres cepas estudiadas.
- ❖ El mayor halo de inhibición sobre el crecimiento de las colonias de las tres cepas estudiadas, se obtuvo a una concentración de 900mg/ml del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*. Siendo (15.00 ± 0.00) el promedio del diámetro para *Enterococcus faecalis*, (13.33 ± 1.5) para *Escherichia coli* y (19.00 ± 1.0) para *Staphylococcus aureus*.
- ❖ El promedio del diámetro del halo de inhibición producidos por el extracto acuoso liofilizado de *geranium ayavacense* a 900mg/ml sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus* fue el de mas alto valor (19.00 ± 1.0) , respecto al halo de inhibición del crecimiento de las otras cepas estudiadas, cuyos valores fueron inferiores.

TABLA N° 03.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a diferentes concentraciones.

Extractos	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>X ± SD</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>X ± SD</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>X ± SD</i>
<i>Geranium ayavacense</i> 100mg/ml	10.33 ± 0.6	7.33 ± 0.6	13.67 ± 0.6
<i>Geranium ayavacense</i> 200mg/ml	11.33 ± 0.6	7.67 ± 1.2	14.67 ± 1.5
<i>Geranium ayavacense</i> 300mg/ml	12.67 ± 0.6	8.33 ± 0.6	16.33 ± 1.2
<i>Geranium ayavacense</i> 400mg/ml	14.00 ± 1.0	10.33 ± 1.2	16.67 ± 0.6
<i>Geranium ayavacense</i> 500mg/ml	13.33 ± 1.5	10.67 ± 0.6	18.00 ± 0.0
<i>Geranium ayavacense</i> 600mg/ml	14.33 ± 0.6	11.67 ± 0.6	18.33 ± 0.6
<i>Geranium ayavacense</i> 700mg/ml	14.00 ± 0.0	13.00 ± 1.0	18.33 ± 0.6
<i>Geranium ayavacense</i> 800mg/ml	14.33 ± 0.6	12.67 ± 1.2	18.33 ± 0.6
<i>Geranium ayavacense</i> 900mg/ml	15.00 ± 0.00	13.33 ± 1.5	19.00 ± 1.0
Control positivo	21.67 ± 0.6	17.67 ± 0.6	21.33 ± 0.6
Control negativo	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

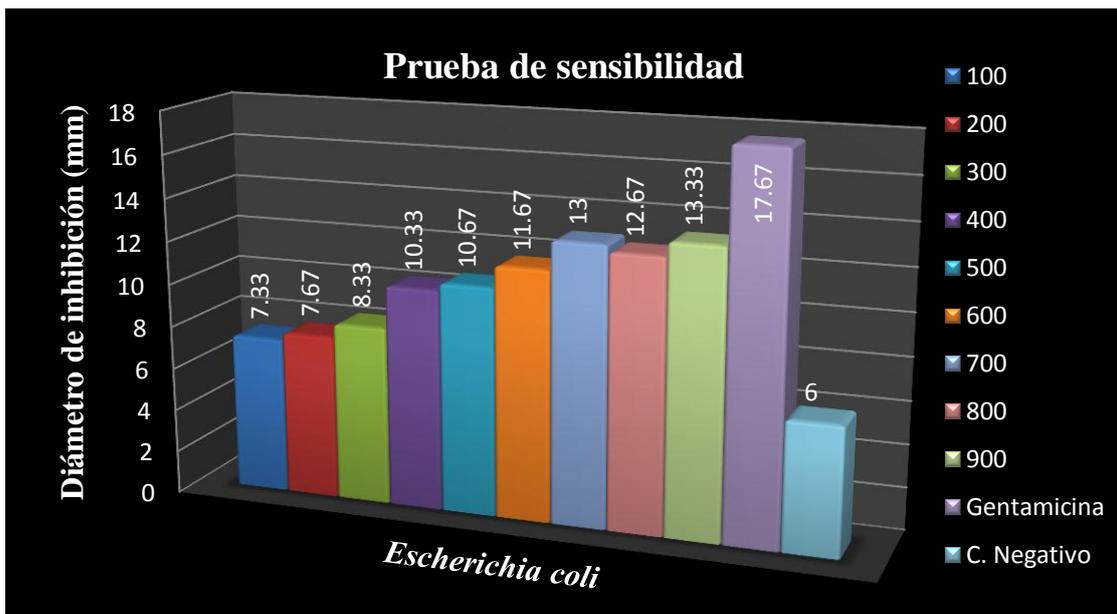
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 01.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.



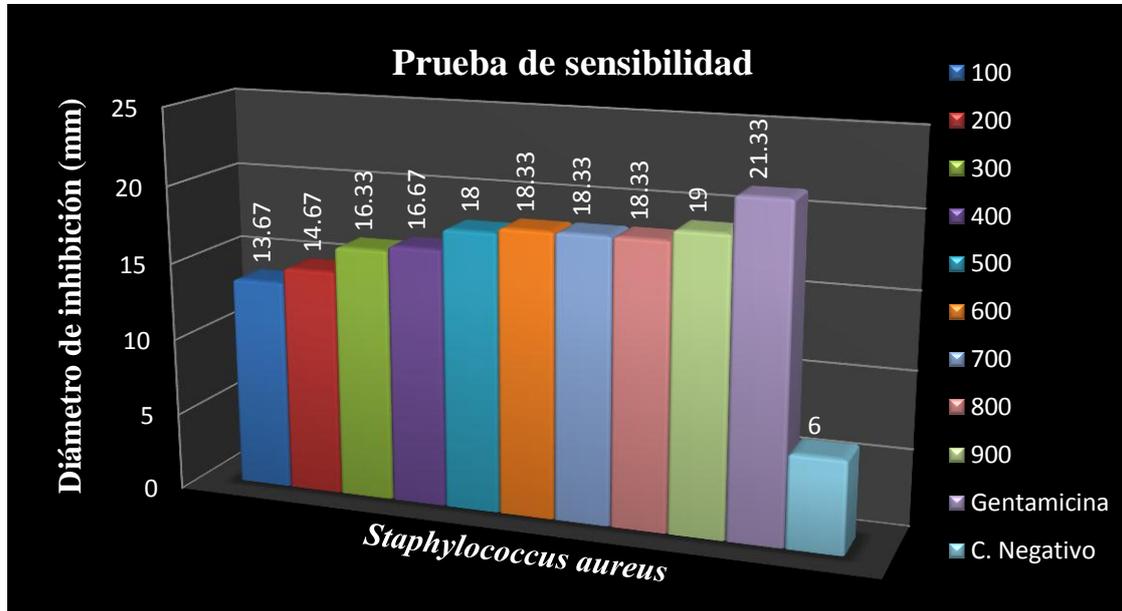
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 02.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.



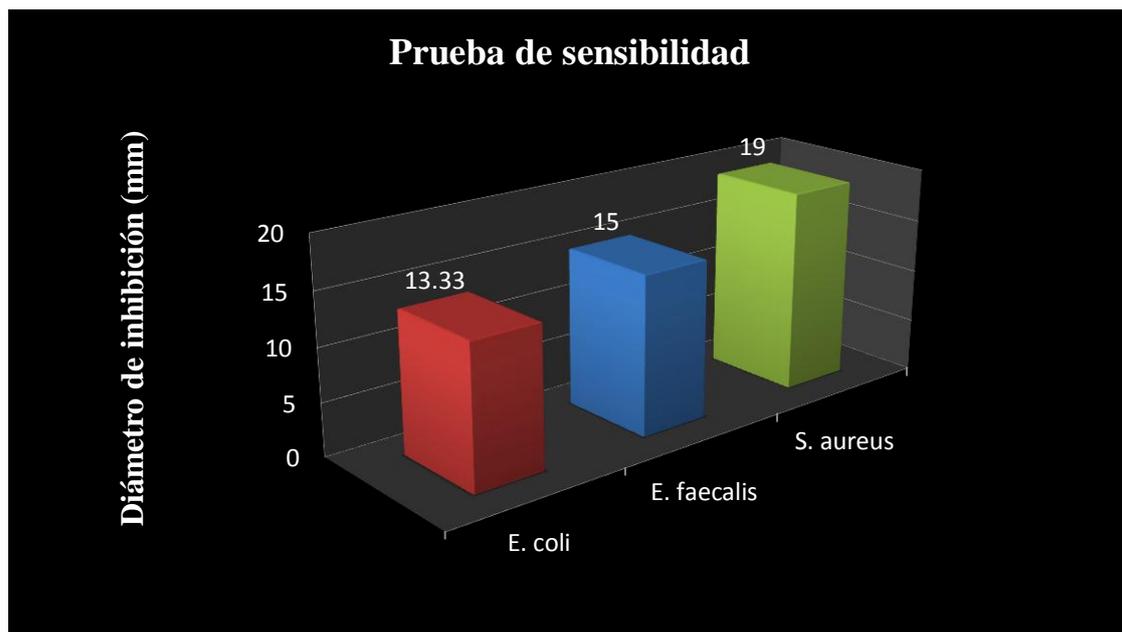
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 03.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 04.- Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (expresado en mm) producidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

La interpretación de los diámetros críticos producidos por los discos de sensibilidad de Gentamicina (control positivo) y los producidos por el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se muestran en las tablas N° 7, 8 y 9; al igual que en los gráficos N° 5, 6, 7 y 8. En los que se observa lo siguiente:

- ❖ La cepa de *Enterococcus faecalis*, es sensible a todas las concentraciones estudiadas del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, esto indica que es sensible tanto a una concentración de 100mg/ml como a una concentración de 900mg/ml. De igual manera es sensible al control positivo.
- ❖ La cepa de *Escherichia coli*, es resistente a las concentraciones iguales o inferiores a 600mg/ml del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, y presenta una resistencia intermedia a concentraciones entre 700 y 900mg/ml del mismo extracto. Solo fue sensible al control positivo.
- ❖ La cepa de *Staphylococcus aureus* presenta resistencia intermedia al ser enfrentada a las concentraciones de 100 y 200mg/ml del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, pero es sensible a concentraciones entre 300 y 900mg/ml del mismo extracto. Y al igual que las cepas anteriores también es sensible al control positivo.

TABLA N° 04.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	(mm) X ± SD	INTERPRETACIÓN
PLANTA ENTERA	100	10.33 ± 0.6	SENSIBLE
	200	11.33 ± 0.6	SENSIBLE
	300	12.67 ± 0.6	SENSIBLE
	400	14.00 ± 1.0	SENSIBLE
	500	13.33 ± 1.5	SENSIBLE
	600	14.33 ± 0.6	SENSIBLE
	700	14.00 ± 0.0	SENSIBLE
	800	14.33 ± 0.6	SENSIBLE
	900	15.00 ± 0.00	SENSIBLE
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA	21.67 ± 0.6	SENSIBLE

FUENTE: Elaborado por los autores.

TABLA N° 05.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	(mm) X ± SD	INTERPRETACIÓN
PLANTA ENTERA	100	7.33 ± 0.6	RESISTENTE
	200	7.67 ± 1.2	RESISTENTE
	300	8.33 ± 0.6	RESISTENTE
	400	10.33 ± 1.2	RESISTENTE
	500	10.67 ± 0.6	RESISTENTE
	600	11.67 ± 0.6	RESISTENTE
	700	13.00 ± 1.0	INTERMEDIO
	800	12.67 ± 1.2	INTERMEDIO
	900	13.33 ± 1.5	INTERMEDIO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA	17.67 ± 0.6	SENSIBLE

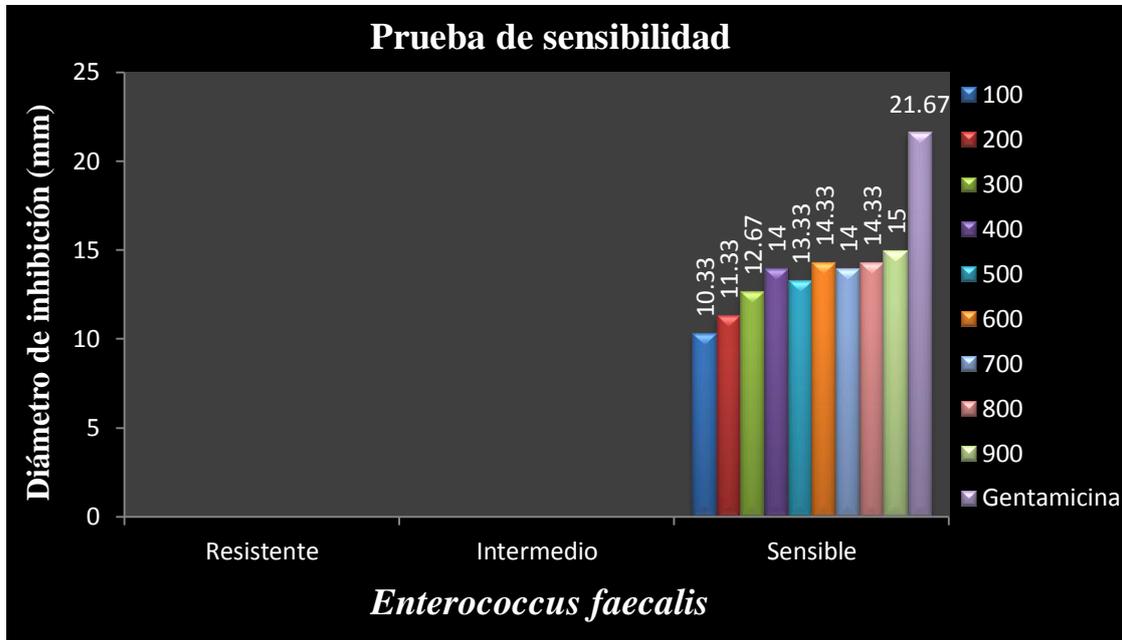
FUENTE: Elaborado por los autores.

TABLA N° 06.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	(mm) X ± SD	INTERPRETACIÓN
PLANTA ENTERA	100	13.67 ± 0.6	INTERMEDIO
	200	14.67 ± 1.5	INTERMEDIO
	300	16.33 ± 1.2	SENSIBLE
	400	16.67 ± 0.6	SENSIBLE
	500	18.00 ± 0.0	SENSIBLE
	600	18.33 ± 0.6	SENSIBLE
	700	18.33 ± 0.6	SENSIBLE
	800	18.33 ± 0.6	SENSIBLE
	900	19.00 ± 1.0	SENSIBLE
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA	21.33 ± 0.6	SENSIBLE

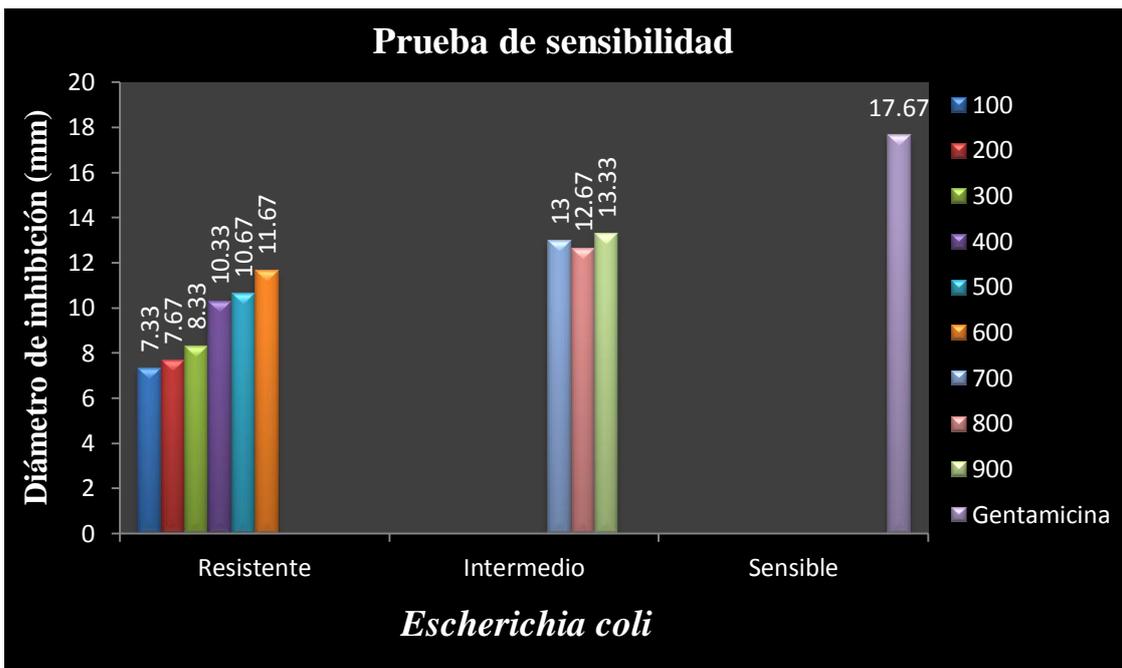
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 05.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.



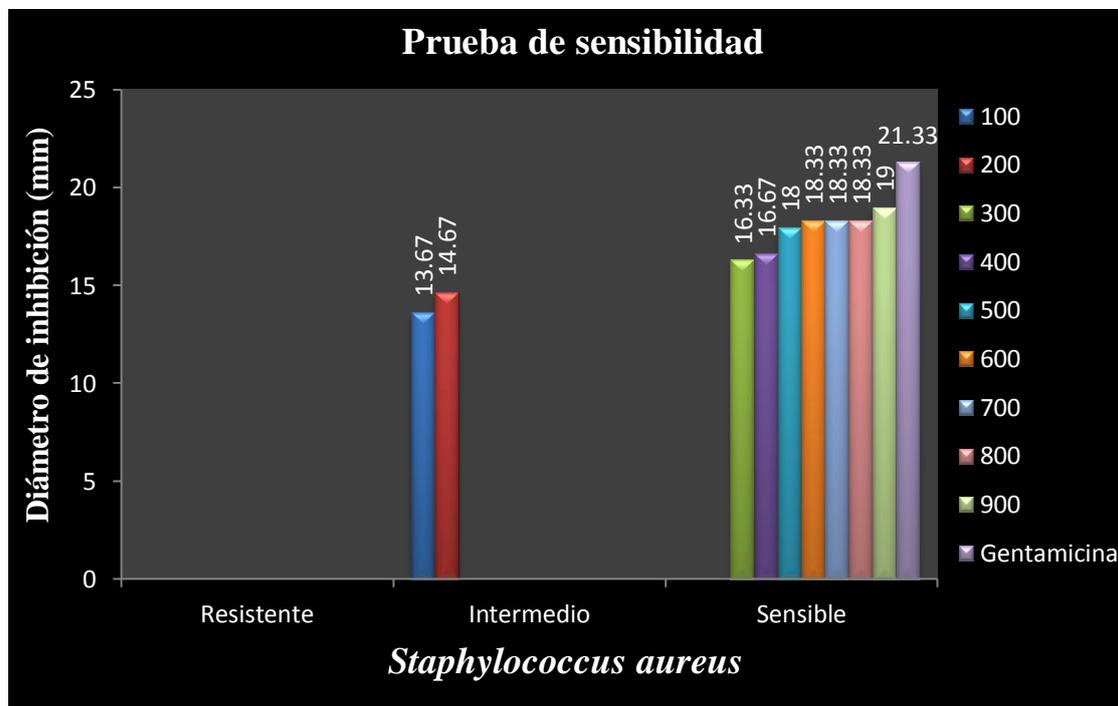
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 06.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.



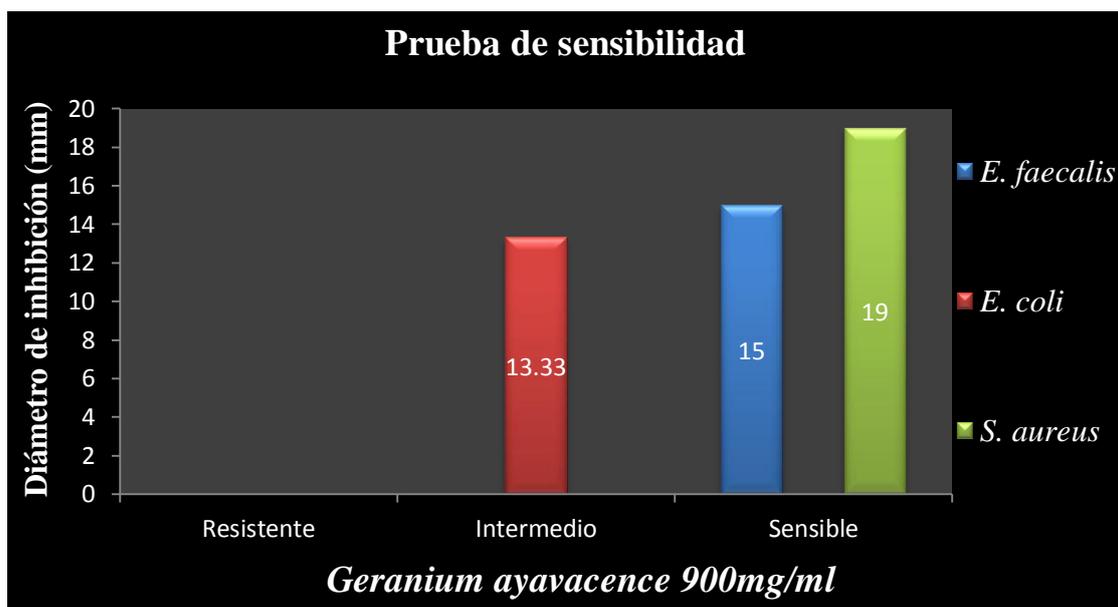
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 07.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 08.- Interpretación de los diámetros críticos de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

Los porcentajes de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, respecto al control positivo se muestra en las tablas N° 10, 11 y 12, así como en los gráficos N° 9, 10, 11 y 12. En los que se puede apreciar lo siguiente:

- ❖ El extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml, obtuvo el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de las colonias en las tres cepas estudiadas, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo.
- ❖ Sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*, el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml obtuvo un porcentaje de inhibición de 89.08%, el mismo fue el porcentaje de inhibición máximo obtenido en el presente estudio.
- ❖ El menor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*, se obtuvo a una concentración de 100mg/ml del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, cuyo valor fue de 41.50%, el mismo fue el porcentaje de inhibición menor de todo el estudio.
- ❖ Los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*, producidas por el extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, en sus diferentes concentraciones estudiadas, fueron superiores al 60%.

TABLA N° 07.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	% INHIBICIÓN	RESULTADO
PLANTA ENTERA	100	47.68	POCO ACTIVO
	200	52.30	MODERAMENTE ACTIVO
	300	58.45	MODERAMENTE ACTIVO
	400	64.61	MODERAMENTE ACTIVO
	500	61.53	MODERAMENTE ACTIVO
	600	66.14	MODERAMENTE ACTIVO
	700	64.61	MODERAMENTE ACTIVO
	800	66.14	MODERAMENTE ACTIVO
	900	69.22	MODERAMENTE ACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA		

FUENTE: Elaborado por los autores.

TABLA N° 08.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	% INHIBICIÓN	RESULTADO
PLANTA ENTERA	100	41.50	POCO ACTIVO
	200	43.39	POCO ACTIVO
	300	47.16	POCO ACTIVO
	400	58.48	MODERAMENTE ACTIVO
	500	60.37	MODERAMENTE ACTIVO
	600	66.03	MODERAMENTE ACTIVO
	700	73.57	MODERAMENTE ACTIVO
	800	71.68	MODERAMENTE ACTIVO
	900	75.46	MODERAMENTE ACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA		

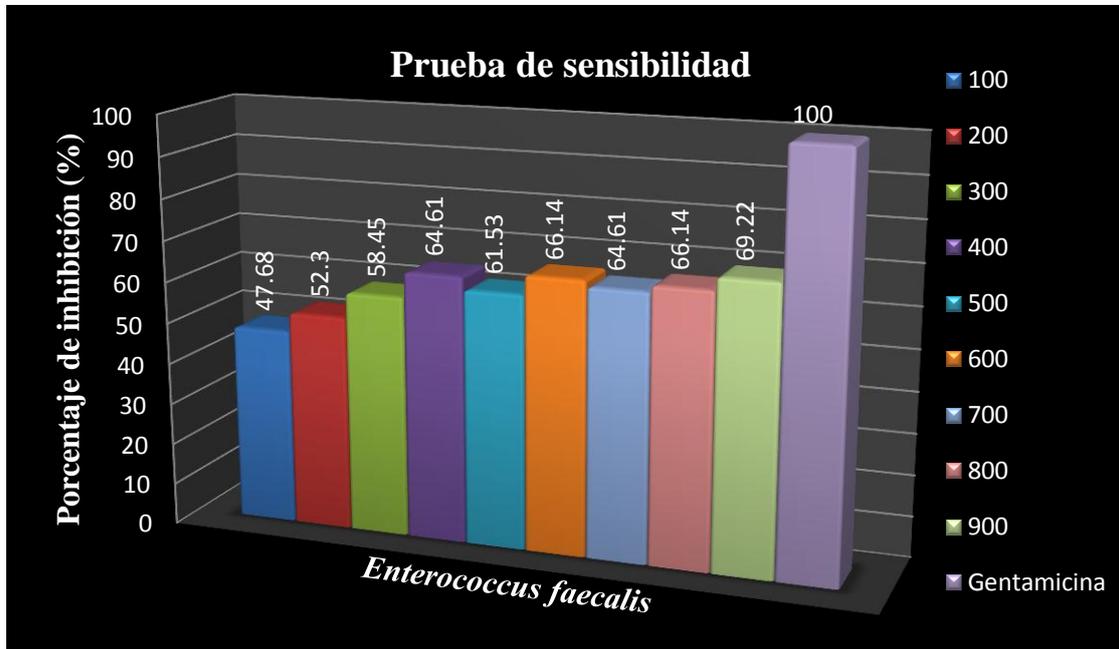
FUENTE: Elaborado por los autores.

TABLA N° 09.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, en sus diferentes concentraciones, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.

EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO		DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	
PARTE DE LA PLANTA	CONCENTRACIÓN	(DZI) *	
	(mg/ml)	% INHIBICIÓN	RESULTADO
PLANTA ENTERA	100	64.07	MODERAMENTE ACTIVO
	200	68.76	MODERAMENTE ACTIVO
	300	76.57	BUENA ACTIVIDAD
	400	78.14	BUENA ACTIVIDAD
	500	84.39	BUENA ACTIVIDAD
	600	85.95	BUENA ACTIVIDAD
	700	85.95	BUENA ACTIVIDAD
	800	85.95	BUENA ACTIVIDAD
	900	89.08	BUENA ACTIVIDAD
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA		

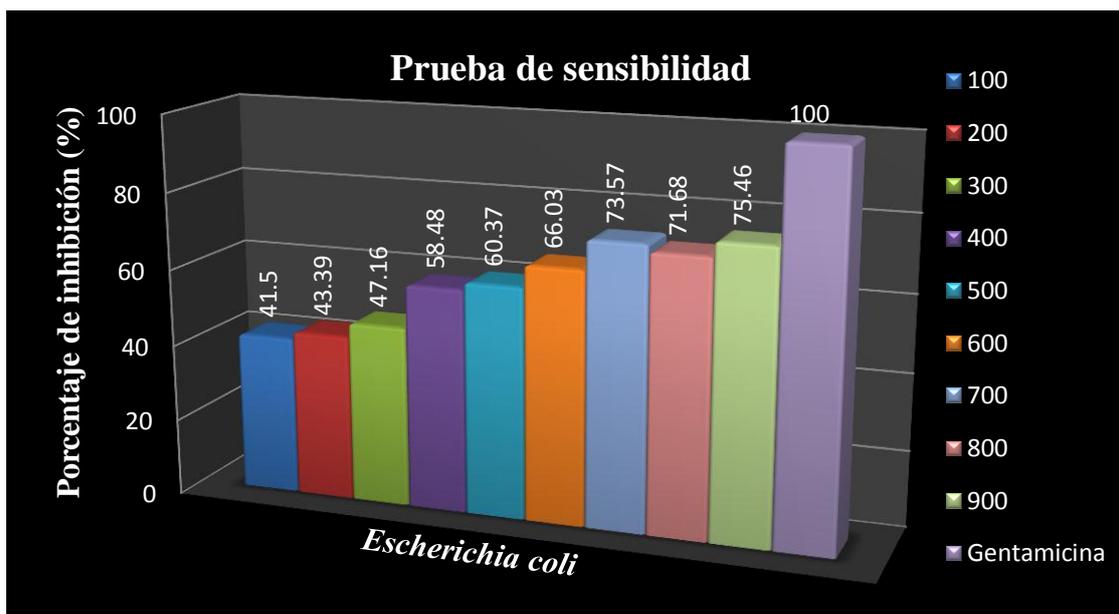
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 09.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*.



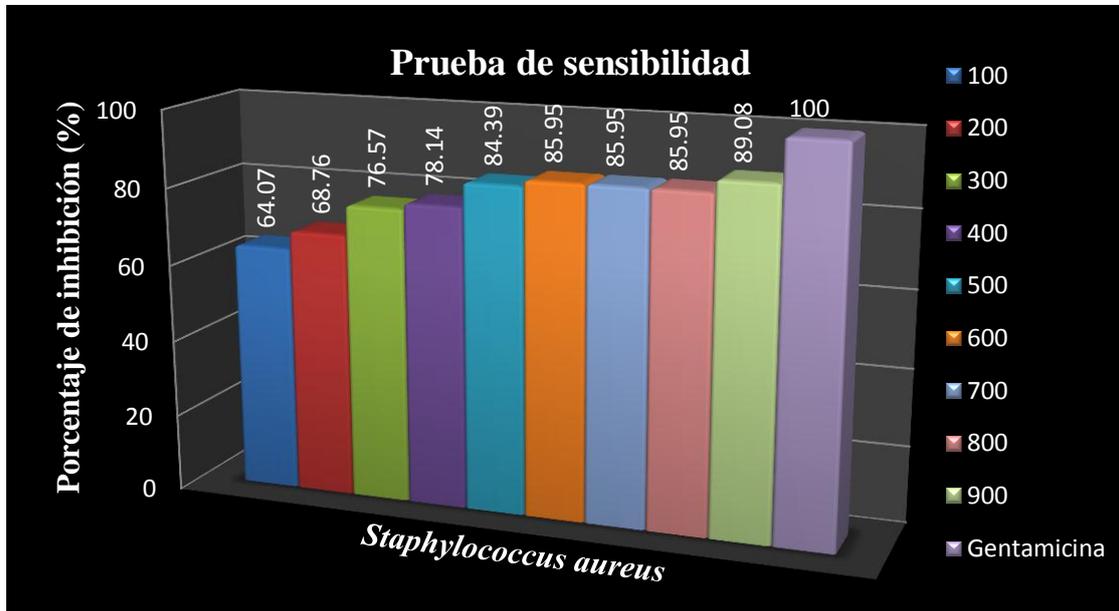
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 10.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Escherichia coli*.



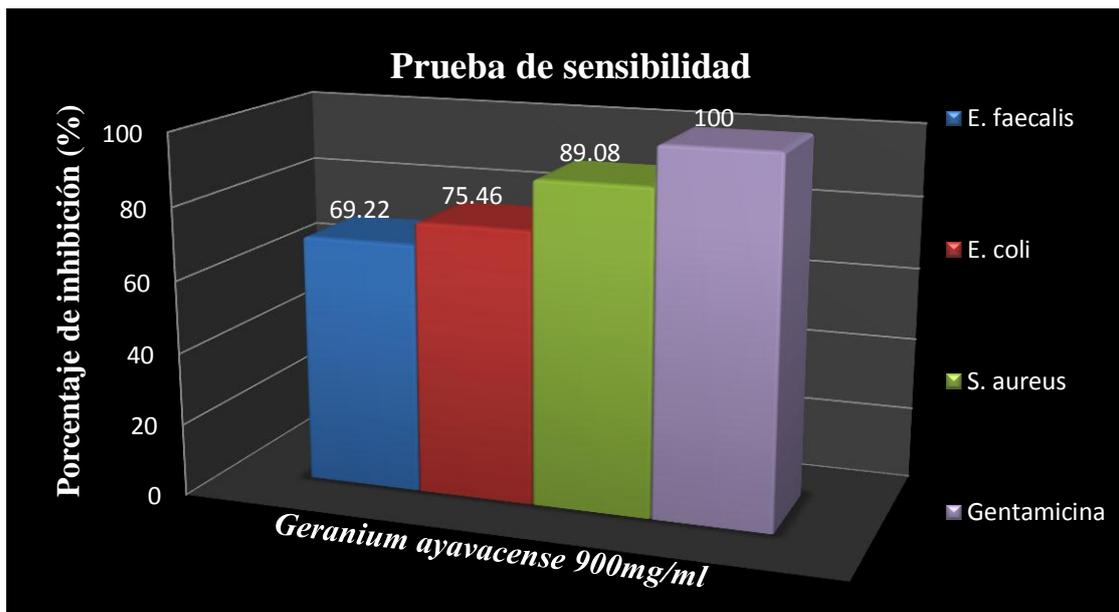
FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 11.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, respecto al diámetro de inhibición producido por el control positivo sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 12.- Porcentaje de inhibición del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* a 900mg/ml, sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

4.1.2 A continuación se realiza el análisis descriptivo de la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

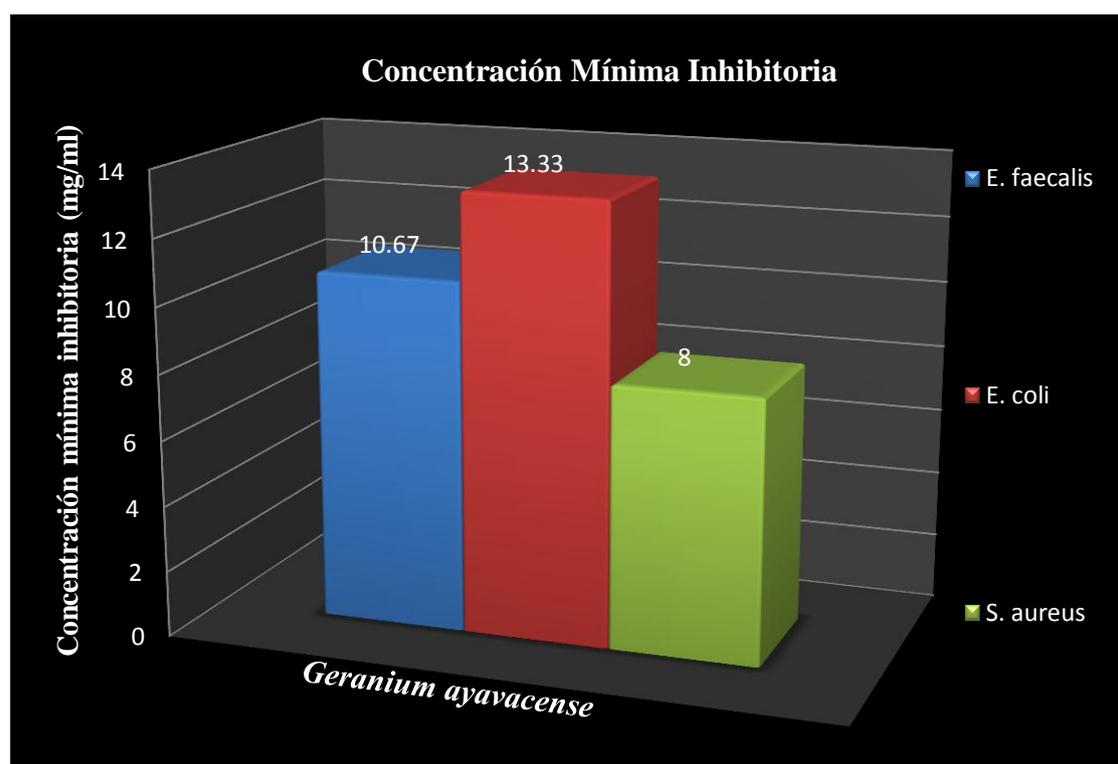
- ❖ La concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* (expresado en mg/ml), sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se muestran en la tabla N° 13 y en los gráficos 13. En los que se observa lo siguiente:
- ❖ La mínima concentración del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* para inhibir el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus* fue de 8 (\pm 0.0).
- ❖ Sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* tuvo una concentración mínima inhibitoria de 10.67 (\pm 4.6).
- ❖ El crecimiento de las colonias de *Escherichia coli* fue inhibido a una concentración de 13.33 (\pm 4.6) del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*.

TABLA N° 10.- Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* (expresado en mg/ml), sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Extracto	<i>Enterococcus faecalis</i> $X \pm SD$	<i>Escherichia coli</i> $X \pm SD$	<i>Staphylococcus aureus</i> $X \pm SD$
<i>Geranium ayavacense</i>	10.67 ± 4.6	13.33 ± 4.6	8.00 ± 0.0

FUENTE: Elaborado por los autores.

GRÁFICO 13.- Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* (expresado en mg/ml), sobre el crecimiento de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Elaborado por los autores.

4.2 DISCUSIÓN

La planta entera de *Geranium ayavacense* es empleado como medicina popular en todo el Perú, para tratar diversas afecciones, su principal uso es como hipoglicemiente, pero también es usado para tratar afecciones respiratorias (neumonía), diarreas y problemas febriles ⁽¹⁴⁾. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el extracto acuoso de *Geranium ayavacense*, tiene actividad antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estos resultados avalarían el uso de *Geranium ayavacense* para tratar problemas diarreicos y afecciones respiratorias de naturaleza infecciosa.

El extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, demostró tener una buena actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, y una moderada actividad sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Resultados similares a estos fueron obtenidos por BUSSMANN *et al* (2008), quienes estudiaron el efecto antibacteriano de *Geranium ayavacense* contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

ALANIS (2006), al evaluar la actividad antibacteriana de 26 plantas medicinales, encontró que el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, Fue obtenido por el extracto de *Geranium mexicanum*, especie perteneciente a la misma familia (Geraniaceae) de la planta investigada en el presente estudio, esto indicaría que la familia Geraniaceae tiene componentes con un gran potencial antibacteriano, esto porque los resultados de este estudio encontraron elevados porcentajes de inhibición del extracto de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

La actividad antibacteriana de la familia Geraniaceae también ha sido reportada por GUERRERO *et al* (2013), quienes estudiaron la actividad antibacteriana de las hojas de *Geranio hiedra* sobre microorganismos de la cavidad oral, en donde el extracto acuoso a una concentración de

400mg/ml, tuvo una actividad antibacteriana superior a los del control positivo (Clorhexidina).

4.3 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad antibacteriana del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento *in vitro* de las colonias de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, nos permiten realizar las siguientes conclusiones:

- ❖ El extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, tiene actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana fue evidenciada en todos los ensayos realizados, en los que se demuestra claramente la inhibición producida por el extracto de acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de estas bacterias.

- ❖ El extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, presenta elevados porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de las tres cepas bacterianas estudiadas. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo a una concentración de 900mg/ml del extracto, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, el cual fue de 89.08%, respecto a la inhibición producida por el control positivo. Sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, el mayor porcentaje de inhibición fue de 75.46% y sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, el mayor porcentaje de inhibición fue de 69.22%.

- ❖ La concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus* fue de 8.00mg/ml, sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis* fue de 10.67mg/ml de concentración del extracto, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, la concentración mínima de inhibición del extracto fue de 13.33mg/ml.

4.4 RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar estudios similares a éste, con el propósito de encontrar compuestos con actividad antibacteriana, se propone ensayar con otros microorganismos o aumentar la cantidad de éstos, otros solventes u otros métodos de extracción, que permitan extraer un mayor número de compuestos, que puedan ser estudiados.
- ❖ Realizar estudios fitoquímico a la planta entera de *Geranium ayavacense*, con el objetivo de identificar, separar y elucidar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad antibacteriana encontrada en el presente estudio, esto con la finalidad de obtener nuevos antibacterianos de fuentes vegetales, teniendo en cuenta la eleva actividad que demostró el extracto sobre las bacterias estudiadas.
- ❖ Evaluar el potencial toxicológico del extracto acuoso de la planta entera de *Geranium ayavacense*, con la finalidad de determinar su inocuidad y avalar su uso en humanos.
- ❖ Considerando la buena actividad antibacteriana del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense*, sobre *Staphylococcus aureus*, y teniendo en cuenta que esta bacteria es responsable de una gran variedad de infecciones a nivel piel, se recomienda elaborar preparados magistrales de uso tópico que ayuden en el tratamiento de este tipo de infecciones.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre las enfermedades infecciosas. (Internet). (Citado el 01 de setiembre del 2013).
Disponible en:
<http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/pages/textonly.html>.
2. Instituto Nacional de Salud. Reporte de las principales enfermedades infecciosas en el Perú. INS (Lima) 2007. 15 pp.
3. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. (Internet). (Citado el 05 de setiembre del 2013).
Disponible en:
http://www.antibioticos.msc.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
4. Peña A, Paco O. medicina Alternativa: Intento de Análisis. AnFacMed (Internet). 2007 (Citado el 02 de diciembre del 2013); 68 (01): 87 – 96.
Disponible en :
<http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v68n1/a12v68n1.pdf>
5. Fórum social mundial. La Amazonía y el Foro Social Mundial. Belem. Brasil. 2009. (Internet). (Citado el 05 de agosto del 2013).
Disponible en:
<http://www.ceam-ong.org/wp-content/uploads/2009/04/la-amazonia-y-el-fsm.pdf>.
6. INEI. Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales 2012. Lima: Centro de Edición del INEI; 2012.
7. Rodríguez M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública Mex (Internet). 2002 (Citado el 02 de diciembre del 2013); 44 (5): 464 – 475.
Disponible en:
<http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000363>
8. Bustos J, Hamdan A, Gutierrez M. *Staphylococcus aureus*: La reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed (Internet). 2006 (Citado el 03 de diciembre del 2013); 17 (4): 287 – 305.
Disponible en:
<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb061746.pdf>
9. Velásquez M. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Pública Méx (Internet). 2005 (Citado el 03 de diciembre del 2013); 47 (5): 381-387.
Disponible en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500009

10. Shopsisin B, Kreiswirth B. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis* (Internet). 2001 (Citado el 04 de diciembre del 2013); 7 (8): 323-326.
Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631714/>
11. Bussmann R, Douglas S, Perez F, Díaz D, Ford T, Rasheed T. Actividad antibacteriana de plantas medicinales del norte del Perú. *Arnaldoa* (Internet). 2008 (Citado el 05 de diciembre del 2013); 15(1): 127 – 148.
Disponible en:
<http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/arnal/v15n1/a11v15n1.pdf>
12. García C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis doctoral. Torreon, Coahuila, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2006. 104 pp.
13. Guerrero J, Ortiz Z, Peralta L, Pérez F. Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a clorhexidina. *RevCub Plan Med* (Internet). 2013 (Citado el 06 del 2013); 18 (02): 224 – 236.
Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000200006&script=sci_arttext&tlng=pt
14. Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramírez R. Plantas Medicinales del Perú. Taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica. Trujillo: Asamblea Nacional de Rectores; 2011. Pág. 291-292.
15. Paz, C y Pérez, M. Obtención del extracto tánico con mezclas alcohol-eter de la especie de *Geranium ayavacense* W. y ensayo de su efecto hipoglicemiante en *Oryctolatus cuniculus* con diabetes experimental aloxanica. Tesis Bachiller Farmacia. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 1991. 34 pp.
16. Vasquez M, Urquiza F. Efecto del decocto de la Sp. *Geranium ayavacense* Willd. en lesiones gástricas de *Rattus rattus varalbinus* y su comparación con la ranitidina. Tesis Bachiller Farmacia. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 1999. 50 pp.
17. Castañeda P. Contaminación de puntas de gutapercha con *Enterococcus faecalis*. Tesis de Bachiller. Guatemala, Guatemala. Universidad Mariano Gálvez de Guatemala, 2008. 38 pp.

18. Velásquez L. Actividad antimicrobiana de extractos de *Franseria artemisioides*, *Rumex palustris*, *Baccharis latifolia*, *Cestrum parqui*, y *Piperas perifolium*, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Tesis de Bachiller. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, 2007. 45 pp.
19. Duran L. Identificación y determinación de resistencia de cepas de enterococcus aisladas en muestras de infecciones intrahospitalarias del hospital Obrero N° 1 de la ciudad de la Paz de Marzo del 2003 a marzo del 2004. Tesis de Bachiller. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, 2004. 36 pp.
20. Castro A, Choquesillo F, Bell C, Palomino R, Ramos N, Felix L y col. Investigación de metabolitos secundarios en plantas medicinales con efecto hipoglucemiante y determinación del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. Revista de Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos de Lima (Internet). 2002 (Citado el 11 de noviembre del 2013); 5 (1): 23-29. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/ciencia/v05_n1/investigaci%C3%B3n_metabolitos.htm
21. Castañeda B, Ramos E, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Medico (Internet). 2008 (Consultado el 12 de noviembre del 2013); 8 (1): 56 – 72. Disponible en:
http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2199/Art4_Vo18_N1.pdf
22. Delgado H; Villacrez., I. (2012). Tamizaje Fitoquímico de las especies del Plan Operativo IMET-ESSALUD. Instituto de Medicina Tradicional. Informe final de Hipoglicemiantes. Pag 6-15.
23. Ruiz J, Roque M. Actividad antibacteriana de cuatro plantas del Nororiente peruano. Ciencia e Investigación (Internet). 2009 (Consultado el 13 de noviembre del 2013); 12(01): 41 – 47. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/ciencia/v12_n1/pdf/a07v12n1.pdf
24. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM (Internet). 2001 (Consultado el 14 de noviembre del 2013); 62(02): 156 – 161. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/Anales/v62_n2/pdf/a08v62n2.pdf
25. Estrategias y metodologías de intervención para mejorar el uso de los antimicrobianos en el ámbito hospitalario: documento técnico /

Ministerio de Salud. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas -- Lima: Ministerio de Salud; 2006.

26. Estudio de Etiología de la Diarrea en las Direcciones de Salud Cajamarca, Lambayeque, Loreto y Lima Este: Informe Técnico. Ministerio de Salud – Perú; 2001.
27. Anderson K. La resistencia de las bacterias a los antibióticos - ¿un ejemplo apropiado de cambio evolutivo? CRSQ (Internet). 2005 (Consultado el 13 de noviembre del 2013); 41 (04): 318 – 326.
Disponible en:
<http://genesisresponde.org/sites/default/files/art%EDculos/PDF%20files%20SED/Apolog%E9tica%20General/La%20resistencia%20bacteriana,%20y%20sus%20implicaciones%20para%20la%20evoluci%F3n%20.pdf>
28. Tovalino M, Contreras S, Calle C, Mallqui A. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Rev Estomatol Herediana (Internet). 2012 (Consultado el 13 de noviembre del 2013); 22(1): 50 - 58.
Disponible en:
http://www.upch.edu.pe/faest/publica/2012/vol22_n1/vol22_n1_12_art08.pdf
29. Lujan D, Ibarra J, Mamani E. Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de *Pseudomona aeruginosa* en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev Biomed (Internet). 2008 (Consultado el 04 de noviembre del 2013); 19: 156 - 160.
Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2008/bio083e.pdf>
30. Gurgel T, Carvalho W. A Assistência Farmaceutica e o Aumento da Resistencia Bacteriana aos Antimicrobianos. Lat Am J Pharm (Internet). 2008 (Consultado el 15 de octubre del 2013); 27 (01): 118 – 123.
Disponible en:
http://www.crf-mt.org.br/arqs/materia/1191_a.pdf
31. Mendoza A. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Rev Fac Med UNAM (Internet). 2011 (consultado el 06 de octubre del 2013); 54 (01): 18 – 27.
Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2011/un111c.pdf>
32. Pons M, Mosquito S, Ochoa T, Vargas M, Molina M, Lluque A et. al. Niveles de resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* comensales en niños de la zona periurbana de Lima, Perú. RevPeruMedExp Salud Pública (Internet). 2012 (Consultado el 06 de octubre del 2013); 29 (01): 82 – 86.
Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342012000100012&script=sci_arttext

33. Lujan D, Pajuelo G. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario. RevBiomed (Internet). 2008 (Consultado el 16 de octubre del 2013); 19 (02): 110 – 115.
Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085e.pdf>
34. Gómez J. Uso de antibióticos en el hospital central de la fuerza aérea del Perú en el periodo de agosto de 2001 a enero de 2002. RevMex Patol Clin (Internet). 2003 (Consultado el 18 de octubre del 2013); 50 (02): 97 – 103.
Disponible en:
<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=2440>
35. Pino N. Botánica y screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el Departamento del Chocó, Colombia. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales (Internet). 2006 (Consultado el 17 de octubre del 2013); 2 (1): 33 – 44.
Disponible en:
<http://132.248.9.34/hevila/Revistalatinamericanaderecursosnaturales/2006/vol2/no1/4.pdf>
36. Sabogal A, Watson A. Manejo de los recursos naturales del páramo, estudio de caso Los Altos de Frias Frias, Piura. Pon UniCat Per 2008; 12 (01): 106 – 120.
37. Fayette J. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de extractos vegetales sobre el crecimiento de una bacteria y dos hongos fitopatógenos. Tesis de Bachiller. Costa Rica. EARTH, 2007. 40 pp.
38. Alanis A. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional Mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: Estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum* L. (Granado). Tesis de doctorado. México DF, México. Instituto Politécnico Nacional, 2006. 62pp.
39. Romero R. Microbiología y parasitología humana, Base etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3° edición. México, D.F: Editorial Médica Panamericana S.A de C.V; 2007. p. 68.
40. Brooks G, Butel J y Morse S. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg; Traducción de Francisco Sánchez Frago. 23° edición. México, D.F: Editorial El Manual Moderno; 2005. p. 52.
41. Sánchez M, Martín D, Valladares C, Castañares M, Torres C y Borque L. Sensibilidad del género *Enterococcus* a nuevos antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap. 2004; 17(2): 184 – 188.

42. Sánchez Y. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de representantes de la tribu *Pipereae*. *Rev Protección Veg*. 2011; 26(3): 204.
43. Cuca L, Coy C, Coy E y Lozano J. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Rev Cub de Farm*. 2011; 45(2): 275 – 282.
44. Ruiz J y Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente Peruano. *Ciencia e Investigación*. 2009; 12(1): 41 – 47.
45. Silva j y Siqueira a. Actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Rev Cubana Plant Med*. 2000; 5(1): 26 – 29.
46. Bustamante M, Cardona J, Burbano J, Castañeda J, Pachon M. Biodiversidad de plantas en el borde Amazónico Putumayense: I. Inventario. *Cienci Agro (Internet)*. 2009 (Consultado el 17 de octubre del 2013); 01 (04): 130 – 138.
Disponible en:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2072-14042009000100005&script=sci_arttext&tlng=en
47. Bella A, Bella R, Kanegusuku M, Cechinel V, Yunes R, Delle F y Niero R. Antimicrobial activity of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Acta Farm Bonaerense*. 2006; 25(2): 256 – 259.
48. Monsalve C y Leon B. Geraniaceae endémicas del Perú. *Rev Peru Biol (Internet)*. 2006 (Consultado el 8 de julio del 2014); 13 (2): 355 – 358.
Disponible en:
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v13n2/pdf/a59.pdf>
49. Borboa J, Rueda E, Acedo E, Ponce J, Cruz M, García J y Ortega M. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and subtropical agroecosystems (Internet)*. 2010 (consultado el 10 de octubre del 2014); 12 (2010): 539 – 547.
Disponible en:
<http://www.veterinaria.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/viewFile/466/405>
50. Mondal S, Paul S, Uddin S, Nahar L, Auzi A y Sarker S. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana *in vitro* de los neumatóforos de *Heritiera fomes* y *Xylocarpus moluccensis*. *Ars Pharm (Internet)*. 2008 (consultado el 10 de octubre del 2014); 49 (1): 51 – 56.
Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/411.pdf>
51. Tovar J. Composición química, actividad antibacteriana y toxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de Lamiaceae en el estado

de Hidalgo. Tesis de Bachiller. Hidalgo, México. Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo, 2007. 58 pp.

52. Rivero J, Sánchez S, Benítez G, Casimiro X, Ibarra C, Rojas A y Rivero B. Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. Rev. Latinoamer. Quím. (Internet). 2009 (consultado el 14 de octubre del 2014); 37 (2): 155 – 163.
Disponible en: <http://www.relaquim.com/archive/2009/p2009372-155pdf>
53. Sagrario M y Álvarez A. Extracto estandarizado de *Pelargonium sidoides* (EPS 7630). Actualidad científica-Medicamentos de vanguardia (Internet). 2011 (consultado el 14 de octubre del 2014); 30 (1): 59 – 63.
Disponible en:
http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=38&pidet...pdf...
54. Waizel J y Martínez I. Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. Revista ADM (Internet). 2011 (consultado el 15 de octubre del 2014); 68 (2): 73 – 88.
Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2011/od112e.pdf>
55. Sohretoglu D, Ekizoglu M, Ozalp M y Koray M. Free radical scavenging and antimicrobial activities of some *Geranium* species. Hacettepe University Journal of the Faculty Pharmacy (Internet). 2008 (consultado el 17 de octubre del 2014); 28 (2): 115 – 124.
Disponible en:
http://www.eczfakder.hacettepe.edu.tr/arsiv/.../08_2_1.pd...
56. Radulovic N, Dekic M, Stajanovic R y Palic R. Chemical composition and activity of the essential oils of *Geranium colombinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). Turk J Chem (Internet). 2010 (consultado el 20 de octubre del 2014); 35 (2011): 49 – 512.
Disponible en:
http://www.researchgate.net/...chemical_composition_and...
57. Kolodziej H. Antimicrobial, antiviral and immunomodulatory activity studies of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in the context of health promotion. Pharmaceuticals (Internet). 2011 (consultado el 20 de octubre del 2014); 4 (2011): 1295 – 1314.
Disponible en: <http://www.mdpi.com/1424-8247/4/10/1295/pdf>
58. Hsouna A y Hamdi N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. Lipids in health and disease (Internet). 2012 (consultado el 22 de octubre del 2014); 11 (167): 1 – 7.
Disponible en: <http://www.lipidworld.com/content/11/1/167>
59. Pino N y Córdova Y. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdó –

Choco. Scientia et technica (Internet). 2007 (consultado el 04 de marzo del 2014); 8 (33): 387 -390.

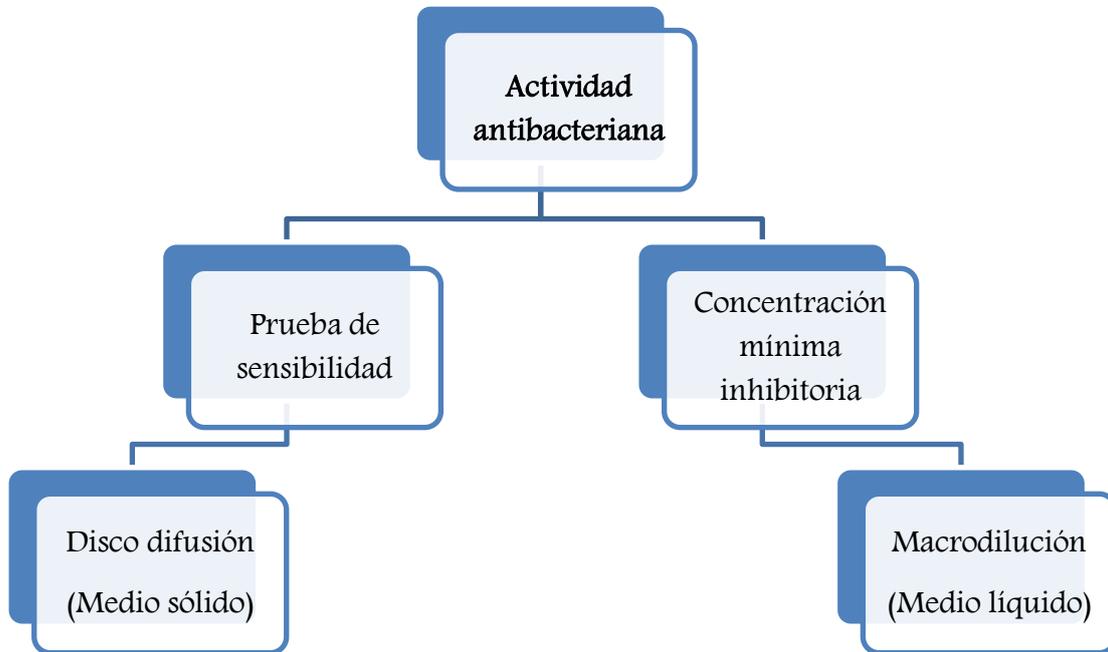
Disponible en:

<http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/viewFile/6033/3337>

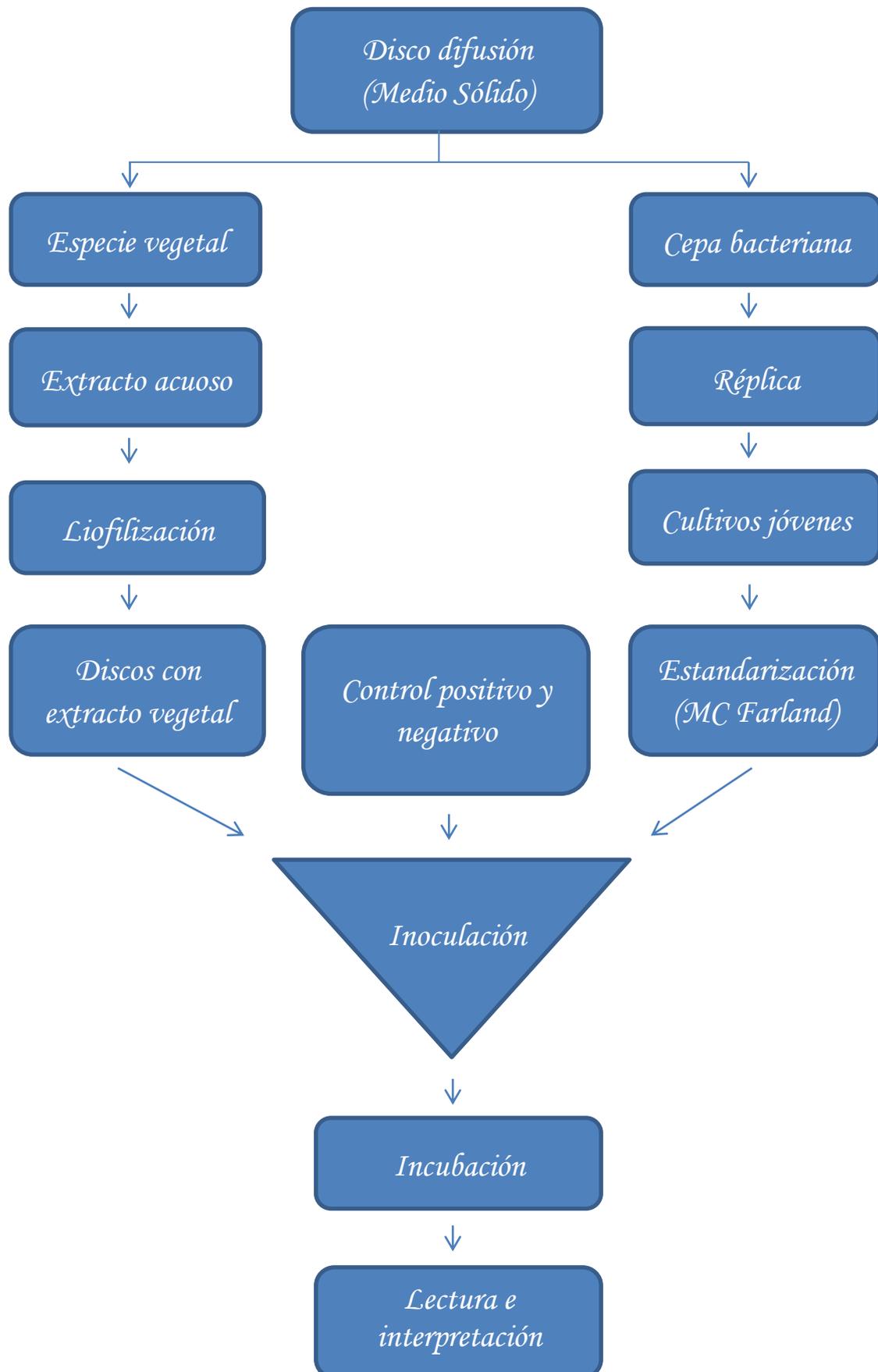
60. Castillo J, Ribas R, Osorio L y Aparicio G. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario multirresistentes a 21 antibióticos. Bioquímica Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica (Internet). 2006 (consultado el 08 de enero del 2014); 31 (2): 41 – 48.
Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57631202>
61. Álvarez M, Isaza G y Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austro eupatorium inulaefolium* H.B.K (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K (Clavo de laguna). Biosalud (Internet). 2005 (consultado el 10 de enero del 2014); 14 (1): 46 – 55.
Disponible en:
<http://biosalud.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?...>
62. Lizcano A y Vergara J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis de Bachiller. Bogotá D.C, Colombia. Pontificia Universidad javeriana, 2008. 74 pp.
63. Anderson K. La resistencia de las bacterias a los antibióticos - ¿Un ejemplo apropiado de cambio evolutivo?. CRSQ (Internet). 2005 (consultado el 13 de enero del 2014); 41 (4): 318 – 326.
Disponible en: <http://www.sedin.org/ID/resistencia.html>
64. Villalobos L. caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva en un producto cárnico. Revista científica, FCV-LUZ (Internet). 2003 (consultado el 14 de enero del 2014); 8 (1): 7 – 11.
Disponible en:
www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27908/2/articulo1.pdf

4.6 ANEXO

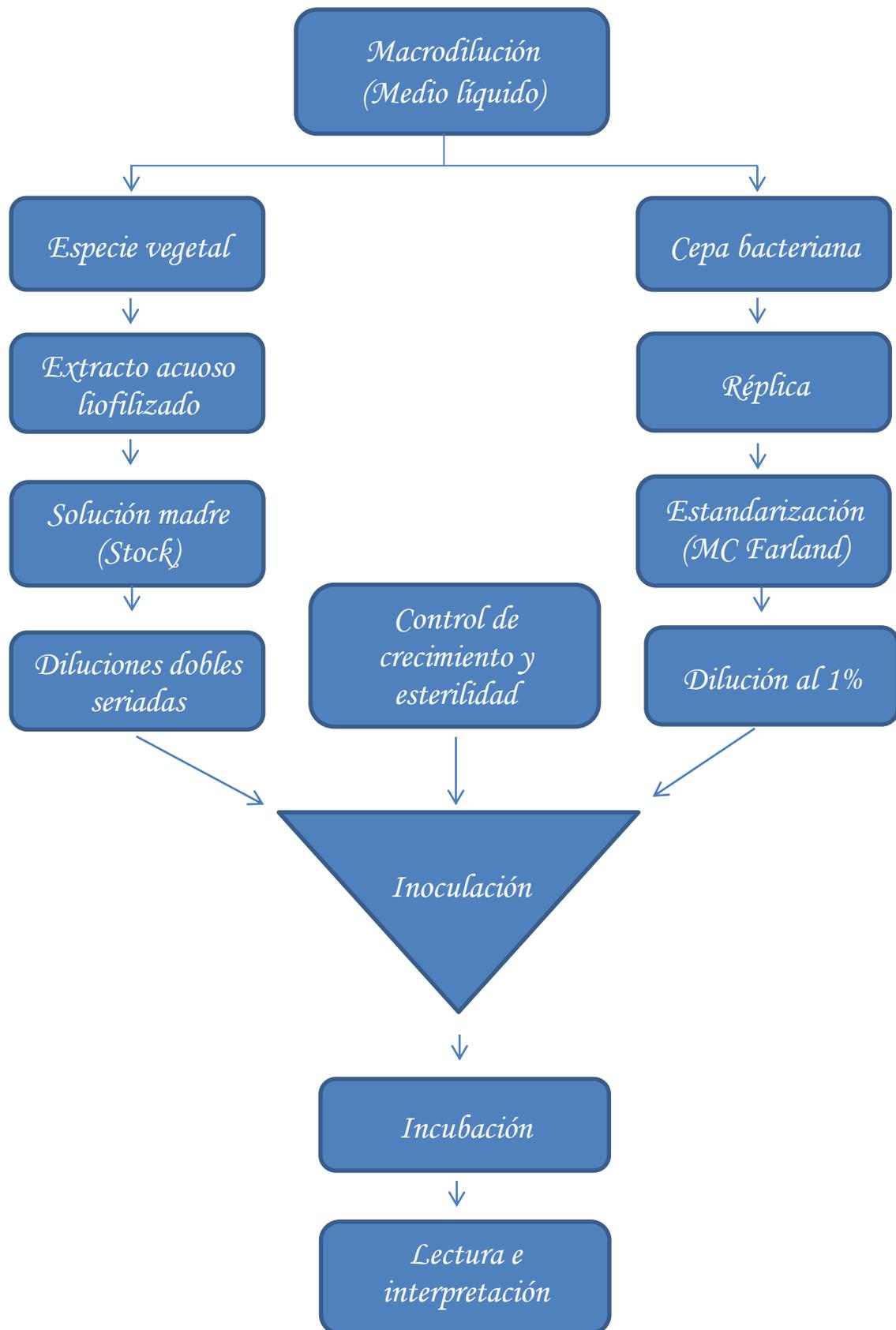
Anexo 01.- Esquema para determinar la actividad antibacteriana.



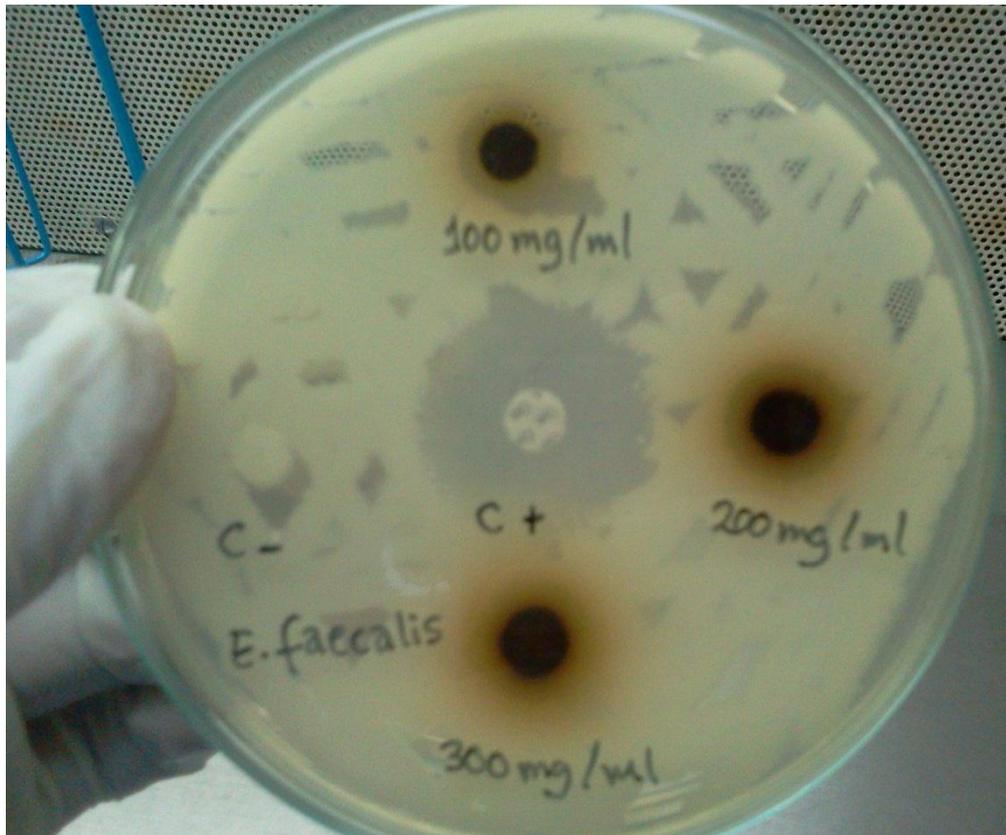
Anexo 02.- Método de disco difusión en medio sólido.



Anexo 03.- Macrodilución en medio líquido.

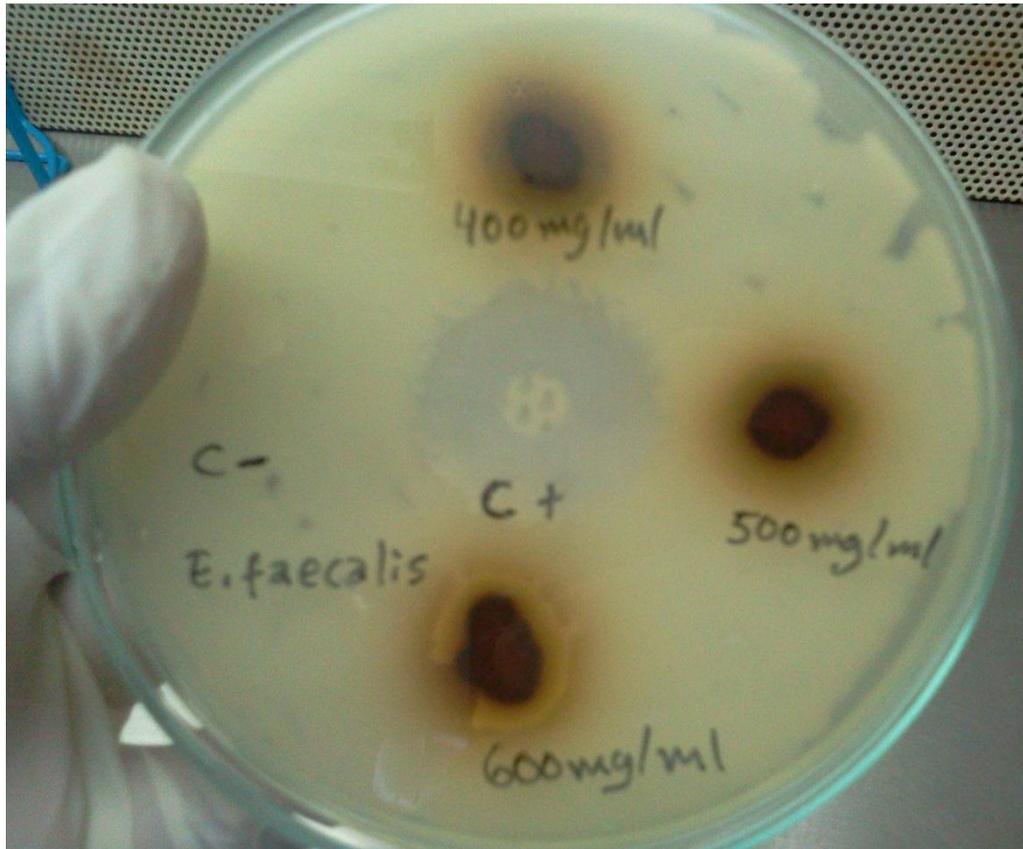


Anexo 04.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200 y 300mg/ml. Sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.



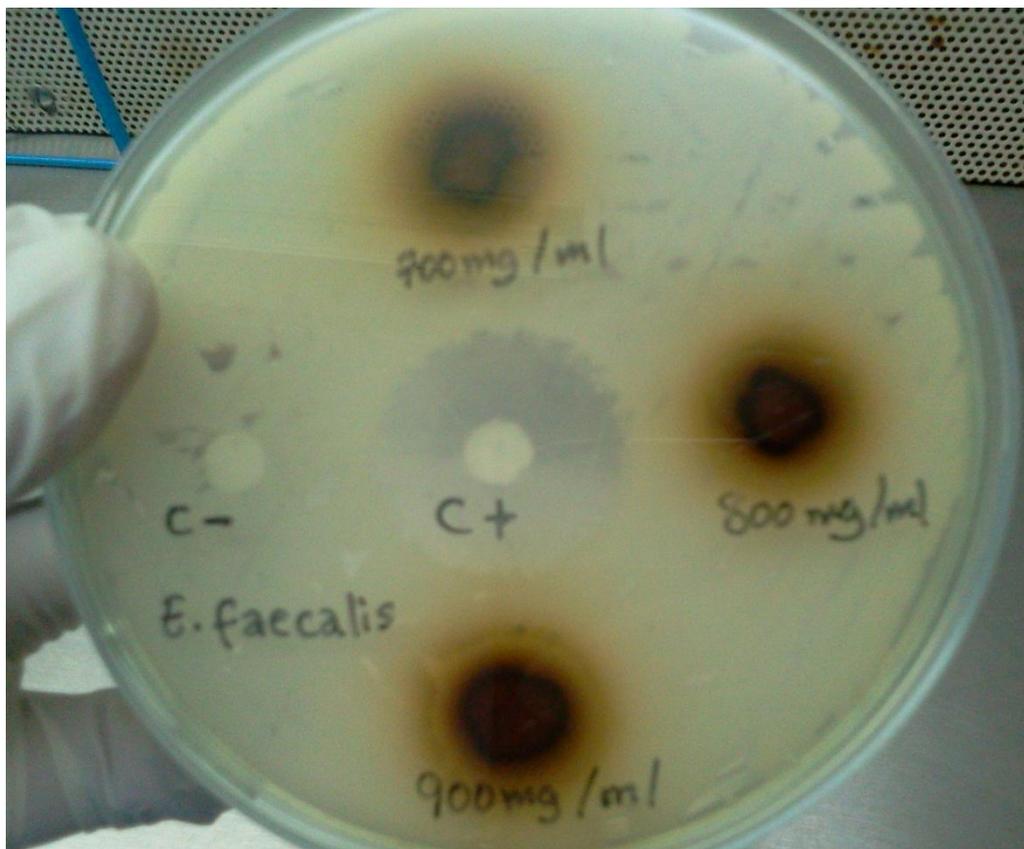
FUENTE: Elaborado por los autores.

Anexo 05.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 400, 500 y 600mg/ml. Sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.



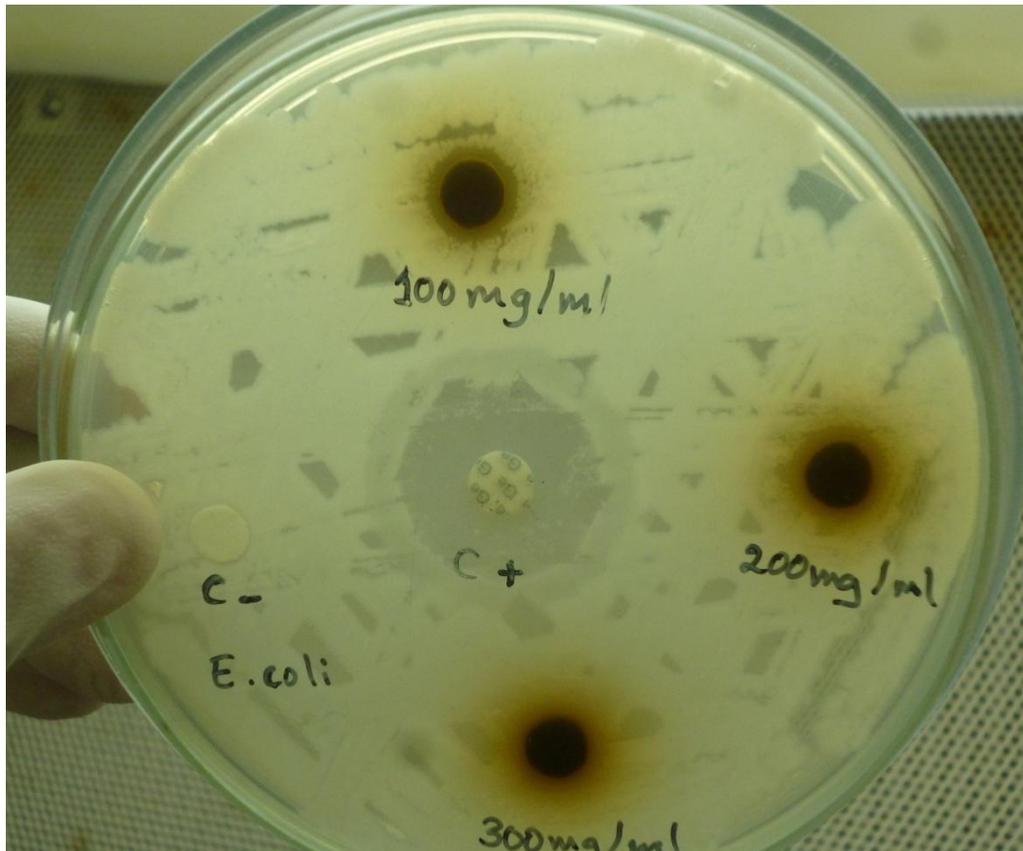
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 06.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 700, 800 y 900mg/ml. Sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.



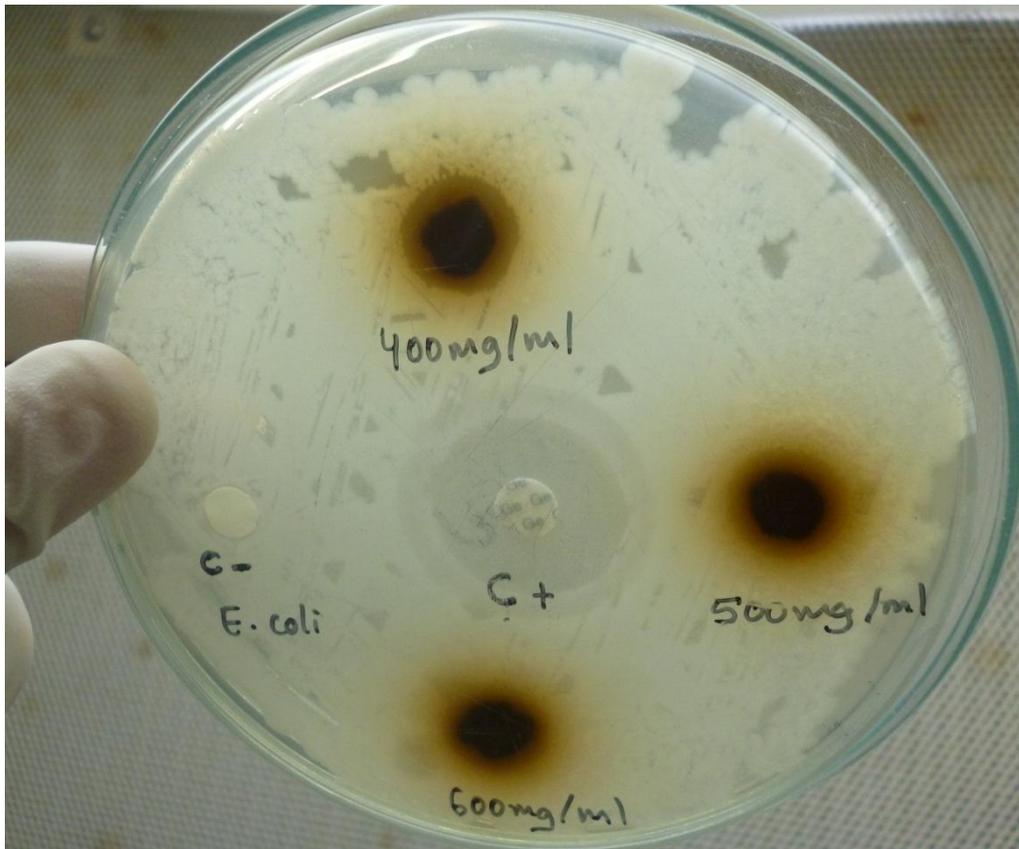
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 07.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200 y 300mg/ml. Sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.



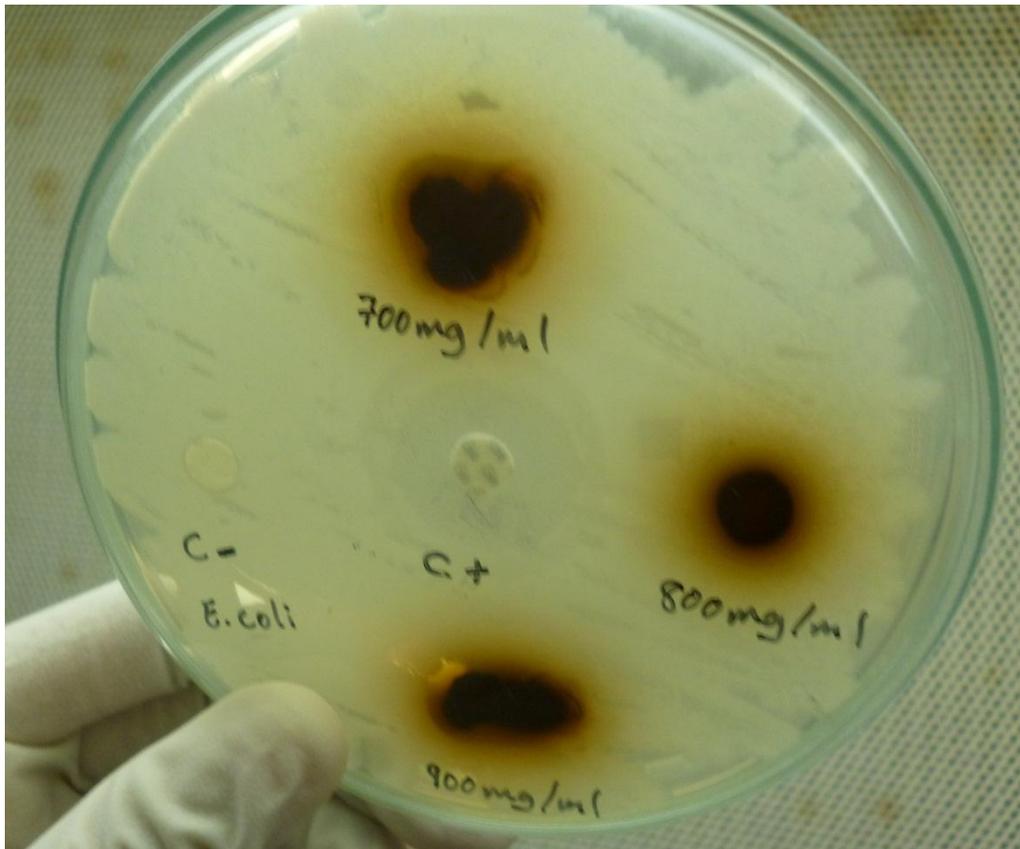
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 08.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 400, 500 y 600mg/ml. Sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.



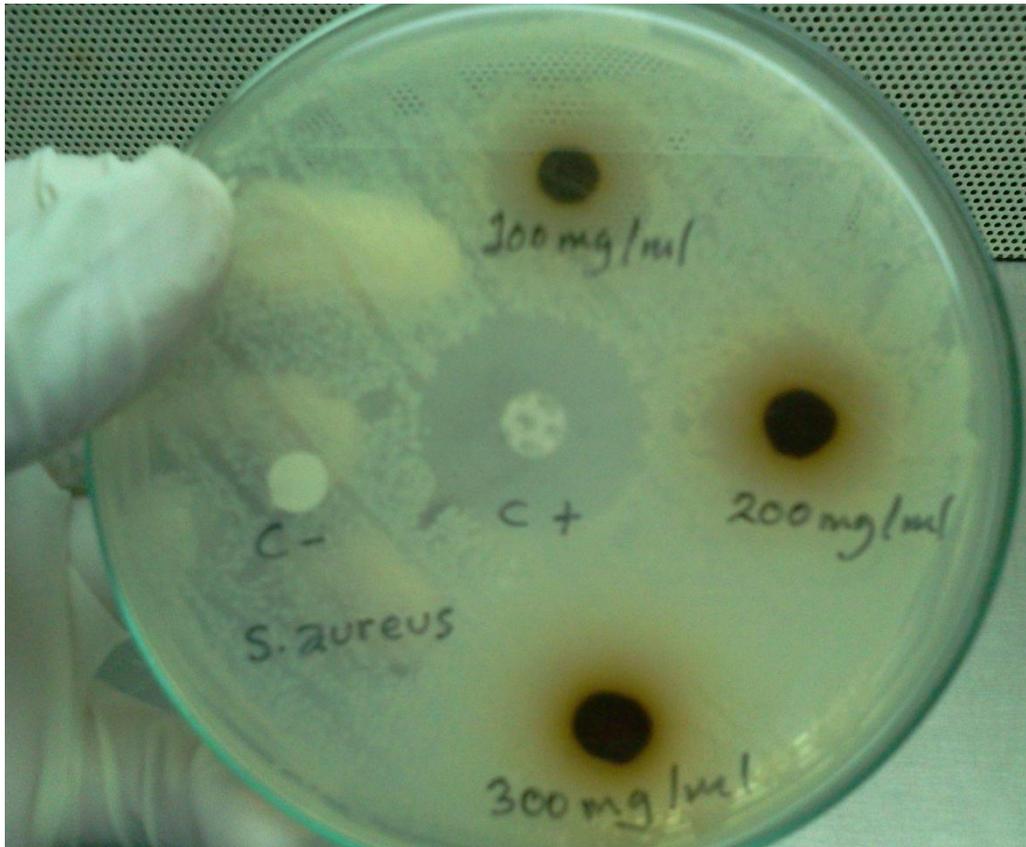
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 09.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 700, 800 y 900mg/ml. Sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.



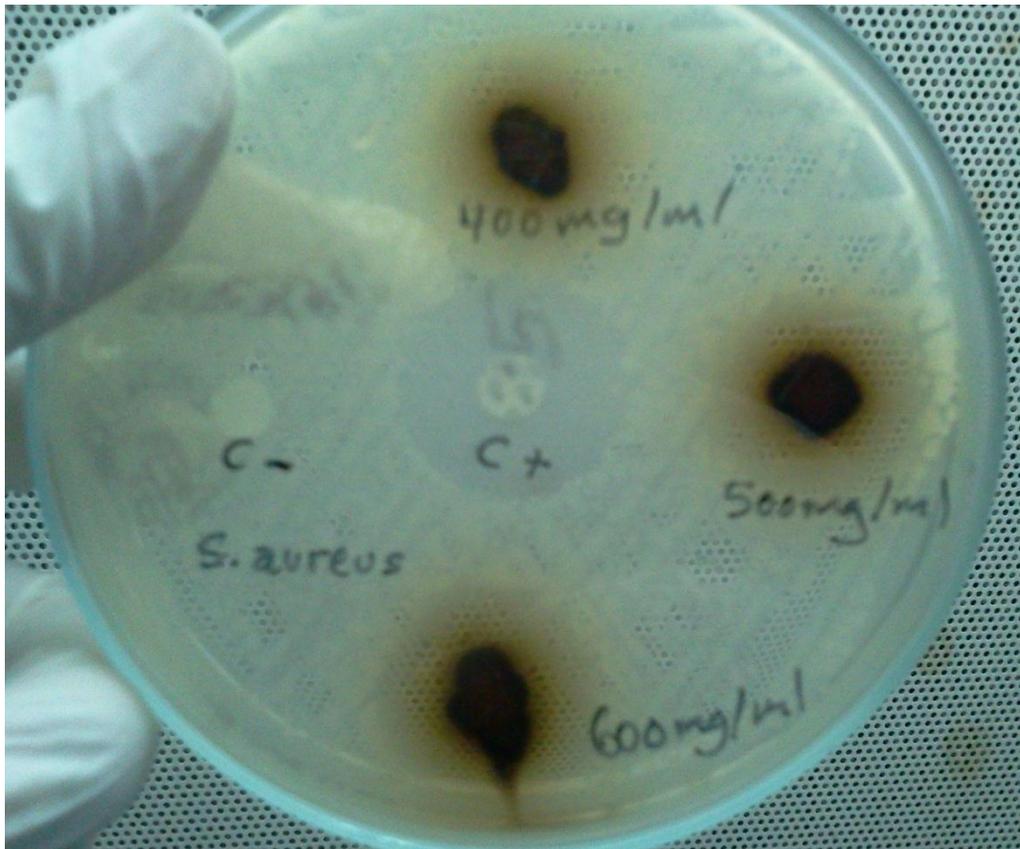
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 10.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 100, 200 y 300mg/ml. Sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



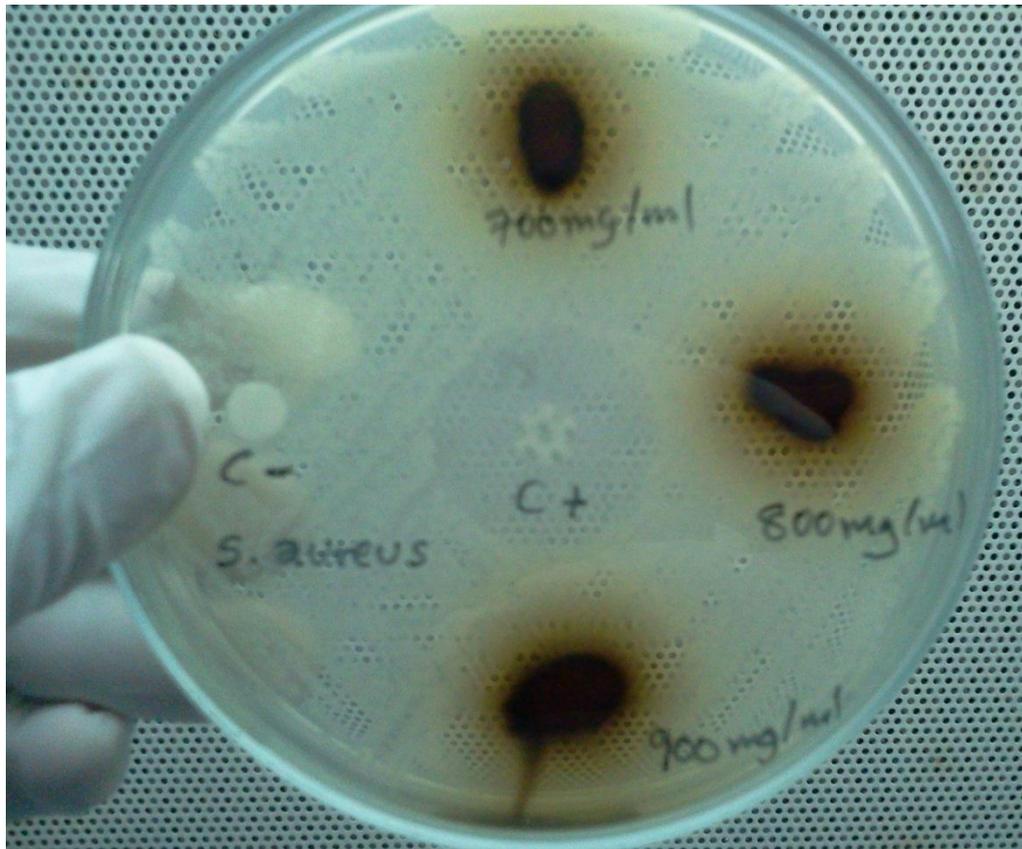
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 11.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 400, 500 y 600mg/ml. Sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 12.- Halos de inhibición obtenidos por el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense* a concentraciones de 700, 800 y 900mg/ml. Sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 13.- Concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.



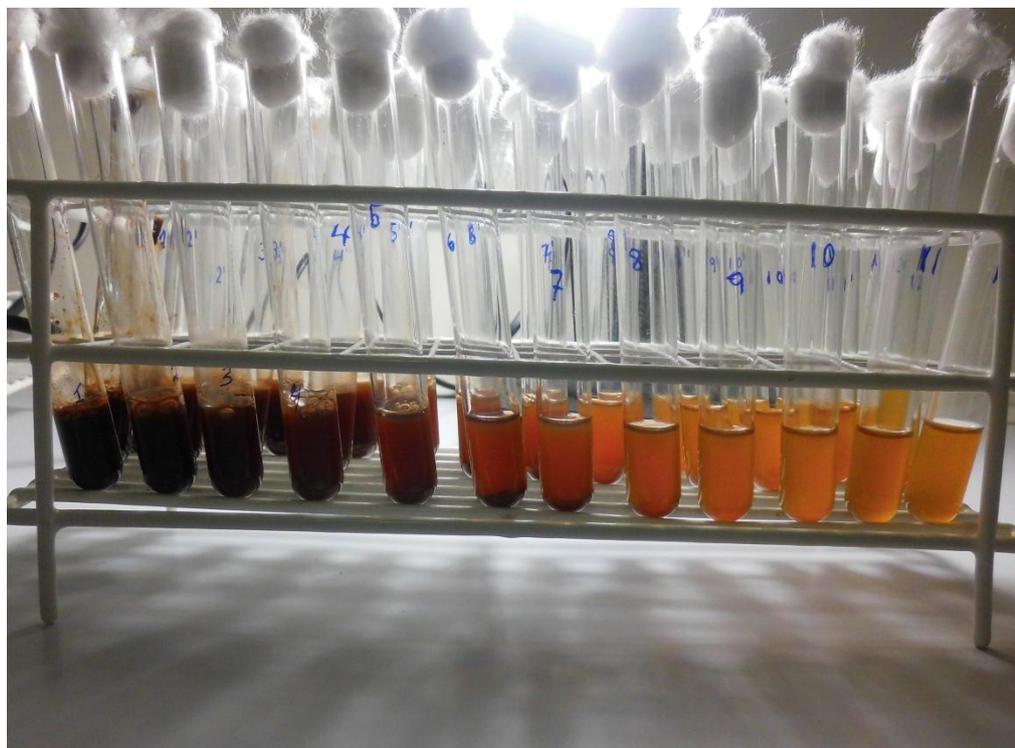
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 14.- Concentración mínima inhibitoria de extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.



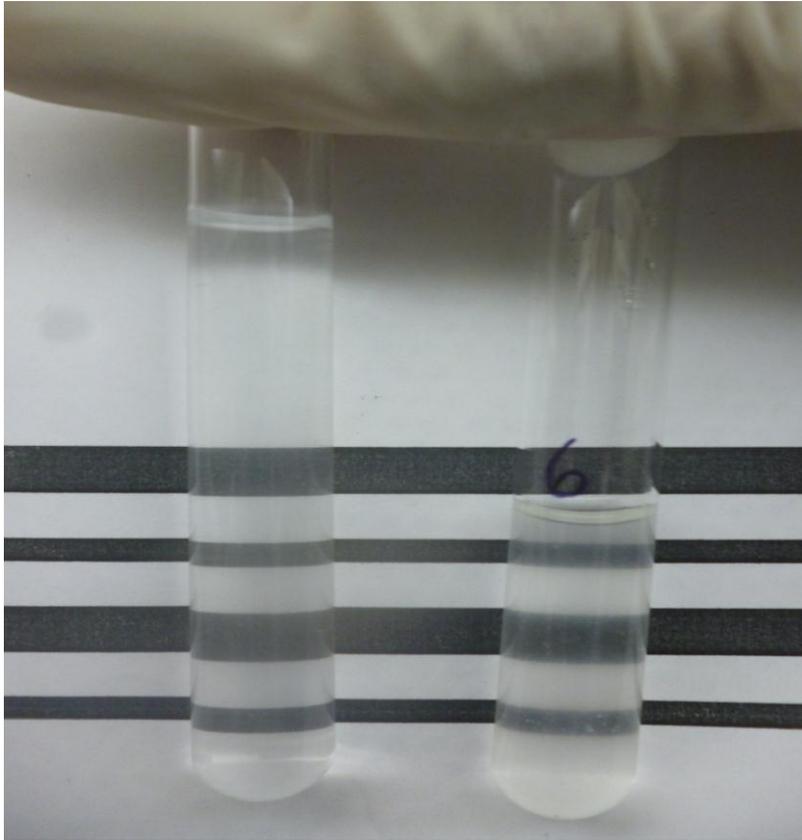
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 15.- Concentración mínima inhibitoria de extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Geranium ayavacense*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.



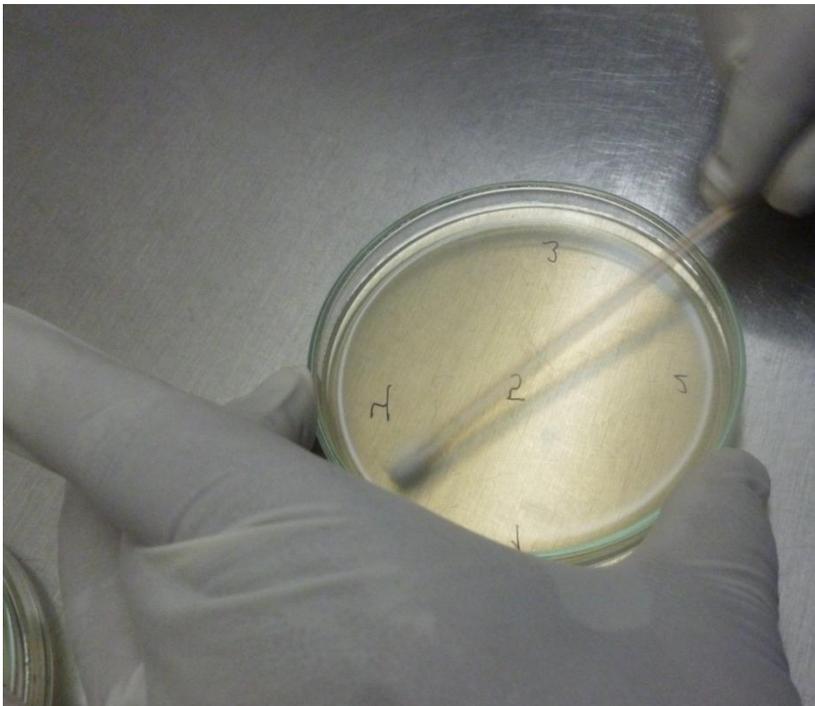
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 16.- Estandarización MC Farland 0.5



FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 17.- Inoculación de la cepa bacteriana (Hisopado).



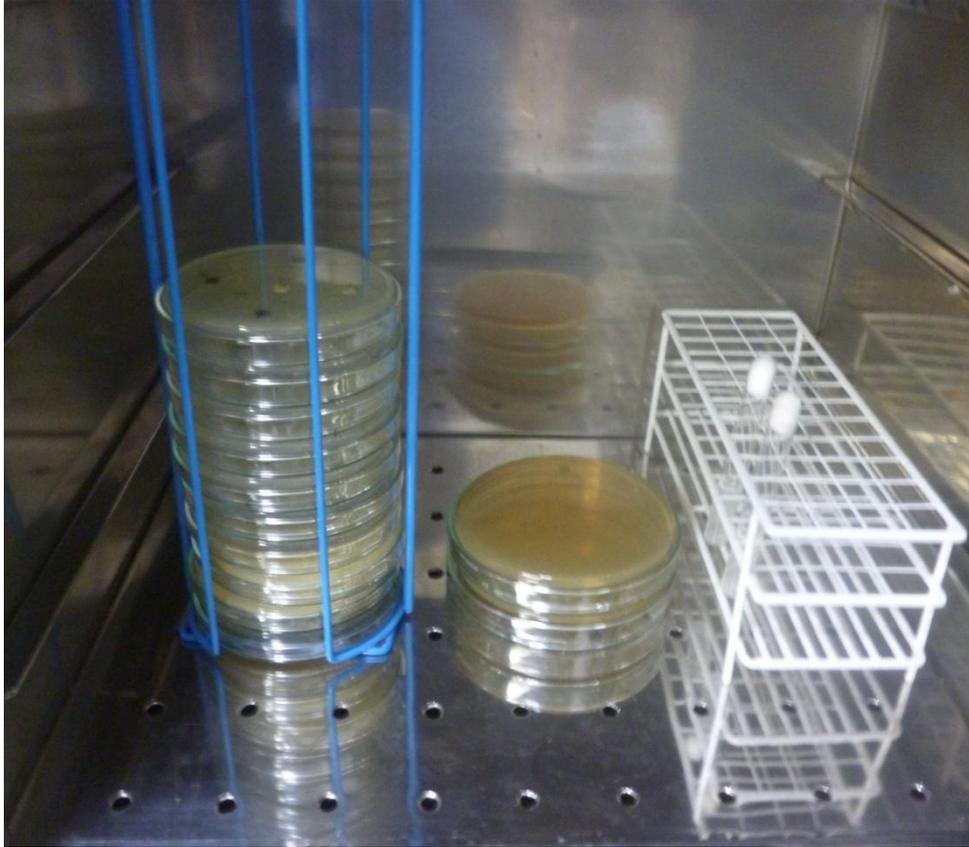
FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 18.- Aplicación de los discos de sensibilidad.



FUENTE: Obtenido por los autores.

Anexo 19.- Incubación.



FUENTE: Obtenido por los autores.

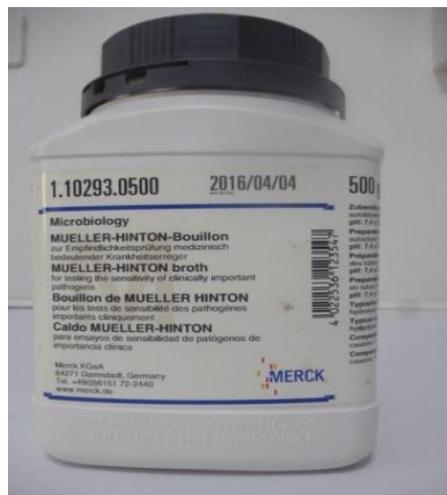
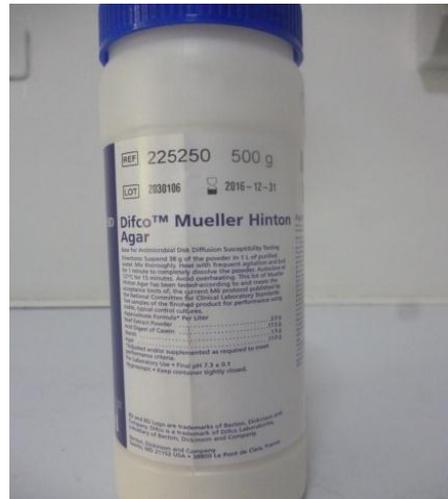
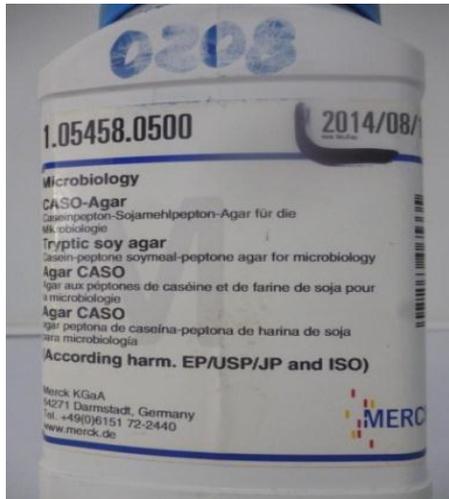
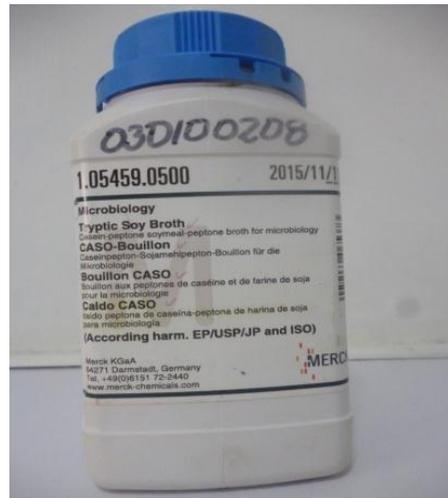
Anexo 20.- Discos de sensibilidad de Gentamicina.



Anexo 21.- Cepas bacterianas en estudio proporcionadas por el INS.



Anexo 22.- Medios de cultivo.



Anexo 23.- PROTOCOLO DE ESTUDIO (formatos para la recolección de datos).

**EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS VEGETALES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
EN EL INSTITUTO DE MEDICINA TRADICIONAL IMET-ESSALUD.**

Extracto a Evaluar :
 Género : Especie:
 Nombre Común :
 Fracción N° :
 F. de Procesamiento:

1. CAPACIDAD ANTIMICROBIANA:

Microorganismos ATCC	DZI (mm)		
	Placa N°01	Placa N°02	Placa N°03

DZI: Diámetro de la zona de inhibición.

2. PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO.

Microorganismos ATCC	X DZI Extracto	X DZI Control	%AA

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

%A/A: Porcentaje de actividad antimicrobiana.

