

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
NUEVOS TIEMPOS, NUEVAS IDEAS



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE LAS HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus***

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

**MUÑOZ CABANA, MILAGROS YOVANA
SANTA CRUZ LOPÉZ, KAREM GISSELA**

ASESOR:

MG. Q.F. LUIS ROA CHUNGA

LIMA – PERÚ

2018

TÍTULO:

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE LAS HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus***

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada principalmente a Dios, al que me ha brindado la dicha de existir y forma parte de su maravillosa creación.

A mis Padres y hermanos quienes siempre han estado apoyándome y alentándome, sin ningún interés, en este camino de lucha y persistencia de mi formación profesional.

Milagros Muñoz.

A Dios por la oportunidad.

A mis padres y hermanos por confiar en mis decisiones, por su amor, apoyo incondicional y ánimo constante.

Gissela Santa Cruz

AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor de tesis, Q.F. Luis Roa Chunga, por su paciencia, tiempo, guía y orientación en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

A mi compañera de tesis ya que ambas de forma simultánea nos hemos exigido, apoyado y alentado a culminar con éxito nuestra investigación.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimientos

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Resumen

Abstract

Introducción.....	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Identificación y formulación del problema	5
1.2.1. Problema general	5
1.2.2. Problemas específicos	5
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	6
1.5. Limitaciones de la investigación.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes de la Investigación	8
2.1.1. Antecedentes nacionales	8
2.1.2. Antecedentes internacionales.....	10
2.2. Bases Teóricas	13
2.2.1. <i>Punica granatum</i> (granada)	13
2.2.1.1. Ubicación botánica	13
2.2.1.2. Descripción botánica	14
2.2.1.3. Uso tradicional.....	15
2.2.1.4. Composición nutricional	15

2.2.1.5. Composición química de la granada	16
2.2.1.6. Taninos.....	17
2.2.1.7. Clasificación de taninos.....	17
2.2.1.8. Ácido elágico.....	17
2.2.1.9. Ácido gálico.....	19
2.2.1.10. Uso terapéutico de <i>Punica granatum</i>	20
2.2.2. Método para evaluar la actividad antimicrobiana	21
2.2.2.1. Método de difusión en agar	21
2.2.2.2. Método por dilución en caldo.....	22
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2.2.3.1. Taxonomía	23
2.2.3.2. Características morfológicas	24
2.2.3.3. Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	24
2.2.3.4. Epidemiología.....	25
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.2.4.1. Taxonomía.....	26
2.2.4.2. Características morfológicas.....	26
2.2.4.3. Importancia clínica.....	27
2.2.4.4. Epidemiología.....	27
2.3. Formulación de Hipótesis	29
2.3.1. Hipótesis general	29
2.3.2. Hipótesis específicas	29
2.4. Operacionalización de Variables e Indicadores	30
2.5. Definición de Términos Básicos.....	31
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	33
3.1. Tipo y Nivel de Investigación	33

3.2. Diseño de la Investigación	34
3.3. Población y Muestra de la Investigación	34
3.3.1. Población	34
3.3.2. Muestra	35
3.4. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	35
3.5. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	35
CAPITULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	46
4.1. Procesamiento de Datos: Resultados	46
4.2. Discusión de Resultados	67
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1. Conclusiones	70
5.2. Recomendaciones	71
Referencias Bibliográficas	72
Anexos	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Composición nutricional de la parte comestible de <i>Punica granatum</i> .	15
Tabla N° 2	Principales constituyentes químicos de <i>Punica granatum</i> L. árbol y fruto.	16
Tabla N° 3	Prueba de solubilidad del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (granada)	46
Tabla N° 4	Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (granada)	47
Tabla N° 5	Manual de procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (INS, 2002).	48
Tabla N° 6	Susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico de referencia.	48
Tabla N° 7	Actividad antibacteriana de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	50
Tabla N° 8	Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Tabla N° 9	Prueba de Levene de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Tabla N° 10	Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	53
Tabla N°11	Comparaciones múltiples de la prueba de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	54

Tabla N°12	Prueba de subconjuntos de datos de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas frescas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	56
Tabla N°13	Actividad antibacteriana de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Stahylococcus aureus</i> .	57
Tabla N°14	Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	58
Tabla N°15	Prueba de Levene de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Tabla N°16	Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Tabla N°17	Comparación múltiple de la prueba de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Tabla N°18	Prueba de subconjuntos de datos de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente <i>Staphylococcus aureus</i> .	63

Tabla N°19 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. 64

Tabla N°20 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538 66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Fitoconstituyentes químicos principales de <i>Punica granatum</i>	20
Figura N° 2	Flujograma de la extracción del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada)	37
Figura N° 3	Prueba de solubilidad	46
Figura N° 4	Susceptibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 frente a Gentamicina	49
Figura N° 5	Susceptibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 frente a Gentamicina	49
Figura N° 6	Media del diámetro de los halos de inhibición de <i>Púnica granatum</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expresados en mm	50
Figura N° 7	Media del diámetro de los halos de inhibición de <i>Púnica granatum</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> expresados en mm	57
Figura N° 8	CMI del extracto etanólico <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	65
Figura N° 9	Control positivo <i>Pseudomonas aureginosa</i> . (TSB con el inóculo).	65
Figura N° 10	CMI del extracto etanólico <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	67
Figura N° 11	Control positivo <i>Staphylococcus aureus</i> . (TSB con el inóculo)	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	Matriz de consistencia.....	83
Anexo N° 2	Certificado <i>Punica granatum</i>	84
Anexo N° 3	Constancia de haber realizado la parte experimental	85
Anexo N° 4	Certificado Microbiológico <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
Anexo N° 5	Certificado Microbiológico <i>Staphylococcus aureus</i>	87
Anexo N° 6	Prueba de Solubilidad	88
Anexo N° 7	Screening Fitoquímico.....	89
Anexo N° 8	Instrumento de recolección de datos.....	91
Anexo N° 9	Instrumento de recolección de datos.....	92
Anexo N° 10	Instrumento de recolección de datos	93
Anexo N° 11	Ficha de Validación por Juicio de Expertos.....	94
Anexo N° 12	Preparación del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i>	95
Anexo N° 13	Análisis fitoquímico de metabolitos secundarios	98
Anexo N° 14	Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> mediante el método difusión en agar.....	107
Anexo N° 15	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las hoja de <i>Punica granatum</i> (granada) frente a <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> mediante el método de macrodilución	115

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de la *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Metodología: El estudio fue de tipo experimental, transversal y prospectivo. Su fase experimental se desarrolló *in vitro*. Se emplearon métodos de difusión en agar para evaluar el efecto antibacteriano, así como el método de macrodilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto. El tratamiento control para el método de difusión en agar se basó en gentamicina y para la macrodilución, el medio de cultivo con el inóculo. Resultados: La media de los halos de inhibición del extracto etanólico de hojas de *Punica granatum* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fue al 25% (6,39 mm), al 50% (6,77mm), al 75%(9,80mm) y al 100%(10,04mm).

En cepas de *Staphylococcus aureus* la media de los halos de inhibición fue con el extracto al 25% (22,03mm), al 50% (25,41mm), al 75%(25,23mm) y al 100%(26,35mm).

Conclusiones: El extracto etanólico de las hojas *Púnica granatum* (Granada), tiene un buen efecto antibacteriano sobre el crecimiento *Staphylococcus aureus* más no en *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras Clave: *Punica granatum*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; concentración mínima inhibitoria; halo de inhibición.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of the leaves of *Punica granatum* (pomegranate) in strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Methodology: The study was experimental, transversal and prospective. Its experimental phase was developed in vitro. Agar diffusion methods were used to evaluate the antibacterial effect, as well as the macrodilution method in broth to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract. The control treatment for the agar diffusion method was based on gentamicin and for macrodilution, the culture medium with the inoculum. Results: The average of the halos of inhibition of the ethanolic extract of leaves of *Punica granatum* against strains of *Pseudomonas aeruginosa* was 25% (6,39 mm), 50% (6,77mm), 75% (9,80mm) and at 100% (10,04mm).

In strains of *Staphylococcus aureus* the mean of the halos of inhibition was with the extract at 25% (22,03mm), at 50% (25,41mm), at 75% (25,23mm) and at 100% (26,35mm).

Conclusions: The ethanolic extract of the leaves *Púnica granatum* (Granada), has a good antibacterial effect on the growth of *Staphylococcus aureus* but not on *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras Clave: *Punica granatum*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*; minimum inhibitory concentration; inhibition halo.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias, hoy en día, conocidas como infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) son un importante problema de salud público que perjudican tanto al paciente, al entorno familiar y al personal médico asistente; constituyéndose para las instituciones de salud un desafío; por ser de alto riesgo para los pacientes hospitalizados o pacientes que reciben los servicios de salud.¹

Las infecciones intrahospitalarias (IIH) afectan aproximadamente uno de cada veinte pacientes que ingresa en los hospitales y son las causantes de la permanencia hospitalaria a largo plazo, la limitación de larga duración de las actividades normales del paciente, la resistencia de los microorganismos frente a los distintos antimicrobianos, incremento de los gastos en la salud pública, gastos de los pacientes, familiares y las muertes innecesarias.²

La OMS nos menciona que en un país desarrollado; los pacientes hospitalizados contraen infección en un porcentaje 2,5% y 5% aumentando las cifras en países en vías de desarrollo. En EE.UU., por cada 136 pacientes uno adquiere una enfermedad a causa de una infección intrahospitalaria, y al año se presentan 80 mil casos funestos. En México se estiman en 450 mil casos, provocando que al año por cada 100 000 habitantes existan 32 casos de muerte.³

Los agentes infecciosos más importantes en las infecciones intrahospitalarias son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* entre otros microorganismos. Se ha señalado que hay una gran posibilidad de que las infecciones que adquiere un paciente en el área de unidades de cuidado intensivo, se deban a la alta resistencia de las bacterias frente a los antibióticos. Los efectos de las infecciones se deben a la infectividad a largo plazo, a la falibilidad de las respuestas al tratamiento y la alternancia a drogas de segunda o tercera línea que poseen mayor toxicidad y altos costos.⁴

Por otro lado, en los últimos años ha surgido un interés por el estudio de las plantas como medicina alternativa; siendo las plantas un recurso apreciado en los sistemas de

salud de los países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que la medicina tradicional y sus tratamientos en base al uso de los extractos de plantas, es empleada por más del 80% de la población mundial. De acuerdo a la OMS (1979) nos menciona que una planta con propiedades medicinales es una especie vegetal que posee sustancias con principios activos, utilizados para fines terapéuticos o para la elaboración de nuevos fármacos⁵.

La granada (*Punica granatum* L.) es una planta alternativa frente a esta situación problemática; es un vegetal de rubro milenario al cual se le atribuyen excelentes propiedades sensoriales y antioxidantes, como también una destacada actividad biológica con efecto antibacteriano, antiviral, anticancerígeno, antimutagénico, entre otros, por lo que es ampliamente utilizada en la medicina popular para el tratamiento de diversas enfermedades ⁶. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo es investigar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; así como dar a conocer los resultados para una mejor utilización de la especie vegetal estudiada.

Existen diferentes pruebas de sensibilidad que permiten determinar la actividad de un antimicrobiano frente a un microorganismo. El Método de Difusión en Agar de Kirby Bauer es un método rápido, sensible y reproducible empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico; permitiendo evaluar varias concentraciones para un extracto frente a varios microorganismos, este método es utilizada a nivel Iberoamericano por el Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. El método de dilución es otra prueba de sensibilidad que permite cuantificar la concentración mínima de inhibición de un antimicrobiano; que es la mínima cantidad del extracto capaz de inhibir un microorganismo mediante la preparación de diluciones del extracto a diferentes concentraciones⁷.

Dichos métodos mencionados permitirán determinar los objetivos de la presente investigación, dando a conocer una alternativa de solución, frente a la situación problemática que padece el sistema de salud pública, en cuanto a las infecciones causadas por resistencia bacteriana al uso indiscriminado de antibióticos.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

Las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS), provocan con frecuencia la morbilidad, mortalidad de las personas e imponen una importante carga de riesgos y preocupaciones para los pacientes, al personal sanitario y al sistema del sector Salud, representando así un importante y gran problema de salud pública presente en todos los países del mundo, pero con diferente grado de desarrollo.⁸

La Organización Mundial de la Salud indica que a nivel mundial las personas contraen infecciones en el hospital; en una cantidad mayor de 1,4 millones de casos, además nos menciona que hay un mayor riesgo de contraer IAAS en los países en vías de desarrollo que en los desarrollados .⁹

En el Perú se ha reportado a nivel nacional para el periodo 2012 – 2014 un total de 10,938 casos de infecciones intrahospitalarias, siendo la infección por herida operatoria la infección más frecuente (2,933 casos), seguido por las neumonías asociadas a ventilación mecánica (2,219 casos), Infecciones de las vías urinarias asociado a Catéter Urinario Permanente (2,068 casos).¹⁰

Uno de los principales problemas que enfrenta la salud pública es la resistencia bacteriana a los distintos antibióticos, esto se debe al aumento de cepas multiresistentes causantes de infecciones y al desarrollo lento de nuevos productos antimicrobianos. Los principales factores que permite esta situación son: la automedicación no controlada por parte de la sociedad, el tiempo de administración del fármaco, la errónea dosificación y los tratamientos sin resultado positivo a nivel intrahospitalario que incrementa la resistencia de las cepas particularmente en *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae* entre otros.¹¹

La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* es dada por la presencia de genes de origen cromosómico y extracromosómico cuya propagación a casi todas las especies bacterianas se debe principalmente al incorrecto uso de los antibióticos. El incremento de las infecciones nosocomiales causadas por *Pseudomonas aeruginosa* son responsables de infecciones como sepsis, neumonía, meningitis, entre otras. De esta manera las unidades más afectadas son las de cuidados intensivos y quemados, en donde el uso masivo de antibióticos ha provocado la aparición de cepas multirresistentes.¹²

Asimismo, la resistencia que ha desarrollado el *Staphylococcus aureus* contra los antibióticos betalactámicos como la meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) a nivel mundial, ha provocado infecciones peligrosas como neumonía necrosante, osteomielitis y sepsis¹³.

Por lo tanto las enfermedades infecciosas adquiridas en los hospitales por los pacientes susceptibles a estos agentes; reflejará el índice de morbilidad y mortalidad y el aumento de costos para el manejo de nuevos tratamientos. El problema de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud radica en el alto nivel de resistencia frente a múltiples antibióticos que consiguen los microorganismos como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; llevando a cabo el incremento de enfermedades infecciosas de gravedad y de difícil tratamiento convirtiéndose en un problema de gran preocupación de salud pública en los hospitales de nuestro país.

Frente a las razones expuestas, las hojas de *Punica granatum* (granada) constituyen una clara alternativa antibacteriana.

1.2 IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 PROBLEMA GENERAL

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*?

1.2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1. ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) mediante el método de difusión en agar?
2. ¿Cuál es la CMI *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*?
3. ¿Cuál es la CMI *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Staphylococcus aureus*?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) mediante el método de difusión en agar.
2. Determinar la CMI *in vitro* del extracto etanólico de la hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Determinar la CMI *in vitro* del extracto etanólico de la hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Staphylococcus aureus*.

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por diversos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* representa una gran preocupación en la salud pública ya que son las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, según diversos estudios a nivel internacional, hasta 28 a 38% de las bacteriemias, son causadas por *P. aeruginosa*¹⁴, con una incidencia de 4,7 casos por 100,000 personas al año.¹⁵

En 2008, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) estimó que un total de 171,200 infecciones nosocomiales de *Staphylococcus aureus* resistente a *meticilina* MRSA se adquieren anualmente en los Estados miembros de la Unión Europea (UE).¹⁶

Utilizándose frente a este gran problema, estrategias de uso farmacológico de origen natural y de valioso recurso, ofreciendo grandes probabilidades de hallazgo de nuevas sustancias antimicrobianas.

Por otro lado, es conveniente el empleo de tratamientos alternativos derivados de plantas medicinales, como por ejemplo el efecto beneficioso del extracto de las hojas *Punica granatum* usado en diversos países del mundo con fines terapéuticos en diversas enfermedades. En la actualidad, las enfermedades infecciosas intrahospitalarias causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* son tratadas con la medicina convencional cuyas consecuencias son: los efectos adversos al problema, daño toxicológico debido a su frecuencia de consumo o dosis y resistencia a múltiples antibióticos.

Asimismo se espera no solo brindar alternativas de gran beneficio a la salud, sino también investigar la importancia de la diversidad bótica en cuanto al uso medicinal de las plantas ;como es en este caso , el estudio de las hojas de *Punica granatum*, fuente de desarrollo de nuevos agentes antibacterianos .

1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

La limitación del presente estudio fue la manipulación de cepas biológicas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por lo cual tuvimos que recibir una adecuada capacitación sobre su uso y manejo.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 ANTECEDENTES NACIONALES

Bernal R, Rodriguez I¹⁷ (2014) mediante su estudio titulado “Efecto del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*, determinaron el efecto del extracto de la cáscara del fruto de *Punica granatum* sobre la viabilidad de las cepas de estudio. Las concentraciones del extracto que trabajaron fueron (31,25; 62,5; 125; 250 y 500 mg/ mL); empleando como control positivo la gentamicina. Se realizó también la Concentración Mínima Bactericida a partir de las concentraciones de: 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 y 0,98 mg/mL, respectivamente, para *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa*.

Se observó que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico aumenta porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana en el rango de 31,25 a 500 mg/mL. Obteniendo resultados para *S. aureus* (75,88; 90,29; 96,53; 102,72; 112,81%); *S. aureus* ATCC 25923 (52,27; 61,88; 71,96; 80,13; 86,67%) y *P. aeruginosa* (41,57; 52,57; 61,6; 70,47; 85,48 %); También se demostró que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *P. granatum*.

Cárdenas C¹⁸ (2013) En su investigación “Efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* L. “granada” sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus in vitro*”. El objetivo del estudio fue

determinar el efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Punica granatum* L. “granada” sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *in vitro*. Se realizó el estudio con las concentraciones de 50; 100; 200 y 400 mg/mL y se empleó para dicha investigación el método de Kirby Bauer, utilizando la vancomicina como control positivo y el agua destilada estéril como control negativo. Los resultados mostraron que en todas las concentraciones estudiadas, se presentó el efecto inhibitorio sobre las cepas *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo con halos de inhibición de (28,11; 30,50; 33,92; y 33,78 mm), los halos de inhibición para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; fueron de (25,56; 28,08; 30,56 y 30,06 mm) y a la concentración de 200 mg/mL, el extracto hidroalcohólico presentó su mayor actividad inhibitoria.

Escobar B, Quispe L¹⁹ (2017) Realizaron un estudio experimental titulado “Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del Zumo de *Punica granatum* L. (granada)” Demostraron la actividad antibacteriana del extracto frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Emplearon la prueba de sensibilidad para determinar la actividad antibacteriana; haciendo uso de la técnica de difusión en disco. Se prepararon 4 concentraciones de extracto en acetato de etilo y acetona en el zumo de *Punica granatum* L. “granada”; 200 mg/mL. 300 mg/mL. 400 mg/mL. 500 mg/mL. Los cuales fueron enfrentados al crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las zonas de inhibición se determinó de manera cualitativa de acuerdo a lo establecido a la escala de Durafford; efecto inhibitorio *in vitro* en fitoterapia y según la CLSI en estándares antimicrobianos. Los halos de inhibición (16,5; 14 y 12 mm) se obtuvo frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los halos de inhibición formados por *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron de 12,5 y 11 mm y el estudio comparativo fitoterapéutico entre la inhibición microbiana y la cuantificación del ácido elágico fue inversamente proporcional a la inhibición microbiana. Las conclusiones que llegaron es que ambos extractos; presentan fitoconstituyentes

como taninos, flavonoides y azúcares reductores y que ambos extracto se manifiesta la actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, más no frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Romero J, Villegas E²⁰(2017) Realizaron un estudio titulado “Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*”. Este proyecto de investigación analizó el efecto inhibitorio frente al crecimiento de tres principales patógenos; sometidos a la presencia de extractos etanólicos de especies vegetales de las que se tiene referencia pueden inhibir su crecimiento, durante el desarrollo del presente trabajo se midió que tanto efecto se evidenció del crecimiento o no normal de las bacterias en estudio. En la presente investigación se utilizaron cepas bacterianas obtenidas a partir de muestras clínicas las mismas que se identificaron y sometieron a los extractos antes mencionados; teniendo como resultado que las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, fueron inhibidas por los extractos etanólicos de *Punica granatum* y de *Syzygium aromaticum* en las diferentes concentraciones utilizadas en el proceso experimental. Además, se observó que, a medida que las concentraciones de los extractos aumentaban, el efecto inhibitorio era mayor, siendo así que se observó que para la cepa de *Staphylococcus aureus* el efecto inhibitorio fue mucho mayor que en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*, llegando a presentar un halo de inhibición que oscilan entre 13 a 20 mm de diámetro frente a la presencia del extracto de *Syzygium aromaticum* mientras que para el extracto de *Punica granatum* presentó un halo que varió entre 12,44 mm y 20,55 mm de diámetro.

2.1.2 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Abdollahzadeh Sh.²¹ (2011) Realizaron un estudio titulado “Actividades antibacterianas y antifúngicas de extractos de cáscara de *Punica*

granatum contra patógenos orales“. El presente estudio evaluó el efecto del extracto metanólico de la piel de *Punica granatum* (MEPGP) contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*. En este estudio *in vitro*, los organismos orales mencionados se cultivaron en agar sangre y medio de mueller-hinton y luego se insertaron en papel los discos de papel que contenían MEPGP a concentraciones de 4 mg/mL, 8 mg/mL y 12 mg/ml. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en disco de agar. Se compararon los efectos de tres concentraciones diferentes de MEPGP contra microorganismos utilizando ANOVA de una vía y pruebas de Tukey. Todas las concentraciones de MEPGP tenían actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *S. epidermidis*. Solo a concentraciones de 8 mg / mL y 12 mg / mL de MEPGP fue efectivo contra *L. acidophilus*, *S. mutans* y *S. salivarius*. Además; ninguna concentración de MEPGP inhibió a *A. viscosus* y *C. albicans*.

Hama A, Taha Y, Qadir S. ²²(2014) Realizaron un estudio titulado “La actividad antimicrobiana de la granada (*Punica granatum*) jugo. En el presente estudio se evaluó la propiedad antimicrobiana del jugo de granada contra bacterias Gram positivos y Gram negativos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) usando la zona de inhibición del disco. Los extractos acuosos calientes de jugo de granada mostró una zona de inhibición de al menos 14 mm contra *P. aeruginosa* que fue significativamente mayor que la de Ciprofloxacina 4 mm, amikacina 2 mm y ampicilina. La zona de inhibición fue 13 mm contra *E.coli*, que era un poco menor que el de Ciprofloxacino 17 mm mientras era mayor que otro disco de antibiótico, con respecto a *S. aureus* la zona de inhibición era de 14,5 mm, mayor que el de amikacina 2 mm y ampicilina 8 mm pero fue menor que el de ciprofloxacina (16 mm). Este resultado indica que la mayoría de las bacterias fueron resistentes a la mayoría

de los antibióticos debido a amplio uso de estos antibióticos, *P. aeruginosa* fue bien definido como bacterias resistentes contra la mayoría de los antibióticos, los resultados del presente estudio indicó que el jugo de granada tiene un fuerte efecto hacia *P. aeruginosa* este resultado tiene importancia médica. El estudio de la media de la zona de inhibición de todas las concentraciones 10 mL / mg, 15 mL / mg, 20 mL / mg, 25 mL / mg y 30 mL / mg mostraron efecto antibacteriano y la concentración mínima de inhibición fue 10 mL / mg. El efecto antibacteriano de *P. granatum* fue más claro en la *P. aeruginosa* que puede deberse a que contiene una gran cantidad de taninos (25%). El resultado de este estudio mostró un claro efecto antibacteriano del jugo de granada contra las bacterias Gram negativas y Gram positivas, el diámetro de las zonas de inhibición significativamente mayor en jugo de granada en comparación con el disco antibiótico estándar. El presente estudio concluyó que el jugo de *Punica granatum* tiene una fuerte actividad antibacteriana.

Jayaprakash A, Sangeetha R.²³ (2016) Llevaron a cabo un estudio titulado “Investigación sobre la actividad antimicrobiana de *Punica granatum* Linn. Extracto de cáscara de acetona”. Se evaluaron cepas bacterianas humanas patógenas y actividad antifúngica contra hongos patógenos de plantas *Pyricularia oryzae*. Se probaron diferentes concentraciones (10, 20 y 30 mg / mL) de extractos de cáscara de acetona contra cepas bacterianas patógenas, a saber, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. La actividad antibacteriana se midió usando un disco de difusión placas en agar. Los diámetros de inhibición se midieron después de la incubación durante 24 a 48 horas a 37 ° C. Espacios en blanco de solvente procesados de la misma manera también se probaron para la actividad antibacteriana. La actividad antifúngica se llevó a cabo mediante el uso de cinco concentraciones diferentes (50, 100, 150, 200 y 250 mg / mL) de cáscara de acetona de *P. granatum* extracto contra la planta de prueba hongo patógeno *Pyricularia oryzae*. Extracto de cáscara de acetona de *Punica granatum* mostró actividad significativa contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *B. cereus* en todas las tres concentraciones probadas. Se encontró la zona inhibidora máxima contra *Bacillus cereus* ($35 \pm 0,40$ mm) donde se registró un efecto inhibidor mínimo contra *B. subtilis* ($7 \pm 0,15$ mm) a una concentración de 10 mg / mL. Se observó que el extracto de cáscara de acetona inhibía el crecimiento de la prueba hongos con aumento en la concentración del extracto. Zona de inhibición máxima (diámetro micelial de $11 \pm 0,20$ mm) en concentración de 250 mg / mL, mientras que la inhibición más baja (diámetro micelial de $69 \pm 0,20$ mm) fue encontrado en una concentración de 50 mg / mL. El presente estudio mostró actividad antimicrobiana interesante y más la caracterización se puede llevar a cabo para probar los extractos de cáscara de acetona para diversas terapias y actividades farmacológicas.

2.2.- BASES TEÓRICAS

2.2.1 *Punica granatum* (granada)

2.2.1.1 Ubicación taxonómica

Taxonomía:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Punicaceae*

Género: *Punica*

Especies: *Punica granatum L.*

Nombre Vulgar: "granada"

2.2.1.2 Descripción botánica²⁴

Punica granatum L. es un árbol que mide aproximadamente de 3m a 6m de altura, a veces toma el tamaño de un arbusto, ésta planta caducifolia presenta un tronco curvo. La corteza es escamosa de color gris y su madera dura. Las ramas jóvenes son cuadrangulares y a medida que pasa los años adquiere una forma redonda. Las ramas pequeñas axilares tiene al inicio la forma de una aguja; su copa es extendida.

Sistema radicular: Su raíz es consistente con presencia de nudos, tiene un color rojizo en la zona de la corteza y es en este lugar donde existe un alcaloide, llamado peletierina o punicina.

Hojas: Son de color verde con brillo en el haz, la disposición de sus hojas en el tallo son opuestas, presenta un peciolo corto, tiene forma lanceolada o aovadas con un borde entero. Habitualmente llegan a medir entre 2 - 8 x 0,8 - 2 cm, en su zona apical presenta glándulas nectarias que segrega azúcares (sacarosa, fructuosa, glucosa); tiene estípulas que a veces son difíciles de apreciarlas.

Flores: Son flores hermafroditas, que se presenta de forma individual o agrupadas de 2 a 5 al extremo de las ramas nuevas y tiene un diámetro aproximadamente de 3 a 4 cm. Su color es rojo de tamaño grande, acampanado, lustroso, cuenta con 5 a 8 pétalos y sépalos, y durante la formación del fruto el cáliz se mantiene presente.

Fruto: Es una baya llamada balausta de forma de forma esférica y levemente aplanada ,su cubierta es lisa y correosa , su color varia de amarillo a rojo-púrpura, con un diámetro aproximadamente de 5 a 12 cm y una longitud de 1 a 6 cm. En la pulpa del fruto presenta muchas semillas duras, la parte comestible es jugosa, acida, astringente y de un de color rosada a rojo-púrpura.

2.2.1.3 Uso tradicional

El uso de la granada ha sido mencionado en la antigua literatura, como textos eyurvedicos²⁵, papiros Ebers y documentos griegos²⁵, ²⁶. Se ha empleado como vermífugo, astringente, bactericida, refrigerante, estimulante²⁶, hemorragias pasivas, lesiones en la boca, ulcera péptica, lepra, inflamación, infecciones del tracto urinario¹³, diarrea, infecciones de garganta, tos y fiebre²⁷, disentería, antiparasitario, dolor abdominal²²

2.2.1.3 Composición nutricional

Tabla N°1. Composición nutricional de la parte comestible de *Punica granatum*.

NUTRIENTE	UNIDAD	VALOR POR 100g
Agua	g	80,97
Energía	Kcal	68
Proteína	g	0,95
Grasa	g	0,30
Carbohidratos	g	17,17
Fibra dietética	g	0,6
Azúcares totales	g	16,57
Vitamina C	mg	6,1
Vitamina A	UI	108
Vitamina E	mg	0,60
Fitoesteroles	mg	17
Colesterol	mg	0
α- Caroteno	µg	50
β- Caroteno	µg	40

Fuente: Carbonel y Sánchez (2012) ²⁸

2.2.1.4 Composición química de la granada

La importancia medicinal de la *Punica granatum L.* es sin duda la presencia de algunos de sus metabolitos especiales como: alcaloides, glucósidos, resinas, aceites volátiles, gomas y taninos, etc. Son los principales activos usualmente concentrados en los órganos de almacenaje de la planta.²⁹ Investigaciones recientes indican los muchos beneficios terapéuticos de los constituyentes químicos de la granada; estos son el ácido elágico, elagitaninos³⁰ (incluidos los punicalcalinos, ácido púnico); flavonoides (antocianinas, antocianidinas, flavonol estrogénicos y flavonas).^{31, 32}

Tabla N°2: Principales constituyentes químicos de *Punica granatum L.* árbol y fruto.

1. Jugo de granada	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico, catequina, quercetina, rutina, y numerosos minerales y aminoácidos.
2. Aceite de semilla de granada	95% de ácido púnico, otros constituyentes incluido el ácido elágico, esteroides y ácidos grasos.
3. Pericarpio de granada (cáscara externa, recubrimiento interno)	Punicalginos fenólicos, ácido gálico otros ácidos grasos, quercetina, catequina, rutina, flavonoles, flavonas, flavononas y antocianinas.
4. Hojas de granada	Taninos (punicalin y punicafolin) y flavonas glucosídicas
5. Flores de granada	Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, ácido maslínico, ácido asiático, y demás constituyentes aun no identificados.
6. Tallo y raíz de granada	Numerosas piperidinas alcaloides, Elagitaninos, incluidos punicalino y punicalagino

Fuente: Garachh, D. et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*.³²

2.2.1.5 Taninos

Los taninos son definidos como compuestos polifenólicos, solubles en agua, con pesos moleculares que van de 500 Da a los 20 000 Da³³, en la naturaleza se encuentran distribuidos ampliamente en plantas, frutos, hojas, tallos, cortezas, raíces y troncos.³⁴ Este tipo de compuestos son considerados como metabolitos secundarios de las plantas.³⁵

Los vegetales y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, madera, raíz, hojas. En condiciones normales, los taninos vegetales representan del 2 al 7% del peso fresco de la planta.³⁶

2.2.1.6 Clasificación de taninos³⁷

- a) Hidrolizables: (galotaninos y elagitaninos) Son aquellos que en presencia de enzimas o ácido, se hidrolizan en ácido gálico, ácido elágico y en azúcares.
- b) Condensados: Esta clase de tanino en presencia de ácido no llega a hidrolizarse, formándose más polímeros insolubles de masas amorfas llamadas *flobafenos*; son derivados de 3-hidroxi-y 3,4-hidroxi-flavanos.

2.2.1.7 Ácido elágico

La nomenclatura IUPAC del ácido elágico es 2,3,7,8- tetrahidroxi cromeno[5,4,3-cde]cromeno-5,10-diona.³⁸ Es un polifenol que derivan del dímero del ácido gálico, se encuentra en forma libre, glicosilado simple o como complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidroxidifénico) en algunos frutos.^{30,39}

Distribución:

El ácido elágico y elagitaninos se obtiene principalmente de los vegetales, están presentes en las raíces, tallos, ramas, hojas, fruto y corteza .³⁰ En las frutas (pulpa, piel, semillas, etc) están en sus diversos tejidos y a diferentes concentraciones .³⁹

Aplicación terapéutica

El ácido elágico ha demostrado ralentizar o incluso impedir la división de las células malignas. Por otra parte, presenta una potente actividad antioxidante, impidiendo así la propagación del cáncer y evitando la multiplicación de los virus, como por ejemplo el del papiloma humano y el virus de inmunodeficiencia humana.³⁰ Las propiedades antioxidantes del ácido elágico permiten neutralizar los radicales libres, quelar metales tóxicos y activar enzimas antioxidantes, contribuyendo así al fortalecimiento del sistema de defensa antioxidante del cuerpo. Además, otras propiedades beneficiosas antiinflamatorias, antimicrobianas y antialérgicas etc^{24, 40}

Infecciones bacterianas

Debido a la presencia de ácido elágico, existen estudios que reportan la actividad antimicrobiana,^{30, 40,41} ya que tiene efecto sobre hongos, bacterias y parásitos. Se ha estudiado algunos extractos de la planta *Pteleopsis hylodendron*, primordialmente derivados del ácido elágico, que presentan actividad contra determinadas bacterias patógenas, como *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella pyogenes*. En la planta de *Punica granatum* L. se recolectaron extractos los cuales demostraron la capacidad de poder inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en concentraciones de 70 mg/mL.^{40, 42}

2.2.1.8 Ácido gálico

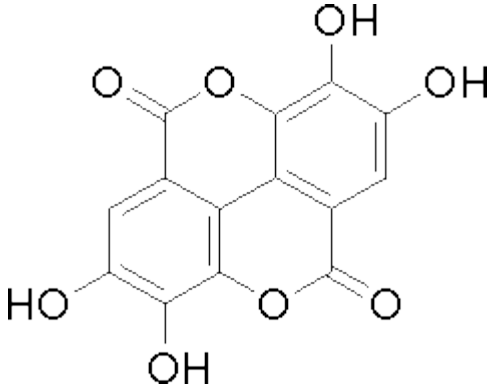
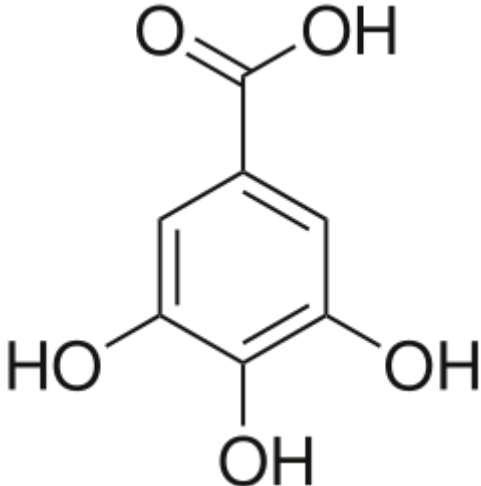
El ácido gálico, también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico es un ácido fenólico que se encuentra presente en distintas fuentes naturales como: uva, granada, *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Turnera diffusa* (damiana); cáscara de manzana, limón, nueces, plátano, fresa, arándano, espinacas, mango; acelgas, café, vino tinto y té verde.⁴³

Aplicación terapéutica

Tienen diversos efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante⁴³ y antibacteriana⁴⁴, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena. El ácido gálico tiene usos en distintas áreas, especialmente en la industria farmacéutica, debido que es una sustancia precursora en la elaboración de antibióticos de amplio espectro como la trimetoprima. En el área de alimentaria se utilizan, como antioxidante de aceites y grasas, como aditivo de algunos alimentos y bebidas, evitando de esta forma su oxidación.^{45, 46,47}

Infecciones bacterianas

El ácido gálico presenta actividad antibacteriana ^{43,44} debido a que inhiben las enzimas de algunos microorganismos, a su capacidad de unirse a polisacáridos, a su acción sobre las adhesinas (proteínas de la pared celular), actuando de esta manera en el desarrollo microbiano.⁴³

Constituyentes químicos	Estructura química
Ácido elágico	 <p>The image shows the chemical structure of ellagic acid, which consists of two pyrogallol units linked by two ester bonds. Each pyrogallol unit is a benzene ring with three hydroxyl groups at the 1, 2, and 3 positions. The ester bonds connect the 4 and 5 positions of one pyrogallol unit to the 1 and 2 positions of the other.</p>
Ácido gálico	 <p>The image shows the chemical structure of gallic acid, which consists of a central benzene ring with three hydroxyl groups at the 1, 2, and 3 positions and a carboxylic acid group at the 4 position.</p>

Fuente: Garachh, D. et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*.³²

Figura N°1: Fitoconstituyentes químicos principales de *Punica granatum L.*

2.2.1.9 Uso terapéutico de *Punica granatum*

- a) La presencia de compuestos fenólicos evidencia su actividad antioxidante, ya que muestran la presencia de ácido elágico, ácido gálico, taninos hidrolizables como punicalina y punicalagina, quienes poseen dicha capacidad.^{28,46}

- b) Capacidad anticancerígena²⁸, los extractos alcohólicos en investigaciones *in vivo* e *in vitro* han mostrado una significativa capacidad anticancerígena.⁴⁷

- c) Capacidad antiinflamatoria²⁸, La gran cantidad de compuestos fenólicos muestra un potencial de inhibición del ácido Nítrico (NO), reduciendo significativamente el edema del ratón causado por carragenina.⁴⁸
- d) Capacidad antiaterosclerótica ²⁸, la presencia de compuestos fenólicos, ayudan a prevenir distintas enfermedades y disminuir factores de riesgo como hipertensión arterial, colesterol alto y el stress oxidativo. ⁴⁹
- e) Acción bactericida y antifúngica²⁸, se demostró que el efecto de la concentración del extracto metanólico tiene actividad *in vitro* de: *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* *Proteus Mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus aureus*, y *Candida albicans* a una concentración de 60,0µg/mL. La decocción de la droga cruda inhibe el crecimiento de: *Trichophyton tonsurans*, *T. simii*, *T. rubrum*, *T. rubrum*, *Trichosporon beigelii*, *Microsporum fulvum*, *M. gypseum* y *Candida albicans*, cuando fue añadido una concentración del 5% al medio de crecimiento.⁴⁷

2.2.2 MÉTODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), hoy conocido como el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); han desarrollado e impulsado hace muchos años; el empleo de guías estandarizadas para llevar a cabo las prácticas de laboratorio clínico de calidad, estos métodos utilizados en los laboratorios tiene resultados lógicos y se caracterizan por su reproducibilidad y repetibilidad.⁵⁰ A continuación presentamos algunos de estos métodos:

2.2.2.1 MÉTODO POR DIFUSIÓN EN AGAR

La National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) sugiere el empleo del método de disco en placa o Kirby Bauer para determinar la

susceptibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos. El método consiste en la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo sólido (Agar) donde se han depositado inóculos previamente preparado a partir de un cultivo puro. El antimicrobiano se presenta a concentraciones conocidas en discos, tabletas, tiras, o pozos que están dentro del medio y que actúa como centro de difusión. Este método está fundamentado en precisar la formación de un halo de inhibición que responde a la sensibilidad de los microorganismos frente a un antimicrobiano presente en los dichos centro o foco. El halo de inhibición se relaciona con la concentración más baja del extracto que inhibe el microorganismo estudiado. Por lo tanto, a mayor zona de inhibición, más bajo será la concentración de agente antimicrobiano requerido para impedir la proliferación de los microorganismos. No obstante, se debe tener en cuenta que la formación del halo alrededor del disco depende de la concentración de antibiótico y su capacidad de difundirse en un medio de cultivo (agar).⁵⁰

Este método es la más utilizada en las investigaciones de sensibilidad bacteriana, sin embargo, tiene la desventaja de ser poco representativos siempre y cuando la muestra o agente antibacteriano se difunda con dificultad debido a la poca o nula relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana lo cual fue demostrado por Pellecuer et al. ^{51,52}

2.2.2.2 MÉTODOS POR DILUCIÓN EN CALDO

Consiste en la dilución de varias muestras de concentraciones predeterminadas del antimicrobiano con el inóculo, las variadas concentraciones de un agente antimicrobiano (generalmente son diluciones dobles seriadas) en un medio líquido de formulación preestablecida. El método se lleva a cabo en tubos de muestras que contienen bajos volúmenes en ml (macrodilución) o en volúmenes más pequeños

empleando placas de micro titulación (microdilución^{50, 53}. Las muestras se examinan después de incubar a 35 °C y 24 horas y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo a prueba.

El uso de este método tiene ventajas en cuanto a su reproductibilidad, rapidez, sensibilidad, facilidad de estandarizar y procesar una gran cantidad de muestras; como también en posibilitar su uso en el estudio de antimicrobianos en muestra solubles en agua o insolubles como los aceites esenciales⁵⁴

2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*:

2.2.3.1 Taxonomía

Filo Proteobacteria

Clase Gammaproteobacteria

Orden *Pseudomonadales*

Familia *Pseudomonadaceae*

Género *Pseudomonas*

Especie *P. aeruginosa*

2.2.3.2 Características Morfológicas:

Bacteria aerobia gram-negativa tiene forma de finos bastoncitos y una longitud aproximada de 1 a 3 µm de largo y 0,5 a 1,0 µm de ancho. Generan pioverdina (pigmento amarillo verdoso) y piocianina (pigmento azul hidrosoluble), la presencia de flagelos polares le confiere movilidad a la bacteria⁵⁵.

Estos microorganismos son capaces de tolerar grandes variaciones de temperaturas que oscilan de (4 - 42°C), del mismo modo pueden metabolizar una variedad de sustancia como fuentes de carbono y nitrógeno. Debido a la versatilidad metabólica mencionada; tienen la

capacidad de desarrollarse en distintos lugares ya sea en un medio acuáticos y terrestres, de esta forma las bacterias han adquirido resistencia a antibióticos, detergentes y metales pesado⁵⁶.

2.2.3.3 Importancia Clínica

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* constituye un gran problema clínico ya que dichas bacterias están relacionado al medio hospitalario. Estas bacterias se las han relacionado con las infecciones producidas por el instrumental médico: catéteres, estetoscopios, prótesis, soluciones desinfectantes, jabones, etc ^{57,58}

Raramente ocasiona infección en hospederos inmunocompetentes, sin embargo En pacientes inmunodeprimidos (pacientes con cáncer, quemados, diabetes, neutropénicos, etc.) las infecciones pueden ser de alto riesgo, que en ciertos casos pueden llevarlo a la muerte en pacientes inmunocompetentes rara vez produce infecciones ⁵⁹. Por tal motivo este patógeno oportunista es uno de los grandes responsables de la infecciones intrahospitalaria ⁶⁰ Los lugares principales de infección son los sitios húmedos como los ojos, oídos, piel, tracto urinario, respiratorio, y con mayor probabilidad en pacientes con fibrosis quística causando infecciones respiratorias crónicas.⁶¹

Forman biopelículas cuando dichas bacterias se comienza a adherir a la superficie de ambiente acuoso ⁶², está biopelículas son acumulaciones de bacterias y material extracelular, dichas acumulaciones pueden estar presentes dispositivos que se implantan al interior del cuerpo humano como catéteres, válvulas cardiacas, dispositivos intrauterinos.⁶³

Según los datos de vigilancia obtenidos por la Red Nacional de Seguridad Sanitaria (NHSN) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) 2011-2014, indica que *P. aeruginosa* fue reconocida como la segunda causa más común de neumonía asociada al ventilador (16,5%), el

tercero por causa de infecciones del tracto urinario (10.3%), el quinto por causa de infección del sitio quirúrgico y el décimo por infecciones más comunes del torrente sanguíneo asociado a línea central (4%).⁶⁴

2.2.3.4 Epidemiología

Pseudomonas aeruginosa se caracteriza por estar ampliamente distribuida en la naturaleza formando parte de la microbiota normal del hombre. La tierra, plantas, agua corriente pueden actuar como reservorios con clara predilección por los ambientes húmedos tolerando un amplio rango de temperatura de crecimiento (hasta 50°C).¹²

La facilidad que muestra *Pseudomonas aeruginosa* para crecer tanto en la naturaleza como a nivel nosocomial le permite ser una de las principales causas de infecciones hospitalarias grave.⁶⁵ En el ambiente hospitalario la *Pseudomona aeruginosa* puede colonizar superficies húmedas de los pacientes como oídos, axilas, periné y también se aísla en entornos húmedos inanimados que incluyen aguas de lavamanos, sumideros, duchas, etc. El equipo hospitalario que entra en contacto con soluciones como mopas, soluciones de limpieza, también pueden ser fuentes de *Pseudomonas aeruginosa*.⁶⁶

Aunque muchos menos problemática que la infección nosocomial, la infección adquirida en la comunidad aparece en determinadas ocasiones y también suelen asociarse con las exposiciones a entornos húmedos. Infecciones cutáneas relacionadas con los baños calientes, hidromasajes, piscinas, infecciones oculares por uso prologado de lentes de contactos e infecciones como la otitis externa son las más frecuentes.¹²

2.2.4 *Staphylococcus aureus*

2.2.4.1 Taxonomía⁶⁷

Filo Firmicutes

Clase *Bacilli*

Orden *Bacillales*

Familia *Staphylococcaceae*

Género *Staphylococcus*

Especie *Staphylococcus aureus*

2.2.4.2 Características Morfológicas:

El término de *Staphylococcus aureus* deriva de la palabra griega staphylé, que equivale a decir “racimo de uvas”, es una especie bacteriana Gram positiva, aerobias -anaerobias facultativos que sintetizan la catalasa y coagulasa, están presentes en todas partes de nuestra superficie terrestre. Son microorganismos inmóviles, no esporuladas, generalmente no están capsulados. Cuando crecen sus colonias toman un aspecto liso, brillante, elevado de color amarillo debido a que presentan carotenoide, llegan a medir sus colonias un diámetro aproximado de 1 a 3 mm, gran parte de las cepas en un periodo de 24 a 36 horas ocasionan la destrucción de los glóbulos rojos.⁶⁹

Pueden sobrevivir a extrema condiciones de temperatura, secado, ambiente hipernatrémico e hipóxico ⁶⁸. Un gran número de estas bacterias tiene la capacidad de protegerse contra las defensas del hospedero, como por ejemplo el caso de la producción de la coagulasa que al unirse con el fibrinógeno permite que el plasma se coagule, de esta forma limita la infección. También las proteínas A, actúan frente las inmunoglobulinas, absorbiéndolas del suero y evitando la acción de los anticuerpos de los antibacteriano y de esta manera impedir la fagocitación. ⁷⁰.

2.2.4.3 Importancia Clínica

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo oportunista causante de enfermedad en el ser humano. A nivel mundial, es uno de las bacterias que se encuentran más frecuentemente aislados tanto en infecciones intrahospitalarias como las adquiridas en la comunidad, generando infecciones con elevada morbilidad y mortalidad, debido a la gran facilidad que tienen para invadir y proliferarse en el cuerpo humano, a los factores de virulencia y a la resistencia que ofrecen a los diversos antimicrobianos.⁷¹

El *Staphylococcus aureus* tiene un poder de patogenicidad muy alto, produciendo consecuencias como daños de la superficie de la piel, abscesos localizados, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis y osteomielitis.⁷² son causantes de las infecciones del sistema respiratorio como neumonía, infecciones de las vías urinarias y principalmente de las infecciones intrahospitalarias. También pueden ser responsables de las intoxicaciones alimentarias cuando liberan sus enterotoxinas en los alimentos, también son causante de septicemia, impétigo y fiebres.⁷³

Epidemiología

Se ha calculado que entre el 25 a 35% de personas sanas portan *S. aureus* en la piel y en zonas con mucosidad. Los datos porcentuales representan que aproximadamente dos mil millones personas en todo el mundo, puedan portar este microorganismo en su cuerpo.⁷⁴

En estos últimos años la epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticiclina MRSA (MRSA en inglés) ha variado. Los CA-MRSA son distintos a las cepas hospitalarias, en su epidemiología y en el espectro de enfermedad. Al parecer, estas cepas tienen su origen al exterior de los hospitales, causando especialmente infecciones de piel y

tejidos blandos como los abscesos o infecciones del folículo piloso, en ciertos casos provocan la neumonía necrotizante severa en personas sanas de distintas edades. Se sabe de qué es un riesgo exponernos previamente a los antimicrobianos ya que es probable de ser colonizados por cepas de CA- MRSA; aunque también estas cepas se pueden adquirir mediante la transmisión de algunos animales domésticos o de granja.⁷⁴

S. aureus es considerado como parte de la flora bacteriana del cuerpo, ya que, por cada tres personas hay un individuo que hospeda al microorganismo sin presentar ninguna enfermedad. Las cepas del CA-MRSA son semejantes a las de *S. aureus*, la elevada prevalencia de infecciones pueden ser similares a las correspondientes en cuanto a la cantidad de colonias adquiridas en las narinas.⁷⁴

Los problemas por MRSA se han incrementado en los hospitales de América Latina. El informe recolectado por la PAHO (Organización Panamericana de la Salud) señaló que en el año 2004 la prevalencia de MRSA fue: En Chile 80%, Guatemala 64%, Paraguay 44%, Colombia 47%, Perú 80%, Uruguay 59%, Venezuela 25%, Honduras 12%, Argentina 42%, Bolivia 36%, Nicaragua 20%, Ecuador 25%. Según el estudio realizado por la Asociación Panamericana de Enfermedades Infecciosas, las infecciones por HA-MRSA en el 2016 se elevarán.⁷⁴

2.3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

2.3.1 HIPÓTESIS GENERAL

El extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) presenta efecto antimicrobiano *in vitro* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

2.3.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. Existe efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) mediante el método de difusión en agar.
2. Existe una CMI *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Existe una CMI *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) en cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES E INDICADORES

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de Variable		ESCALA
				Según su naturaleza	Según su función	
<p>V. I.: Extracto etanólico de hojas de <i>Punica granatum</i> (granada)</p>	<p>Sustancia que se elabora a partir de una planta, mediante varios procesos como el secado, pulverización, maceración en etanol, filtración y secado de dicho solvente.</p>	<p>Preparado obtenido por un proceso de maceración, el que se utilizará para elaborar soluciones a diferentes concentraciones.</p>	<p>Concentraciones al: 25 % 50% 75% 100%</p>	Cuantitativa	Independiente	De Razón
<p>V. D.: Efecto antibacteriano frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Es un proceso que mide la eficacia y el poder antibacteriano frente a las cepas de estudio.</p>	<p>Sensibilidad bacteriana Susceptibilidad de las bacterias cuando están en un medio que contiene al extracto vegetal en estudio, manifestándose alrededor de los disco un halo de inhibición. CMI Se define como la mínima concentración del extracto vegetal causante de la inhibición bacteriana.</p>	<p>-Diámetro de halos de inhibición expresada en (mm). -Turbidez del tubo</p>	Cuantitativo	Dependiente	De Razón

2.5 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

1. **Antibacteriano**

Sustancia que tiene la capacidad de eliminar, inhibir el crecimiento o proliferación de las bacterias. Son sustancias activas de los fármacos que se utilizan como antibióticos o de otras sustancias químicas.⁷⁵

2. **ATCC**

Marca registrada de la colección de cultivos de tipo americano.⁷⁶

3. **Cepas**

Son agrupaciones de células clones, que se origina a partir de células iniciales únicas, en la cual se han seleccionado y aislado. Son consideradas como colonias puras bacterianas.⁷⁷

4. **Concentración mínima Inhibitoria (IMC):**

Es la mínima concentración del extracto que inhibe el crecimiento del microorganismo después de un periodo determinado de incubación.⁷⁸

5. **Efecto Antibacteriano *in vitro***

Es un proceso que permite medir la actividad antimicrobiana *in vitro* para determinar el efecto de un antimicrobiano y la sensibilidad de un determinado microorganismo a una concentración conocida del fármaco.⁷⁹

6. **Extracto etanólico:**

Sustancia natural que posee un olor propio obtenido de una materia prima de origen vegetal, mediante procedimientos físicos continuos como: la desecación, pulverización, maceración en etanol, percolación, filtración y secado.⁸⁰

7. **Halos de Inhibición**

Es la zona que rodea al disco, dicho disco contiene una sustancia antibacteriana con capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias después de un tiempo de incubación de 18 a 24 horas y es observado por la formación de halos alrededor del disco.⁸¹

8. ***In vitro***

Es un método que se realiza para el estudio de los procesos o reacciones que ocurre en un ambiente artificial fuera del organismo vivo.⁸²

9. ***Pseudomonas aeruginosa***

Es un bacilo gramnegativo, que posee factores de virulencia, con componentes estructurales, toxinas y enzimas. Habita en distintos ambiente y en los lugares como centros hospitalarios húmedos; causando diferentes cuadros clínicos .⁸³

10. ***Punica granatum***

Es un árbol caducifolio que crece aproximadamente de 3 a 6 m de altura, con el tronco desviado, duro, escamosa y con un color grisáceo. Las ramas jóvenes son más o menos angostas con cuatro alas que se vuelven después de un aspecto redondo y con un color café grisáceo, sus ramas axilares en su mayoría tienen forma de espina y presenta una zona extendida en su copa.²³

11. ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria oportunista que forma parte de la flora bacteriana humana. Frecuentemente colonizan la mucosa nasal y la piel, por lo tanto el hombre es el principal medio donde se desarrolla dichos microorganismo. La colonización de estos microorganismos es más frecuente en los hospitales, en especial en pacientes que presenta hemodiálisis, diabetes tipo 1, lesiones cutáneas o en casos de paciente que presenta VIH y adicciones a las drogas. ⁸⁴

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN

Según al alcance y las características de los resultados, el estudio es de tipo:

- **Experimental:** Debido a la introducción y manipulación del extracto para la determinación del efecto antibacteriano, se tiene un grupo control positivo representado por gentamicina, un grupo control negativo constituido por alcohol 96°; y un grupo experimental conformado por el extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a distintas concentraciones 25%,50%,75%,100%.
- **Transversal:** Debido a que el estudio se realizó en un tiempo determinado, y las variables fueron observadas en un solo momento después de transcurrir un corto periodo de tiempo con una aproximación de 24 horas después de realizado el cultivo.
- **In vitro:** Debido a que el estudio se realiza en medios de cultivo que sirven para el desarrollo de las bacterias y las condiciones de la investigación será manipulado de forma intencional.
- **Prospectivo:** Ya que la recolección de datos se realizará de acuerdo a la ocurrencia de los hechos.
- **Analítico:** Debido a que nos permite analizar los distintos componentes que se encuentran presentes en los extractos y como estos influyen en la acción antibacteriana.
- **Descriptivo:** Debido a que nos permite describir los resultados obtenidos en la investigación durante el proceso de elaboración de los ensayos realizados.

NIVEL DE INVESTIGACIÓN

- **Aplicado:** Este estudio se llevó a cabo de manera práctica mediante experimentos en cepas de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* y

Staphylococcus aureus. Los resultados podrán tener aplicaciones beneficiosas para la salud.

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- El diseño de investigación es experimental, se realizó en tres partes:
 - ✓ Primera parte: estudio para elegir las muestras adecuadas (preparación de las concentraciones y preparación de la cepa).
 - ✓ Segunda parte: determinar el análisis químico cualitativo presente en las muestras de extracto etanólico de las hojas *Punica granatum*.
 - ✓ Tercera parte: determinar la sensibilidad antibacteriana de las muestras y la CMI de la muestra vegetal frente a la muestra microbiológica.
- La investigación se realizó con medios de cultivo y cepas ATCC (American Type Culture Collection) y especies botánicas con acción terapéutica.
- Para la recolección de datos, se utilizará una ficha elaborada donde se anotaran los datos obtenidos a través de una medición de los halos con el vernier y la observación de la turbidez de las diferentes concentraciones.
- Fueron realizadas la preparación del extracto, la marcha fitoquímica, la solubilidad en el Laboratorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, entre los meses de Enero a Abril del 2018 con la asesoría Mg. Q.F. Luis Roa Chunga; el trabajo microbiológico fue realizado en los laboratorios de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el apoyo de profesionales en el campo de microbiología.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. POBLACIÓN

BOTÁNICA

- La población está constituida por las hojas de dos árboles de la planta *Punica granatum* (granada) que se encuentra en un área de 4m² ; provenientes del centro poblado San José de Nieve, Distrito de Antioquia, Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima, Perú.

MICROBIOLÓGICA

- La población microbiológica está constituida por las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

3.3.2. MUESTRA

BOTÁNICA

- La muestra está constituida por 750g de las hojas de *Punica granatum* (granada)

MICROBIOLÓGICA

- Las muestras están constituidas por las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATTC®9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538; que se usarán para la preparación del inóculo bacteriano.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica empleada para el recojo de información es la “observación”. Esta se llevará a cabo registrando los datos obtenidos en cada proceso a través de fichas de observación participante, que permitirá a nuestro equipo anotar de manera detallada todos los procedimientos que permitan llegar a los hallazgos. También se emplearán fotografías para probar los procesos ejecutados.

3.5 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se elaboró una ficha de recolección de datos la cual es creada para recolectar los datos de los resultados observados durante todo el proceso en el laboratorio (ver ficha, Anexo 6, 7,8 y 9).

3.5.1 Procedimiento experimental

La identificación taxonómica de la *Punica granatum* (granada) fue realizado por un profesional Biólogo colegiado y autorizado por INRENA (Ver la ficha, Anexo 2)

3.5.2 Colecta e identificación de la población en estudio

La planta de *Punica granatum* (granada) fue recolectada en centro poblado San José de Nieve, Distrito de Antioquia, Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima, Perú.

3.5.3 Microorganismo

Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC®6538 las cuales fueron importados a través de laboratorios Thermo Scientific y cultivado en el laboratorio microbiológico del Centro de Control Analítico (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el mes de Marzo del 2018.

3.5.4 Extracto etanólico de *Punica granatum* (granada)

Se seleccionaron aproximadamente 750 g de hojas, fueron limpiadas con agua destilada y secadas a medio ambiente por 7 días, posteriormente se llevó a secado en estufa a 40°C por 48 horas para que esté libre de humedad; luego fueron pulverizadas en molino de cuchilla hasta obtener un polvo fino.

En un envase de vidrio de boca ancha se colocó 500 g del polvo fino obtenido, posteriormente se agregó 1000 mL de etanol al 96°, se cerró herméticamente y se dejó macerar durante 7 días a temperatura ambiente con agitación constante 2 veces por día.

Transcurrido el tiempo de maceración se llevó a cabo el filtrado con papel filtro Whatman N°1, obteniendo así el extracto etanólico libre de residuos.

A continuación, se colocó el extracto en placas y fue llevado nuevamente a la estufa para concentrar el filtrado a 40°C por 72 horas. Al producto resultante se le denominó extracto seco, posteriormente se le agregó alcohol con la finalidad de retirar la parte sólida de la placa, obteniendo así 100 mL del macerado (solución madre). Finalmente fue conservado en frasco ámbar a 4°C.

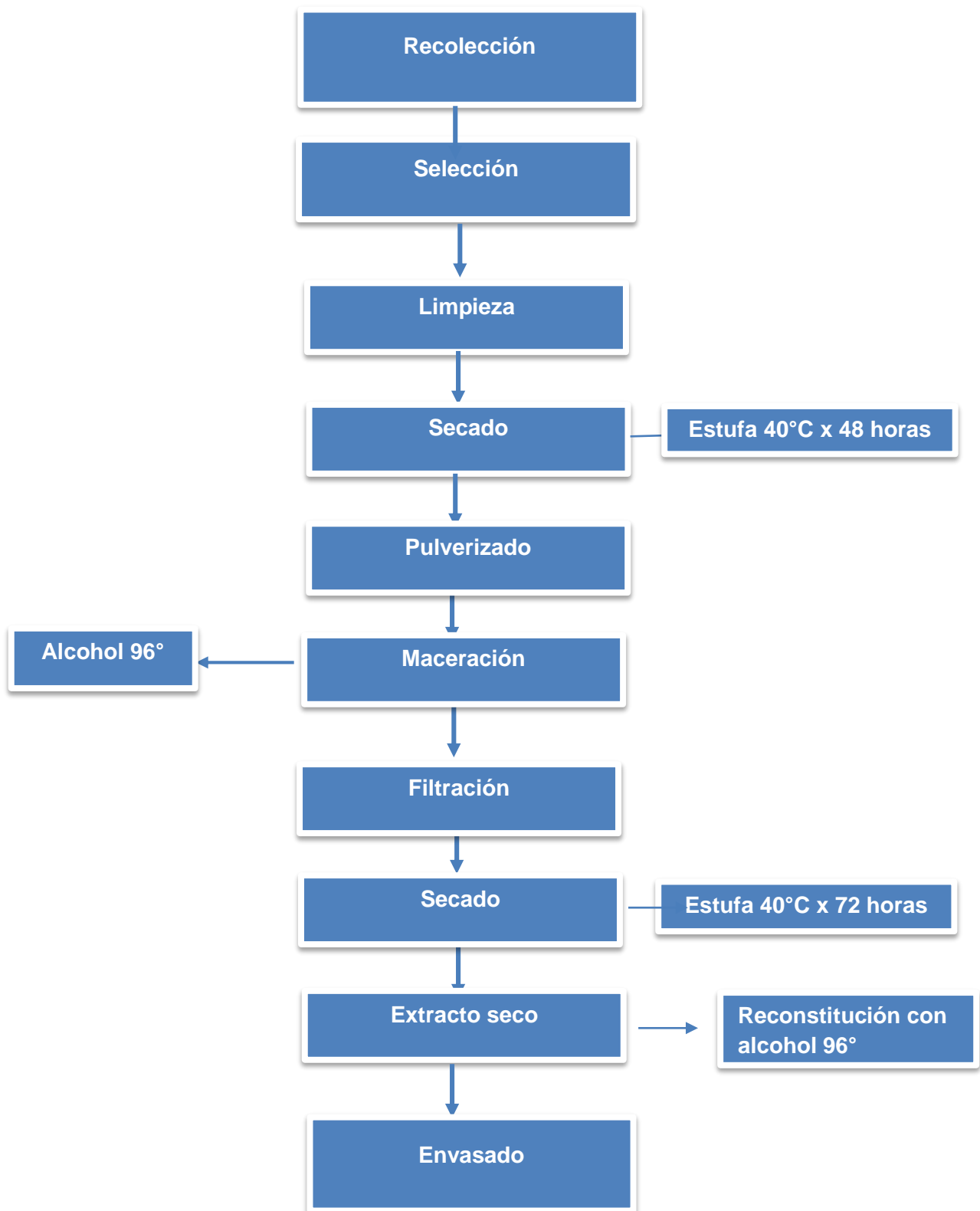


Figura N° 2: Flujograma de la extracción del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada).

3.5.5 Ensayo de solubilidad

Consiste en identificar el grado de solubilidad de los diferentes metabolitos secundarios son más solubles, este procedimiento está descrito en la norma NRSP-309.

En 7 tubos de ensayo se colocó una pequeña porción del extracto seco de las hojas y se le agregó 5 gotas de diferentes solventes (Éter de petróleo, ciclohexano, diclorometano, cloroformo, etanol, metanol y agua destilada) Tabla N°3, Figura N° 3.

3.5.6 Análisis fitoquímico de metabolitos secundarios de *Punica granatum* (granada) - (Método de Olga Lock Sing de Ugaz: Las Bases de la Fitoquímica.)

De manera cualitativa se puede determinar los metabolitos secundarios presentes en las muestras. Para la investigación se siguió la metodología del Tamizaje fitoquímico de Olga Lock Sing de Ugaz.

14 tubos de ensayos fueron enumerados, y en cada uno se agregó aproximadamente 3 gotas del extracto etanólico y 2 gotas de los reactivos correspondientes.

a) Identificación de quinonas

Con Bornträger. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de NaOH 10% y 2 gotas de cloroformo, el NaOH ioniza a las quinonas y las convierte solubles en agua reaccionando de color rojizo.

b) Identificación de compuestos fenólicos

Con Cloruro Férrico. A 3 gotas de muestra se adicionó 2 gotas de cloruro férrico; si se observa una coloración verde negruzca nos indica la presencia de taninos.

c) Identificación de terpenos (triterpenos)

Liebermann- Burchard. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas del reactivo, la formación de un color verde o azul verdoso después de unos minutos es positiva.

d) Identificación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff. A 3 gotas de muestra se agregó unas cuantas gotas de este reactivo, si se observa la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo, es positivo

Reactivo de Mayer. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas del reactivo, se deberá observar la aparición de un precipitado de color blanco a crema.

Reactivo de Wagner. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas del reactivo, se deberá observar la aparición de un precipitado de color marrón.

e) Identificación de lactonas α y β saturadas

Reactivo de Baljet. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas del reactivo, la formación de un color rojizo es positiva

f) Identificación de taninos

Con gelatina A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de reactivo, y si queda en el fondo un precipitado abundante confirma la presencia de taninos.

Con gelatina sal. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de reactivo, y si queda en el fondo un precipitado abundante confirma la presencia de taninos.

g) Identificación de antocianinas

Con NaOH 10% A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de reactivo, la formación de un color rojizo es positivo

h) Identificación de azúcares

Reactivo de Benedict. A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de reactivo, se llevó a baño maría hasta ebullición, la aparición un precipitado rojo ladrillo es positivo.

Reactivo de Fehling.- A 3 gotas de muestra se agregó 2 gotas de reactivo Fehling A y Fehling B y se llevó a baño maría, la presencia de precipitado rojo ladrillo es positivo.

Reactivo de Molish. Se colocó 2 gotas de la muestra en el tubo de ensayo con 2 gotas del reactivo de Molish, se adiciona 2 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) si inmediatamente se observa que se forma un anillo de color violeta en la interface, la reacción es positiva.

i) Identificación de flavonoides

Con R. Shinoda. A 3 gotas de muestra se agrega 1 pequeña limadura de magnesio, luego se añadió 2 gotas de HCl concentrado. Si aparece un burbujeo intenso por la reacción de las limaduras y la solución va de un color naranja débil hasta un color rojo ladrillo intenso indicara un resultado positivo.

3.5.7 Preparación de la concentración del extracto

3.5.7.1 Preparación de la concentración del extracto

El extracto etanólico se trabajó a cuatro concentraciones: 100%, 75%, 50%, y 25%.

Para realizar las diluciones a partir del extracto etanólico se usó alcohol 96° y dichas diluciones se realizaron de la siguiente forma:

100%: En un tubo de ensayo se colocó 5mL del extracto.

75%: En un tubo de ensayo se colocó 3,75mL del extracto y se completó con 1,25mLde etanol.

50%: En un tubo de ensayo se colocó 2,5mL del extracto y se completó con 2,5mLde etanol.

25%: En un tubo de ensayo se colocó 1,25mL del extracto y se completó con 3,75mL de etanol.

3.5.8 Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de disco difusión.

El procedimiento fue llevado a cabo siguiendo la metodología de Kirby-Bauer (2015) con algunas modificaciones.

A. Preparación y estandarización del inóculo

Se partió de cultivos de 18 a 24 h en Agar tripticasa de soya (TSA) a 37°C de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, se tomó de 3 a 5 colonias aisladas y diluyó en respectivos tubos de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0,9%) de tal manera que la solución resultante presente una turbidez muy parecido al tubo N°1 en la escala de MacFarland (escala turbidimétrica que consiste en una serie de tubos con turbidez creciente que permite hallar la concentración aproximada de una solución bacteriana) el cual corresponde a una concentración de 3×10^8 UFC/mL.

A partir de esta última solución realizar una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada se tomó 3 mL y se diluyó a un volumen total de 9 mL de suero fisiológico en un tubo con tapa rosca. La solución resultante tendrá una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

Bajo las mismas condiciones realizar una dilución de 1 en 100 añadiendo 0,1 mL de la solución anterior a un tubo con 9,9 mL de suero fisiológico, la solución resultante tendrá una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

Al final tendremos un tubo de ensayo con solución de 1×10^6 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* y otro tubo de ensayo con solución de 1×10^8 UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Preparación de las placas.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se prepararon placas petri con Agar Mueller Hinton. Este se preparó siguiendo indicaciones del

fabricante; para lo cual se añadió cantidad adecuada de agua para conseguir la concentración deseada. El preparado se calentó hasta llegar a ebullición agitando en ciertos momentos, para garantizar una disolución completa del agar. Terminada la disolución del medio, este se esterilizó en autoclave a 121°C por 15-20 minutos, para impedir el crecimiento de contaminantes. Una vez estéril se repartió 20 a 30mL en placas petri estériles y se esperó de 10 a 15 minutos para que solidifique.

C. Inoculación de las muestras:

Agregar 100 µl de cada inóculo bacteriano preparado (1×10^6 UFC/ mL y 1×10^8 UFC/mL) a cada una de las placas y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa en sentido paralelo y bien compacta hasta lograr abarcar toda la superficie de la placa. Repetir el procedimiento girando la placa a 60° en dos ocasiones más. Se debe asegurar en sembrar las placas de borde a borde, porque de no ser así puede existir problemas al realizar las lecturas. Antes de proceder a colocar los disco dejar secar por un tiempo de 3 a 5.

D. Preparación de los discos con las muestras:

Se inocularon con 100ul de cada una de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Punica granatum* (100%, 75%, 50%,25%), se dejaron reposar por 5 minutos para luego ser utilizados en la prueba de susceptibilidad. Se utilizó como control negativo discos embebidos en etanol al 96° y como control positivo discos de antibióticos comerciales de la marca OXOID Gentamicina 10µg.

E. Aplicación de los discos a las placas inoculadas:

Los discos tienen que ser colocados con una pinza estéril. Al encontrarse en contacto sobre el agar, los discos deben ser presionados levemente para que puedan adherirse al mismo. Se deberán aplicar a más de 15 mm del

borde de la placa y quedar distribuidos de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición. Los discos de antibióticos fueron colocados de la siguiente manera:

Tres discos del antibiótico en una placa inoculada con un microorganismo de tal manera que se obtengan resultados por triplicado.

Luego de colocados los discos la placa debe incubarse a 35-37°C durante 18-24 horas. La placa debe colocarse en forma invertida.

Los discos con la muestra fueron colocados de manera similar, tres discos por cada placa, estos también se incubaron a 35-37°C durante 18-24 horas.

F. Interpretación de los resultados

Al haber culminado las 24 horas de incubación, se realizó la medición de los diámetros de las zonas de inhibición (incluyendo el diámetro del disco). Se llevó a cabo manteniendo iluminada la parte posterior de la placa petri sobre un fondo negro.

La medición se realizó con un vernier digital, se tomó como punto final la zona que no muestra un crecimiento visible; los valores de las mediciones fueron por triplicado deben promediarse y compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antibióticos.

3.5.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

El proceso se realizó siguiendo la metodología de Andrews MJ. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. J Antimicrob Chemother (2001) con algunas modificaciones.

A. Preparación de los tubos con Caldo Trypticasa Soya

El caldo Trypticasa Soya (TSB) se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante a partir del medio deshidratado con agua destilada y con un pH entre 7,1 - 7,5 se agregó 10 mL del caldo preparado a 15 tubos con tapa rosca para cada bacteria. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Después se dejó enfriar a

temperatura ambiente. Una vez temperado se colocaron todos los tubos en una gradilla y se rotularon conforme a las concentraciones de trabajo. 15 tubos fueron para las muestras y dos tubos que se usaron uno como control positivo y el otro como control negativo.

B. Preparación de los inóculos bacterianos:

A partir de colonias puras de microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 6538 se tomó una cierta cantidad de colonias y se diluyó por en respectivos tubos de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0,9%) de tal manera que la solución resultante tuvo una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de Mac Farland 3×10^8 UFC/mL. Luego de esta solución preparada se tomó 3 mL y se diluyó a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, obteniéndose una concentración de 1×10^8 UFC/mL

El mismo procedimiento se siguió con *Staphylococcus aureus* ATCC® 9027, con la diferencia que al final de procedimiento bajo las mismas condiciones se realizó una dilución de 1 en 100 añadiendo 0,1 mL de la solución anterior a un tubo con 9,9 mL de suero fisiológico, la solución resultante tendrá una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

C. Preparación de los tubos con el extracto etanólico y Caldo Tripticasa Soya (TSB)

Para la prueba con *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538

- Se trabajó con una batería de 15 tubos.
- Las diluciones se realizaron a partir del extracto al 100% en serie 1:2 con respecto al tubos anterior en una escala de concentraciones que van de 50% a 0,004%
- Para no alterar los volúmenes de 10mL, antes de agregar extracto etanólico se retiró una cantidad de caldo TSB correspondiente a la cantidad de extracto etanólico que se debía agregar.

Para la prueba con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027:

- Se trabajó con una batería de 15 tubos.
- Las diluciones se realizaron a partir del extracto al 100% en serie 3:4 con respecto al tubos anterior en una escala de concentraciones que van de 50% a 0,890%
- Para no alterar los volúmenes de 10mL, antes de agregar extracto etanólico se retiró una cantidad de caldo TSB correspondiente a la cantidad de extracto etanólico que se debía agregar.

D. Inoculación de los tubos

Se agregó 100 uL del inóculo bacteriano preparado de *Staphylococcus aureus* (1×10^6 UFC/mL) a cada una de los 15 primeros tubos y al tubo número control positivo. Cada uno de los tubos fue homogenizado con agitación vigorosa. Lo mismo se hizo con *Pseudomonas aeruginosa* (1×10^8 UFC/mL)

E. Incubación de los tubos

Los 17 tubos fueron incubados dentro de una incubadora a 35°C por 24 horas y luego se observaron los resultados.

F. Interpretación de resultados

Luego de las 24 horas de incubación, los tubos fueron observados. Como referencia de resultado positivo o negativo se usaron los tubos de controles. Se consideraron como positivos (+) para crecimiento bacteriano los tubos que presentaron turbidez y los que no presentaron turbidez como negativos (-).

Los resultados fueron reportados en una tabla y el valor de la concentración mínima inhibitoria fue dado por la concentración del tubo que no presentó turbidez y que estaba inmediatamente antes del primer tubo que presentó turbidez.

CAPÍTULO IV:

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

4.1 PROCESAMIENTO DE DATOS: Resultados

4.1.1 Prueba de solubilidad

Tabla N°3: Prueba de solubilidad del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada).

Solvente	Prueba o ensayo	Resultados
Éter de petróleo	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	-
Ciclohexano	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	-
Diclorometano	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	+
Cloroformo	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	++
Etanol	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	++++
Metanol	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	++++
Agua	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	+++

Leyenda: (++++) Muy soluble, (+++) Soluble, (++) Poco Soluble, (+) Parcialmente soluble, (-) Negativo.

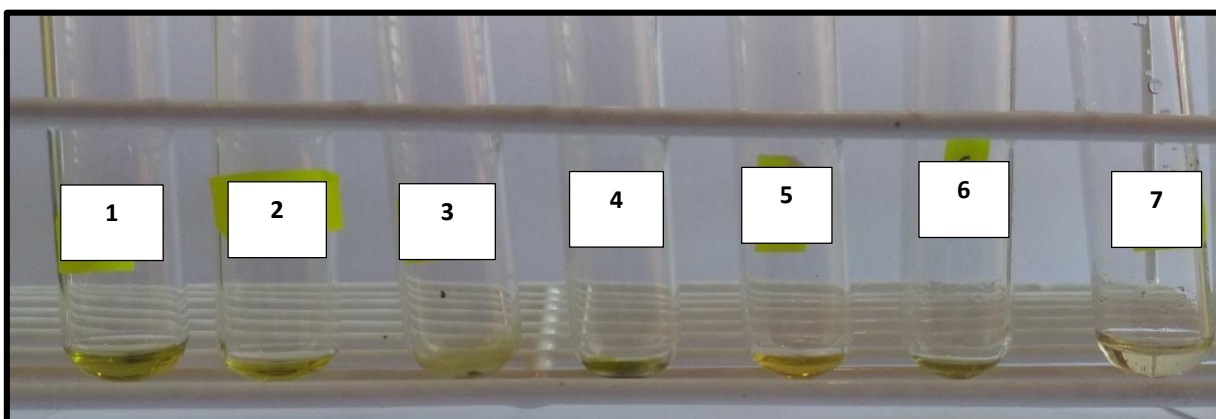


Figura N°3: Prueba de solubilidad

(1) : Éter de petróleo; (2): Ciclohexano; (3): Diclorometano; (4): Cloroformo; (5): Etanol; (6): Metanol; (7): Agua.

4.1.2 Screening fitoquímico

Tabla N°4: Pruebas fitoquímicas del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada).

	Reactivo	Demostración	Identificación	Resultados
IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS	Bornträger	3 gotas extracto + 2 gotas NaOH 10% + y 2 gotas de cloroformo	Color rojizo	+++
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS	Fe Cl ₃	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Coloración verde negruzca	++++
IDENTIFICACIÓN DE TRITERPENOS (TRITERPENOS)	Liebermann-Burchard	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Coloración verde o azul verdoso	++
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	Dragendorff	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Rojo ladrillo	+
	Mayer	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	++
	Wagner	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	++
IDENTIFICACIÓN DE LACTONAS α y β INSATURADAS	Baljet	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Color rojizo	-
IDENTIFICACIÓN DE TANINOS	Con gelatina	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado abundante	++++
	Con gelatina sal	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado abundante	++++
IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANIDINAS	NaOH 10%	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo	Color rojizo	-
IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	Benedict	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo, agitar y llevar a baño maría por 10 minutos	Formación de un precipitado rojo ladrillo	+
	Fehling A+ Fehling B	3 gotas extracto + 2 gotas de Fehling A+ Fehling B, agitar y llevar a baño maría por 10 minutos	Formación de un precipitado rojo ladrillo	++
IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS	Molish	3 gotas extracto + 2 gotas del reactivo molish + 2 gotas de H ₂ SO ₄ , dejar en reposo	Formación de un anillo violáceo	+
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONIDES	Shinoda	3 gotas extracto + 1 limadura de magnesio + 2 gotas del HCl	Color anaranjado intenso	++

Leyenda: (++++) Abundante, (+++) Moderado, (++) Poco, (+) Muy poco, (-) Negativo.

4.1.3 Determinación de la actividad antibacteriana

Para evaluar si el extracto etanólico presento actividad antibacteriana y si esta es válida, se tomó como referencia el halo de inhibición de los controles positivos empleados, descritos por el Manual de sensibilidad de INS (2002) (Tabla 5).

Para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, se usó como control positivo a Gentamicina. (Tabla 6 y Fig.3 y 4).

Tabla N°5: Manual de procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (INS, 2002).⁸⁶

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetros Críticos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Diámetro en mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Gentamicina	10 ug	12	13-14	15

Tabla N°6: Susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico de referencia.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración del disco	Diámetro del halo (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Gentamicina	10 ug	18,13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Gentamicina	10 ug	31,52



Figura N°4: Susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 frente a Gentamicina.

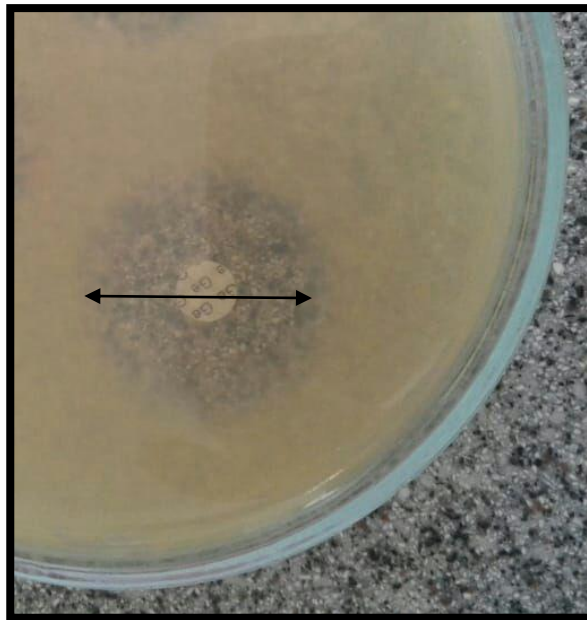


Figura N°5: Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente a Gentamicina.

Tabla N° 7. Actividad antibacteriana de hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismos	Controles		Muestra			
	Alcohol 96° (Control negativo)	Gentamicina 10 ug (Control positivo)	25%	50%	75%	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	6	17,65	6,25	6,83	9,6	10,32
	6	18,86	6,59	7,21	10,4	9,41
	6	17,89	6,33	6,28	9,39	10,38
Media:	6	18,13	6,39	6,77	9,80	10,04

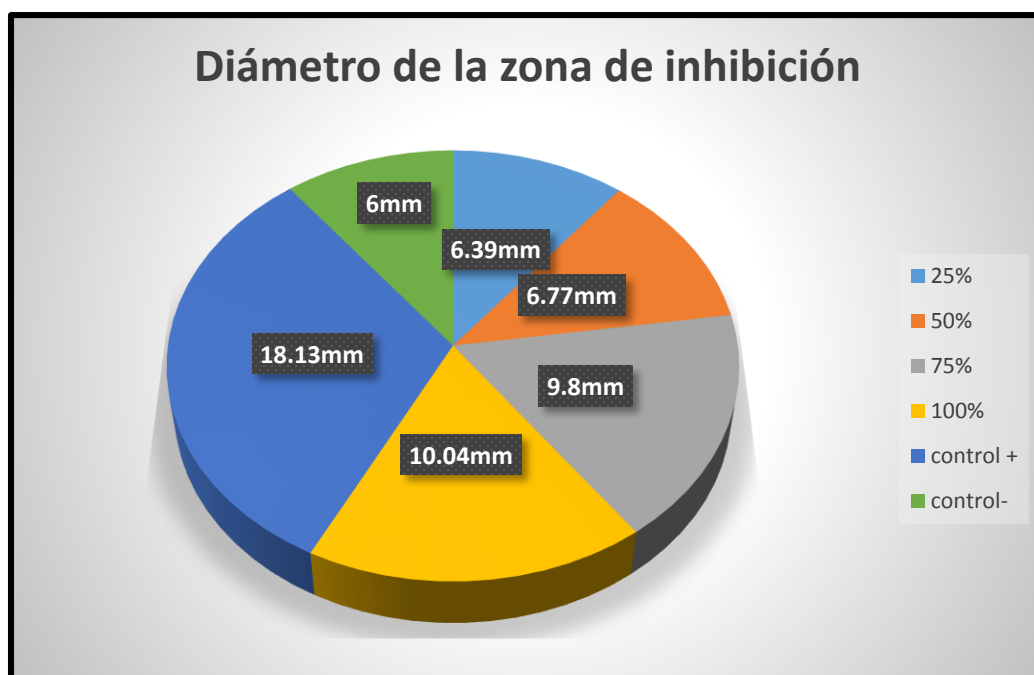


Figura N°6: Media del diámetro de los halos de inhibición de *Punica granatum* frente a *Pseudomonas aeruginosa* expresados en mm.

Tabla N° 8. Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
2,00	3	18,1333	,64065	,36988	16,5419	19,7248	17,65	18,86
3,00	3	6,3900	,17776	,10263	5,9484	6,8316	6,25	6,59
4,00	3	6,7733	,46758	,26996	5,6118	7,9349	6,28	7,21
5,00	3	9,7967	,53295	,30770	8,4728	11,1206	9,39	10,40
6,00	3	10,0367	,54354	,31381	8,6864	11,3869	9,41	10,38
Total	18	9,5217	4,30645	1,01504	7,3801	11,6632	6,00	18,86

Leyenda:

- 1 = Control negativo (alcohol de 96°)
- 2 = Control positivo (gentamicina 10ug)
- 3 = Extracto etanólico al 25%
- 4 = Extracto etanólico al 50%
- 5 = Extracto etanólico al 75%
- 6 = Extracto etanólico al 100%

En el cuadro adjunto podemos observar la aplicación de la estadística descriptiva a los datos obtenidos, todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5% por ello ningún dato se excluye y por ende se aplicará estadística inferencial para determinar si existen diferencias significativas de las medias de cada extracto alcohólico estudiado.

Tabla 9. Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3,268	5	12	,043

DONDE:

H₀ = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos (P < 0.05)

H₁ = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos (P > 0.05)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que $P < 0.05$, por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, rechazando la hipótesis alternativa. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso será la prueba ANNOVA ONE WAY o de un factor.

Tabla 10. Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	312,793	5	62,559	302,671	,000
Dentro de grupos	2,480	12	,207		
Total	315,274	17			

DONDE:

H₀ = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P > 0.05)

H₁ = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P < 0.05)

La prueba ANOVA One Way nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado (P < 0.05) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos alcohólicos. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

Tabla 11. Comparaciones múltiples de la prueba de TUKEY de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

(I) CONCENTRACIONES	(J) CONCENTRACIONES	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-12,13333*	,37120	,000	-13,3802	-10,8865
	3,00	-,39000	,37120	,891	-1,6368	,8568
	4,00	-,77333	,37120	,356	-2,0202	,4735
	5,00	-3,79667*	,37120	,000	-5,0435	-2,5498
	6,00	-4,03667*	,37120	,000	-5,2835	-2,7898
2,00	1,00	12,13333*	,37120	,000	10,8865	13,3802
	3,00	11,74333*	,37120	,000	10,4965	12,9902
	4,00	11,36000*	,37120	,000	10,1132	12,6068
	5,00	8,33667*	,37120	,000	7,0898	9,5835
	6,00	8,09667*	,37120	,000	6,8498	9,3435
3,00	1,00	,39000	,37120	,891	-,8568	1,6368
	2,00	-11,74333*	,37120	,000	-12,9902	-10,4965
	4,00	-,38333	,37120	,898	-1,6302	,8635
	5,00	-3,40667*	,37120	,000	-4,6535	-2,1598
	6,00	-3,64667*	,37120	,000	-4,8935	-2,3998
4,00	1,00	,77333	,37120	,356	-,4735	2,0202
	2,00	-11,36000*	,37120	,000	-12,6068	-10,1132
	3,00	,38333	,37120	,898	-,8635	1,6302
	5,00	-3,02333*	,37120	,000	-4,2702	-1,7765
	6,00	-3,26333*	,37120	,000	-4,5102	-2,0165
5,00	1,00	3,79667*	,37120	,000	2,5498	5,0435
	2,00	-8,33667*	,37120	,000	-9,5835	-7,0898
	3,00	3,40667*	,37120	,000	2,1598	4,6535
	4,00	3,02333*	,37120	,000	1,7765	4,2702
	6,00	-,24000	,37120	,985	-1,4868	1,0068
6,00	1,00	4,03667*	,37120	,000	2,7898	5,2835
	2,00	-8,09667*	,37120	,000	-9,3435	-6,8498
	3,00	3,64667*	,37120	,000	2,3998	4,8935
	4,00	3,26333*	,37120	,000	2,0165	4,5102
	5,00	,24000	,37120	,985	-1,0068	1,4868

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

Leyenda:

1 = Control negativo (alcohol de 96°)

2 = Control positivo (gentamicina 10ug)

3 = Extracto etanólico al 25%

4 = Extracto etanólico al 50%

5 = Extracto etanólico al 75%

6 = Extracto etanólico al 100%

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente heterogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre 1-2, 1-5, 1-6, 2-1, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 3-5, 3-6, 4-5, 4-6.

Tabla 12. Prueba de subconjuntos de datos de TUKEY de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas frescas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1,00	3	6,0000		
3,00	3	6,3900		
4,00	3	6,7733		
5,00	3		9,7967	
6,00	3		10,0367	
2,00	3			18,1333
Sig.		,356	,985	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Leyenda:

- 1 = Control negativo (alcohol de 96°)
- 2 = Control positivo (gentamicina 10ug)
- 3 = Extracto etanólico al 25%
- 4 = Extracto etanólico al 50%
- 5 = Extracto etanólico al 75%
- 6 = Extracto etanólico al 100%

La prueba de TUKEY determina también la homogeneidad de cada concentración. En el cuadro adjunto se observa que el control negativo (Alcohol de 96°), los extractos etanólico al 25% y 50% presentan el mismo efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos al 75% y 100% también presentan el mismo efecto antibacteriano, por ende podemos concluir que son los que mayor efecto presentan frente a la bacteria en estudio.

Tabla N° 13. Actividad antibacteriana de hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*.

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismos	Controles		Muestra			
	Alcohol 96° (Control negativo)	Gentamicina 10 ug (Control positivo)	25%	50%	75%	100%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538	6	29,84	22,39	24,73	24,56	27,16
	6	33,62	23,05	25,95	25,97	27,38
	6	31,10	20,66	25,54	25,15	27,52
Media:	6	31,52	22,03	25,41	25,23	26,35

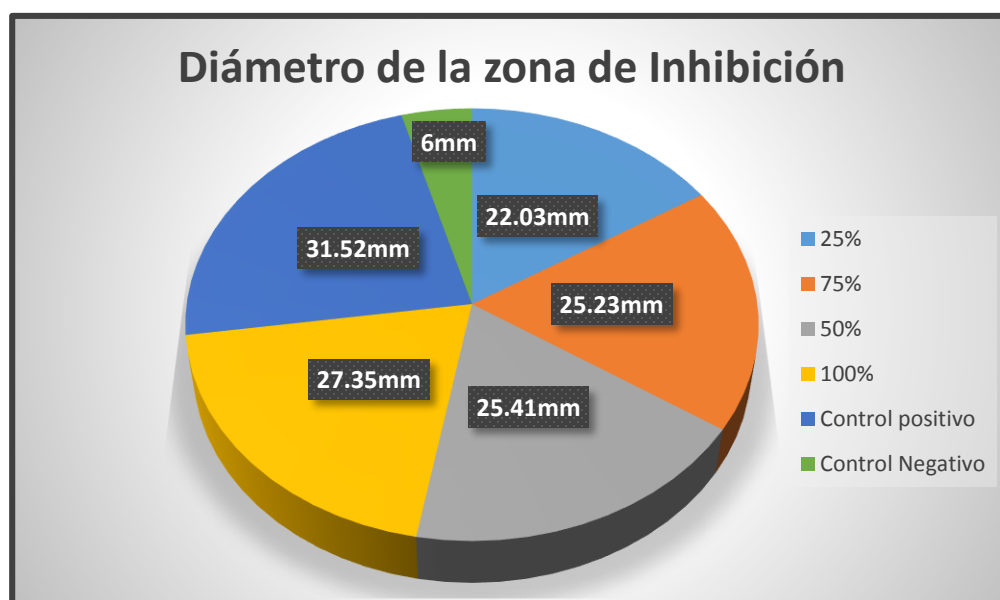


Figura N°7: Media del diámetro de los halos de inhibición de *Punica granatum* frente a *Staphylococcus aureus* expresados en mm.

Tabla 14. Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
2,00	3	31,5200	1,92468	1,11122	26,7388	36,3012	29,84	33,62
3,00	3	22,0333	1,23427	,71261	18,9672	25,0994	20,66	23,05
4,00	3	25,4067	,62083	,35844	23,8644	26,9489	24,73	25,95
5,00	3	25,2267	,70812	,40883	23,4676	26,9857	24,56	25,97
6,00	3	27,3533	,18148	,10477	26,9025	27,8041	27,16	27,52
Total	18	22,9233	8,36262	1,97109	18,7647	27,0820	6,00	33,62

Leyenda:

1 = Control negativo (alcohol de 96°)

2 = Control positivo (gentamicina 10ug)

3 = Extracto etanólico al 25%

4 = Extracto etanólico al 50%

5 = Extracto etanólico al 75%

6 = Extracto etanólico al 100%

En el cuadro adjunto podemos observar la aplicación de la estadística descriptiva a los datos obtenidos, todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5% por ello ningún dato se excluye y por ende se aplicará estadística inferencial para determinar si existen diferencias significativas de las medias de cada extracto alcohólico estudiado.

Tabla 15. Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*.

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3,875	5	12	,025

DONDE:

H₀ = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos (P < 0.05)

H₁ = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos (P > 0.05)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que $P < 0.05$, por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, rechazando la hipótesis alternativa. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso será la prueba ANNOVA ONE WAY o de un factor.

Tabla 16. Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1176,574	5	235,315	229,664	,000
Dentro de grupos	12,295	12	1,025		
Total	1188,869	17			

DONDE:

H₀ = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P > 0.05)

H₁ = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (P < 0.05)

La prueba ANOVA One Way nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado (P < 0.05) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos alcohólicos. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

Tabla 17. Comparaciones múltiples de la prueba de TUKEY de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*.

(I) CONCENTRACIONES	(J) CONCENTRACIONES	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-25,52000*	,82648	,000	-28,2961	-22,7439
	3,00	-16,03333*	,82648	,000	-18,8094	-13,2573
	4,00	-19,40667*	,82648	,000	-22,1827	-16,6306
	5,00	-19,22667*	,82648	,000	-22,0027	-16,4506
	6,00	-21,35333*	,82648	,000	-24,1294	-18,5773
2,00	1,00	25,52000*	,82648	,000	22,7439	28,2961
	3,00	9,48667*	,82648	,000	6,7106	12,2627
	4,00	6,11333*	,82648	,000	3,3373	8,8894
	5,00	6,29333*	,82648	,000	3,5173	9,0694
	6,00	4,16667*	,82648	,003	1,3906	6,9427
3,00	1,00	16,03333*	,82648	,000	13,2573	18,8094
	2,00	-9,48667*	,82648	,000	-12,2627	-6,7106
	4,00	-3,37333*	,82648	,015	-6,1494	-,5973
	5,00	-3,19333*	,82648	,021	-5,9694	-,4173
	6,00	-5,32000*	,82648	,000	-8,0961	-2,5439
4,00	1,00	19,40667*	,82648	,000	16,6306	22,1827
	2,00	-6,11333*	,82648	,000	-8,8894	-3,3373
	3,00	3,37333*	,82648	,015	,5973	6,1494
	5,00	,18000	,82648	1,000	-2,5961	2,9561
	6,00	-1,94667	,82648	,245	-4,7227	,8294
5,00	1,00	19,22667*	,82648	,000	16,4506	22,0027
	2,00	-6,29333*	,82648	,000	-9,0694	-3,5173
	3,00	3,19333*	,82648	,021	,4173	5,9694
	4,00	-,18000	,82648	1,000	-2,9561	2,5961
	6,00	-2,12667	,82648	,178	-4,9027	,6494
6,00	1,00	21,35333*	,82648	,000	18,5773	24,1294
	2,00	-4,16667*	,82648	,003	-6,9427	-1,3906
	3,00	5,32000*	,82648	,000	2,5439	8,0961
	4,00	1,94667	,82648	,245	-,8294	4,7227
	5,00	2,12667	,82648	,178	-,6494	4,9027

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

Leyenda:

1 = Control negativo (alcohol de 96°)

2 = Control positivo (gentamicina 10ug)

3 = Extracto etanólico al 25%

4 = Extracto etanólico al 50%

5 = Extracto etanólico al 75%

6 = Extracto etanólico al 100%

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente heterogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre la mayoría de extractos con el control positivo y negativo, a excepción de 4, 5 y 6.

Tabla 18. Prueba de subconjuntos de datos de TUKEY de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente *Staphylococcus aureus*.

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
1,00	3	6,0000			
3,00	3		22,0333		
5,00	3			25,2267	
4,00	3			25,4067	
6,00	3			27,3533	
2,00	3				31,5200
Sig.		1,000	1,000	,178	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Leyenda:

- 1 = Control negativo (alcohol de 96°)
- 2 = Control positivo (gentamicina 10ug)
- 3 = Extracto etanólico al 25%
- 4 = Extracto etanólico al 50%
- 5 = Extracto etanólico al 75%
- 6 = Extracto etanólico al 100%

La prueba de TUKEY determina también la homogeneidad de cada concentración. En el cuadro adjunto se observa que los extractos etanólicos al 50%, 75% y 100% son homogéneos y además presentan el mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

4.1.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

4.1.4.1 CMI del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Los resultados del ensayo cuantitativo de la CMI del extracto etanólico de *Púnica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 a partir del 100% y con una reducción de 3 en 4 con respecto al tubo anterior. Se pueden observar en la Tabla 19, Figura 8 y 9.

Tabla N°19. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

CONCENTRACIONES MÍNIMA INHIBITORIA						
<i>Púnica granatum</i> (Granada) en cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en uL	Cantidad de extracto en uL	Concentración del extracto en %	Características observadas después de las 24 horas	Resultados
1	100	5000	5000	50	Sin turbidez	Negativo
2	100	6250	3750	37,5	Sin turbidez	Negativo
3	100	7187,5	2812,5	28,125	Sin turbidez	Negativo
4	100	7890,7	2109,3	21,093	Sin turbidez	Negativo
5	100	8418	1582	15,82	Sin turbidez	Negativo
6	100	8813,5	1186,5	11,865	Sin turbidez	Negativo
7	100	9110,1	889,9	8,899	Hay turbidez	Positivo
8	100	9332,6	667,4	6,674	Hay turbidez	Positivo
9	100	9499,4	500,6	5,006	Hay turbidez	Positivo
10	100	9625	375	3,75	Hay turbidez	Positivo
11	100	9719	281	2,81	Hay turbidez	Positivo
12	100	9788,9	211,1	2,111	Hay turbidez	Positivo
13	100	9841,6	158,4	1,584	Hay turbidez	Positivo
14	100	9881,2	118,8	1,188	Hay turbidez	Positivo
15	100	9911	89	0,890	Hay turbidez	Positivo
TUBOS DE CONTROL						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en (mL)	Características observadas después de las 24 horas		Resultados	
16	100	10	Turbidez		Positivo	
17	-----	10	No hay turbidez		Negativo	

Leyenda:

(Negativo): No hubo crecimiento bacteriano.

(Positivo): Hubo crecimiento bacteriano.



Figura N°8: CMI del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Figura N°9: Control positivo *Pseudomonas aeruginosa*. (TSB con el inóculo).

4.1.4.2 CMI del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Los resultados del ensayo cuantitativo de la CMI del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se pueden observar en la Tabla 20 y Figura 10 ,11.

Tabla N°20: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA						
<i>Púnica granatum</i> (Granada) en cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en (uL)	Cantidad de extracto en (uL)	Concentración del extracto en %	Características observadas después de las 24 horas	Resultados
1	100	5000	5000	50	Sin turbidez	Negativo
2	100	7500	2500	25	Sin turbidez	Negativo
3	100	8750	1250	12,5	Sin turbidez	Negativo
4	100	9375	625	6,25	Sin turbidez	Negativo
5	100	9687	313	3,13	Sin turbidez	Negativo
6	100	9843,5	156,5	1,565	Sin turbidez	Negativo
7	100	9921,7	78,3	0,783	Sin turbidez	Negativo
8	100	9960,9	39,1	0,391	Sin turbidez	Negativo
9	100	9980,4	19,6	0,196	Sin turbidez	Negativo
10	100	9990,2	9,8	0,098	Hay turbidez	Positivo
11	100	9995,1	4,9	0,049	Hay turbidez	Positivo
12	100	9997,5	2,5	0,025	Hay turbidez	Positivo
13	100	9998,7	1,3	0,013	Hay turbidez	Positivo
14	100	9999,3	0,7	0,007	Hay turbidez	Positivo
15	100	9999,6	0,4	0,004	Hay turbidez	Positivo
TUBOS DE CONTROL						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en (mL)	Características observadas después de las 24 horas		Resultados	
16	100	10	Turbidez		Positivo	
17	-----	10	No hay turbidez		Negativo	

Leyenda:

(Negativo): No hubo crecimiento bacteriano.

(Positivo): Hubo crecimiento bacteriano.

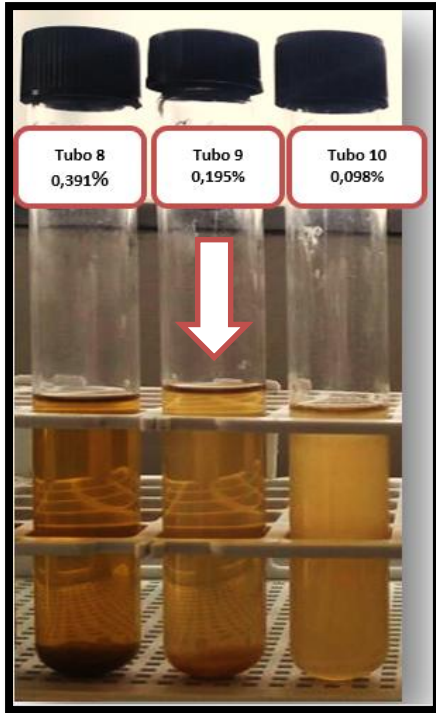


Figura N°10: CMI del extracto etanólico *Punica granatum* (granada) frente a una *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

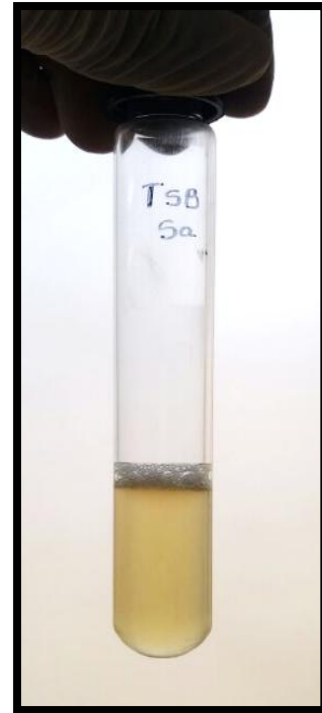


Figura N°11: Control positivo *Staphylococcus aureus*. (TSB con el inóculo).

4.2 Discusión de resultados

En la presente investigación *in vitro*, se determinó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 25; 50; 75 y 100% con halos de inhibición que oscilan entre 6,39 a 10,04mm y 22,03 a 26,35 mm respectivamente. Demostrándose, que el extracto etanólico de las hojas *Punica granatum*, tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, pero no presentó efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Este estudio concuerda con el de Bernal, R. y Rodríguez, I en el año 2014, quienes demostraron que existe efecto del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *Punica granatum L.*, sobre la viabilidad de *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*, con concentraciones del extracto a 31,25; 62,5; 125; 250 y 500 mg/ mL evidenciando halos

de inhibición de 75,88 a 112,81% para *S. aureus* y 41,57 a 85,48 % para *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo mejores resultados en cepas de *Staphylococcus aureus* que en *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas las concentraciones de trabajo (25; 50; 75 y 100%) del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Staphylococcus aureus*, presentó efecto antibacteriano, resultados que coinciden con el estudio de Cárdenas en el año 2013, que demostró el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de granada sobre la viabilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, teniendo como resultados de sus ensayos halos de inhibición de 25,56; 28,08; 30,56 y 30,06 mm a concentraciones de 50; 100; 200 y 400 mg/mL respectivamente.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de las hojas de *Punica granatum* (granada) fue de 11,85% para *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue de 0,196%, estos resultados son corroborados con la investigación de Romero J. y Villegas E. (2017), donde su CMI del extracto etanólico de la cáscara de granada fue de 100mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* y 50mg/mL para *Staphylococcus aureus*.

En la investigación sobre el efecto antibacteriano del extracto de las hojas de *Punica granatum* (granada), se encontró que la concentración del 100, 75 y 50% tiene mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* en comparación con la concentración del 25%; mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* la concentración del 100% y 75% tiene mayor efecto en comparación a las concentraciones de 50% y 25%. Según los resultados de ANOVA y Tukey indican que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Por otro lado en la investigación de Cárdenas CE. al someter los datos obtenidos al análisis estadístico de varianza (ANOVA), obtuvo que hay una diferencia significativa entre las medias de la inhibición radial por acción de las concentraciones de 50; 100; 200 y 400 mg/mL del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* (granada) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

En cuanto al estudio de la marcha fitoquímicas del extracto etanólico de las hojas *Punica granatum* (granada) se evidenció la presencia de los compuestos químicos como: taninos, compuestos fenólicos y quinonas en grandes cantidades. Los resultados hallados en nuestro estudio coinciden con la investigación de los autores Escobar B. y Quipe L (2017), quienes realizaron un estudio de la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum L*, encontrando para ambos la presencia de fitoconstituyentes como taninos, flavonoides y azúcares reductores.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES :

1. A través del método de difusión en agar se demostró que las concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) tienen efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* no presentó efecto antibacteriano, la prueba fue evidenciado con la formación de halos de inhibición presentes alrededor de las concentraciones.

2. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas *Punica granatum* (granada), sobre el crecimiento de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* fue de alto porcentaje, demostrándose poca efectividad.

3. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas *Púnica granatum* (granada), sobre el crecimiento de las colonias de *Staphylococcus aureus* fue de bajo porcentaje, demostrándose mayor efectividad.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre la toxicidad aguda de las hojas de la planta de *Punica granatum* (granada), con la finalidad garantizar su utilidad en los seres humanos.
2. Realizar estudios de las hojas de *Punica granatum* (granada) con otros microorganismos patógenos, con el propósito de evaluar la actividad antibacteriana.
3. Por la efectividad antibacteriana de las hojas del extracto etanólico de *Punica granatum*, sobre *Staphylococcus aureus*, se recomienda producir preparados magistrales con el principio activo de la planta investigada para darle un uso terapéutico.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud .Dirección general de epidemiología: estudio prevalencia de infecciones hospitalarias. [Online].; 2014 [cited 2017 Diciembre 28]. Available from:www.minsa.gob.pe/calidad/observatorio/documentos/infecciones/Protocolo%20Estudio%20de%20Prevalencia_DGE.pdf
2. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico - Vigilancia epidemiológica Volumen 24– Semana epidemiológica No 38. Indicadores de la vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias, 2013- 2014. [Online].; 2015 [cited 2018 Marzo 22].Available from:<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/38.pdf>
3. Venegas R. Las peligrosas infecciones intrahospitalaria .El comercio. [Online]: 2017 [cited 2018 Mayo 3]. Available from: <https://elcomercio.pe/economia/opinion/peligrosas-infecciones-intrahospitalarias-opinion-401915>
4. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Salud Pública. Informe de la resistencia. Antimicrobiana en bacterias de origen. Hospitalario. [Online].; 2012 [cited 2018 Enero 05]. Available from: www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/cnsp_resanti_informesdevigilancia/INFO_RME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf
5. Bermúdez A, Oliveira MA, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revisión de sus de sus objetivos y enfoques actuales. Revista de ciencia y tecnología de América. 2005; 30(8): 453-459.
6. Raga J, Mármol Z, Pérez E, Paéz G, Araujo K. Evaluación fisicoquímica y fitoquímica de granada (*Punica granatum L.*). Revista Tecnocientífica URU. 2015; 8: 47-55.

7. Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. Diagnostico Microbiologico.12a ed. [lugar desconocido]: Editorial Medica Panamericana; 2009. 93,245 P.
8. Ministerio de Salud del Perú. Lineamientos para la vigilancia, prevención, y control de las infecciones asociadas a la atención de salud. [Online].; 2015 [cited 2018 Enero 10]. Available from: ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/calidad/normas/documentos/doc_IH1.pdf
9. Organización Mundial de la Salud. Una atención más limpia es una atención más segura. [Online].; 2018 [cited 2018 Enero 10]. Available from: www.who.int/gpsc/background/es/.
10. Quispe Z. Indicadores de la vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Bol Epidemiol. 2013-2014; 24(38):764-767.
11. Tenover FC. Mechanisms o antimicrobial resistance in bacteria. The American Journal of Medicine.2006; 119: 3-10.
12. Montero MM. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2012. 109p.
13. Ochoa V, Guzmán AR, Caicedo Y. Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. Revista Gastrohup. 2012; 14 (2): 46-57. .
14. Suárez C, Peña C. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. Int J Infect Dis. 2010; 14(3):73-78.

15. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia: A population-based study. *Am J Med.* 2008; 121:702-708.
16. Kock R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Análisis sistemático de la literatura y revisión de medidas preventivas dirigidas para limitar las infecciones asociadas a la resistencia sanitaria por *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. *Eurosurveillance.* 2014; 19 (24):23-49.
17. Bernal R, Rodriguez I. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”. *Rebiolest.* 2014; 2(1):22
18. Cárdenas C. Efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Punica granatum* L. “granada” sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* in vitro [tesis de titulación]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013. 63p
19. Escobar BJ, Quispe L. Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del Zumo de *Punica granatum* L. “granada” [tesis de titulación]. Lima: Universidad Norbert Wiener; 2017. 106p
20. Romero JE, Villegas ES. “Efecto inhibitorio in vitro de extractos etanólicos de la cáscara de *Punica granatum* “granada” y *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. [Tesis de Titulación] .Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.2017. 63p.
21. Abdollahzadeh Sh. Actividades antibacterianas y antifúngicas de extractos de cáscara de *Punica granatum* contra patógenos orales. *Journal of dentist.* 2011; 8(1):1-6.

22. Hama A, Taha Y, Qadir SA. The antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum*) juice. International Journal of Scientific & Engineering Research. 2014; 5(10): 796-798.
23. Jayaprakash A, Sangeetha R. Investigación sobre la actividad antimicrobiana de *Punica granatum* Linn. Extracto de cáscara de acetona. Journal of Academia and Industrial Research. 2016 Oct; 5(5): 77-80.
24. Vegara S. Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de zumo de granada (*Punica granatum* cv. Mollar) [tesis doctoral]. Elche: Universidad Miguel Hernández de Elche; 2014. 358p.
25. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Altern Med Rev. 2008; 13(2):128-144.
26. Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferrerira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin- rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. Planta Med. 2007; 73(5): 461-467.
27. Machado T B, Leal IC, Amaral AC, Dos Santos K, Da Silva MG, Kuster RM. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. J. Braz.Chem.Soc. 2002; 13(5): 606-610.
28. Sánchez A, Carbonell AA, La fruta granada cultivada en España, Punicalagina antioxidante del zumo de granada y el extracto de granada, en la alimentación funcional del futuro. 2012.

29. Bhandary S K, Kumari S, Bhat V, Bekal M. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum L.* peel, whole fruit and seeds. Nitte University Journal of Health Science. 2012; 2(4): 34-38.
30. Cruz-Antonio F. Propiedades químicas e industriales del ácido elágico .Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2010; 2(3).
31. Al-Rawahi AS, Edwards G, Al-Sibani M, Al-Thani G, Al-Harrasi H, Rahman M. Phenolic Constituents of Pomegranate Peels (*Punica granatum L.*) Cultivated in Oman. European Journal of Medicinal Plants. 2014; 4(3): 315-331.
32. Dipak G, Axay P, Manodeep C, Jagdish K. Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum L.* an overview. Research journal of pharmacy. 2012; 3 (2): 65-68.
33. Khanbabaee K, Van Ree T. Tannins: Classification and Definition. Natural Products Reports. 2001; 18:641-649.
34. Haslam E. Plant polyphenol: Vegetable tannins revised. Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Cambridge: [Editorial desconocida]; 1989.240p.
35. Bhat TK, Singh B, Sharma OP. Microbial degradation of tannins: a current perspective. Biodegradation. 1998; 9 (5): 343-357.
36. Vázquez AA, Álvarez E, López JA, Wall A, De La Rosa L. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Tecnociencia. 2012; 6(2): 84-93.
37. Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica orgánica. 2^a ed. Caracas: [Editorial desconocida]; 2002.411p.

38. Taype J. El cultivo del granado. Universidad de la Molina. 2010
39. Salinas-Moreno Y. Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L.*) con diferente grado de maduración. Revista Chapingo Serie Horticultura. 2009; 15(1): 97-101.
40. Djurić M. Quantitation of ellagic acid in blackberries. Serbia. Hem. Ind. 2014; 68 (2) 241–245.
41. Rosas EC, Burgos A, Noguera L, Kacaniová M, Hernández F, Cárdenas JL, Carbonel AA. Antimicrobial activity of *Pomegranate peel* extracts as affected by cultivar. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2017 Feb; 97 (3): 802-810.
42. Ascacio J, Aguilera A, Rodríguez R, Aguilar C. Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44 (2):36-40.
43. Salas MG, Cruz AZ, Silva SY, Valdivia B, Rodríguez R, Aguilar C, Chávez J. Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2013; 5(9): 5-11.
44. Naz S, Siddigi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. J Food Sci. 2007 Nov; 72(9):341-345.
45. Entessar HA, Al-Mosawe I, Al-Saadi I. The Extraction and Purification of Gallic Acid from the Pomegranate Rind. Al-Mustansiriyah J. Sci. 2012; 23(6):53-60.

46. Arbayza J, Ruiz S, Venegas E, Ruidias D, Cosavalente K. Capacidad Antioxidante de zumo y de los extractos hidroalcohólicos y acuoso obtenidos de *Punica granatum* y su relación con el contenido de polifenoles. Revista Farmaciencia. 2014; 2(2):50-55.
47. Organización Mundial de la Salud. WHO Monographs on selected medical plants. 2014; 4:117-123.
48. Lee C, Chen L, Liang W, Wang C. Anti-Inflammatory effects of *Punica granatum* Linne *in vitro* and *in vivo*. Food Chemistry. 2010; 118(2):315-322.
49. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res. 2014; 3:100.
50. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. 35(3).
51. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10):813-29.
52. Pellecuer S, Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. Huiles essentielles bactericides et fongicides. Revue de l'Institut Pasteur de Lyon. 1976; 9:135-9.
53. Rex JH, Alexander BD, Andes D. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015; 28(14).
54. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2008; 10(10):813-29.

55. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* Story. *Environ Microbiol.* 2010; 12(6):1377–83.
56. Filiatrault MJ, Picardo KF, Ngai H, Passador L, Iglewski BH. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Genes Involved in Virulence and Anaerobic Growth. *Infect Immun.* 2006; 74(7):4237–45.
57. Blanco M, Cremona A. *Infectología Crítica a distancia. Manejo de las Infecciones por Organismos Multirresistentes.* 2009.
58. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Cordova A, Dávila L, López-Martinez Y, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, asociados con la formación de biopelículas. *Boletín Médico Hospital Infantil de México.* 2013; 70(2):138-150.
59. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa: A review of their pathogenesis and prevalence clinical setting and the environment.* *Infection Epidemiology and Medicine.* 2016; 2(1): 25-32.
60. Shimada T, Matsumura I. Immune evasion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Clinical Immunology.* 2014; 37(1):33-41.
61. Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and Environments.* 2013; 28(1):13-24.
62. Costerton J W, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 1994; 176(8): 2137-2142.
63. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27(4): 619-624.

64. Weiner LM, Weeb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 2016; 37(11): 1288-1301.
65. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. [lugar desconocido]: McGraw-Hill Medical; 2008. 2650p.
66. Mandell G, Benett JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica*. 7^a Edición. [lugar desconocido]: Editorial Elsevier; 2011. 4106p.
67. Boderó MV. Estudio Farmacognóstico y actividad antimicrobiana (*in vitro*) de los Extractos fluidos de Arrayán y Pumín y su aplicación en una pasta dentífrica [Tesis de titulación]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2010.152p
68. Pahissa A, Almirante B, Rivas JL, Cercenado M, Cobo J, Cueto M, et al. *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. 1^a edición. Barcelona: Editorial ICG Marge, SL; 2009.
69. 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.
70. Kliegman RM, Stanton BF, Geme JW, Schor NF, Bherman RE. *Nelson Tratado de Pediatría*. 19^a edición. Barcelona: Elsevier; 2013.
71. Chambers H F, and F R Deleo. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7:629-41.

72. 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.
73. Shopsis 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.
74. Cervantes E, García R, Salazar P. *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61 (1): 28-40.
75. Guillem Prats 2013. Microbiología y Parasitología Medica” Editorial Panamericana pág. 234 9na Edición.
76. Perilla M, Ajello G, Bopp C, et al. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Manual. Organización Mundial de la Salud; 2004.
77. García L. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas. [tesis de titulación]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. 57p.
78. Koneman EW. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color. 6ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana 2008.
79. Brooks G, Morse S, Carroll K, et al. Microbiología Medica .25 Th ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A; 2010.
80. Gonzales A. obtención de aceites y extractos etanólicos de plantas del amazonas. [Tesis de licenciatura]. Universidad nacional de Colombia. 2004.

81. Duraffourd C, y Lapraz J. Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson; Francia; 1983.
82. Descriptores de la ciencia de la salud [internet]. Sao paulo: Biblioteca virtual de salud. [Online].; 2003 [cited 2017 Enero 01]. Available from: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>.
83. Morillo E. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Flacourtia indica* (Burm. F.) Flacourtiaceae: [Tesis de Licenciada en bioanálisis]. Mérida: Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis; 2016.
84. Dos A, Oliveira D, Freitas C, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando una cepa de importância hospitalar. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [Internet]. 2007 Dic [actualización 2008 Mar 11; citado 2017 Jul 23]; 43(6):413-423.
85. Andrews MJ. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. J Antimicrob Chemother 2001; 48(Suppl 31): 5-16.
86. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, [Online].; 2002. [cited 2018 Mayo 16]. Available from: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%2002.pdf>

ANEXO 1: Matriz de consistencia

EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Punica granatum</i> (GRANADA) EN CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Si existe el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de la hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	TIPO	Ficha de observación participante
			Extracto etanólico de la hoja de <i>Punica granatum</i> "granada"	. Concentración del extracto etanólico de la hoja de <i>Punica granatum</i> "granada en %	Transversal	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	Fotografías
1. ¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de la hoja de <i>Punica granatum</i> (granada) mediante la técnica de difusión en agar?	1.- Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) mediante la técnica de difusión en agar.	1. Existe efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) mediante la técnica de difusión en agar.	Efecto antimicrobiana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	1. Diámetro en mm del halo de inhibición.	Cuantitativo (Aplicado)	Placas Petri
2. ¿Cuál es la CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	2.- Determinar CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	2.- Existe una CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .		2. Grado de Turbidez		
3. ¿Cuál es la CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	3.- Determinar CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	3.- Existe una CMI <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Punica granatum</i> (granada) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .			DISEÑO	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>
					Experimental	

ANEXO 2: Certificado *Punica granatum*

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta conocida como "GRANADA" proporcionada por las Srtas. MILAGROS YOVANA MUÑOZ CABANA y KAREM GISSELA SANTA CRUZ LÓPEZ, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Punica granatum* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Myrtales
Familia: Punicaceae
Género: *Punica*
Especie: *Punica granatum* L.

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 21 Mayo 2018.


Blgo. Hamilton Beltrán

Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CBP. 2719

ANEXO 3: Constancia de haber realizado la parte experimental



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



EL DIRECTOR DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA:

CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN PROCESO DE ANÁLISIS

A las Srtas. **KAREM GISSELA SANTA CRUZ LÓPEZ** y **MILAGROS YOVANA MUÑOZ CABANA**, quienes fueron partícipes de la realización del **ENSAYO DE EFICACIA ANTIMICROBIANA**, por el método de difusión en agar y **ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA** por el método de **Macrodilución** con muestra de **“HOJAS DE GRANADA”**, en las fechas del 12 al 23 de Marzo en nuestro Laboratorio Microbiológico del **Centro de Control Analítico – CENPROFARMA**

Se expide el presente documento a solicitud de las interesadas, para los fines que estimen por conveniente.

Lima, 28 de Marzo del 2018.

QF Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification

N° BR213269



ANEXO 4: Certificado Microbiológico *Pseudomonas aeruginosa*

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: *P. aeruginosa* ATCC 9027 PK/5
Lot Number: 650614

Product Number: R4605210
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

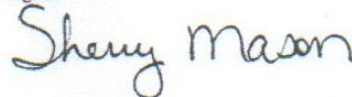
Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Vitek 2C GN

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

ANEXO 5: Certificado Microbiológico *Staphylococcus aureus*

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: *S. aureus* ssp *aureus* ATCC 6538 PK/5
Lot Number: 633937

Product Number: R4607016
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

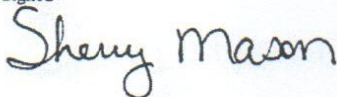
Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Biochemical Profile: Vitek 2C GP

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

ANEXO 6: Prueba de solubilidad



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

Reactivo	Prueba o ensayo	Resultados
Éter de petróleo	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Ciclohexano	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Diclorometano	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Cloroformo	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Etanol	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Metanol	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	
Agua	1mg del extracto seco + 5 gotas del solvente	

Leyenda: (+++++) Muy soluble, (++++) Soluble, (++) Poco soluble, (+) Parcialmente soluble, (-) Negativo.

ANEXO 7: Screening fitoquímico



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE SCREENING FITOQUIMICO

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

	Reactivo	Demostración	Identificación	Resultados
IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS	Bornträger	3 mg del extracto + 2 gotas NaOH 10% + y 2 gotas de cloroformo	Color rojizo	
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS	Fe Cl ₃	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Coloración verde negruzca	
IDENTIFICACIÓN DE TRIPERPENOS (TRITERPENOS)	Liebermann-Burchard	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Coloración verde o azul verdoso	
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	Dragendorff	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Color rojo ladrillo	
	Mayer	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	
	Wagner	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	
IDENTIFICACIÓN DE LACTONAS α y β INSATURADAS	Baljet	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Color rojizo	

IDENTIFICACIÓN DE TANINOS	Con gelatina	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado abundante	
	Con gelatina sal	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Precipitado abundante	
IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANIDINAS	NaOH 10%	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo	Color rojizo	
IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	Benedict	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo, agitar y llevar a baño maría por 10 minutos	Formación de un precipitado rojo ladrillo	
	Fehling A+ Fehling B	3 mg del extracto + 2 gotas de Fehling A+ Fehling B, agitar y llevar a baño maría por 10 minutos	Formación de un precipitado rojo ladrillo	
IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS	Molish	3 mg del extracto + 2 gotas del reactivo molish + 2 gotas de H ₂ SO ₄ , dejar en reposo	Formación de un anillo violáceo	
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONIDES	Shinoda	3 mg del extracto + 1 limadura de magnesio + 2 gotas del HCl	Color anaranjado intenso	

Leyenda: (+++++) Abundante, (++++) Moderado, (++) Poco, (+) Muy poco, (-) Negativo.

ANEXO 8: Instrumento de recolección de datos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
y *Staphylococcus aureus***

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

Actividad antibacteriana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> por el método de Kirby bauer						
CONCENTRACION (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Punica granatum</i> (granada)					CONTROLES	
N° PLACAS	25%	50%	75%	100%	Gentamicina 10ug	Alcohol 96°
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
1						
2						
3						
MEDIA						

ANEXO 9: Instrumento de recolección de datos.



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICA**

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
y *Staphylococcus aureus***

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA						
<i>Punica granatum</i> (Granada) en cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en uL	Cantidad de extracto en uL	Concentración del extracto en %	Características observadas después de las 24 horas	Resultados
1	100	5000	5000	50		
2	100	6250	3750	37,5		
3	100	7187,5	2812,5	28,125		
4	100	7890,7	2109,3	21,093		
5	100	8418	1582	15,82		
6	100	8813,5	1186,5	11,865		
7	100	9110,1	889,9	8,899		
8	100	9332,6	667,4	6,674		
9	100	9499,4	500,6	5,006		
10	100	9625	375	3,75		
11	100	9719	281	2,81		
12	100	9788,9	211,1	2,111		
13	100	9841,6	158,4	1,584		
14	100	9881,2	118,8	1,188		
15	100	9911	89	0,890		
TUBOS DE CONTROL						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB (mL)	Características observadas después de las 24 horas			Resultados
16	100	10				
17	----	10				

Legenda:

(Negativo): No hubo crecimiento bacteriano

(Positivo): Hubo crecimiento bacteriano

ANEXO 10: Instrumento de recolección de datos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Punica granatum* (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas*
aeruginosa y *Staphylococcus aureus*

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA						
<i>Punica granatum</i> (Granada) en cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en (uL)	Cantidad de extracto en (uL)	Concentración del extracto en %	Características observadas después de las 24 horas	Resultados
1	100	5000	5000	50		
2	100	7500	2500	25		
3	100	8750	1250	12,5		
4	100	9375	625	6,25		
5	100	9687	313	3,13		
6	100	9843,5	156,5	1,565		
7	100	9921,7	78,3	0,783		
8	100	9960,9	39,1	0,391		
9	100	9980,4	19,6	0,196		
10	100	9990,2	9,8	0,098		
11	100	9995,1	4,9	0,049		
12	100	9997,5	2,5	0,025		
13	100	9998,7	1,3	0,013		
14	100	9999,3	0,7	0,007		
15	100	9999,6	0,4	0,004		
TUBOS DE CONTROL						
Tubo	Inóculo (uL)	TSB en (mL)	Características observadas después de las 24 horas		Resultados	
16	100	10				
17	-----	10				

Leyenda:

(-): No hubo crecimiento bacteriano

(+): Hubo crecimiento bacteriano.



ANEXO 11: Ficha de Validación por Juicio de Expertos.

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA**

Nº:

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE
Punica granatum (GRANADA) EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus***

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | MENOS DE | | | | | |
|--|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100 | | | | | |
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... | () | () | () | () | () | () |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que los items están referidas a los conceptos del tema?..... | () | () | () | () | () | () |
| 3. ¿Qué porcentaje de los items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... | () | () | () | () | () | () |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que los items del instrumento son de fácil comprensión?..... | () | () | () | () | () | () |
| 5. ¿Qué porcentaje de los items considera usted que siguen una secuencia lógica?..... | () | () | () | () | () | () |
| 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?..... | () | () | () | () | () | () |

SUGERENCIAS

1. ¿Qué items considera usted que deberían agregarse?

.....
.....

2. ¿Qué items estima que deberían eliminarse?

.....
.....
.....

3. ¿Qué items considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....
.....

Fecha:

Validado por:

Firma:

ANEXO 12: Preparación del extracto etanólico de *Punica granatum*



Recolección de la muestra



Limpiamos la muestra de hojas



***Colocamos en la estufa a 40°C
por 48 horas***



***Pulverizamos hasta obtener un
polvo fino.***



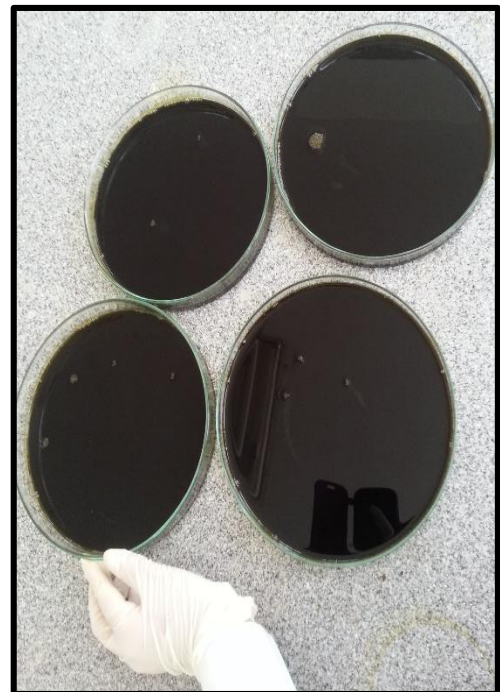
Maceración con etanol 96° x 7 días



Filtración



Colocamos en la estufa a 40°C por 72 horas



Extracto etanólico

Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum*:



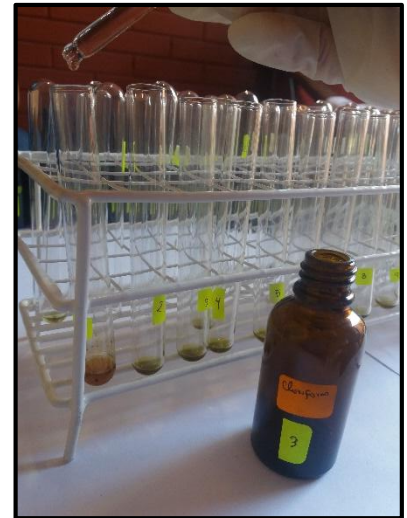
ANEXO 13: Análisis fitoquímico de metabolitos secundarios

A) Identificación de quinonas

Con Bornträger



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas de NaOH 10%



Adicionar 2 gotas de cloroformo

Resultado:



+
Color rojizo
presencia de
quinonas

B) Identificación de compuestos fenólicos

Con Cloruro Férrico



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas de cloruro férrico



Resultado:

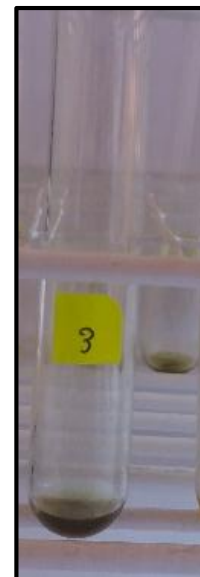
+
Coloración verde
negruzca nos indica la
presencia de taninos

C) Identificación de terpenos (triterpenos y esteroides)

Liebermann- Burchard.



Agregar 3 gotas de la
muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

+
La formación de un color verde
o azul verdoso después de
unos minutos es positiva.

D) Identificación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff



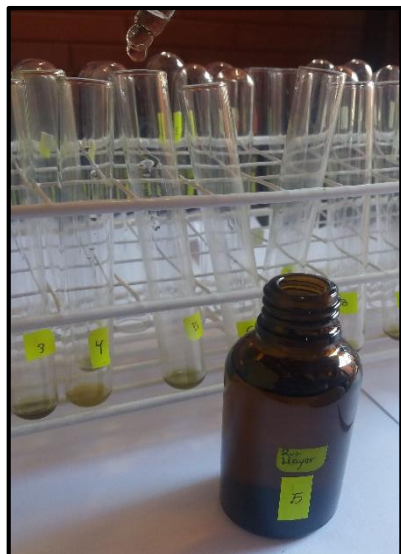
Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

+
La aparición de un precipitado que va del naranja al rojo, es positivo.

Reactivo de Mayer



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

+
La aparición de un color blanco a crema indica positivo.

Reactivo de Wagner



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

+
La aparición de un precipitado color marrón indica positivo.

E) Identificación de lactonas α y β saturadas

Reactivo de Baljet



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

-
La formación de un color rojizo indica positivo.

F) Identificación de taninos

Con gelatina



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



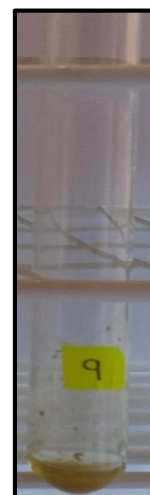
Resultado:

+
Un precipitado abundante
en el fondo confirma la
presencia de taninos.

Con gelatina sal



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Resultado:

+
Un precipitado abundante
en el fondo confirma la
presencia de taninos.

G) Identificación de antocianinas

Con NaOH 10%



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo.



Resultado:

-
La formación de un color
rojizo indica positivo.

H) Identificación de azúcares

Reactivo de Benedict



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo.
Llevar a baño maría hasta
ebullición



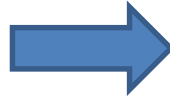
Resultado:

+
La formación de un
precipitado rojo ladrillo
indica positivo.

Reactivo de Fehling



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo Fehling A



Adicionar 2 gotas del reactivo
Fehling B.
Llevar a baño maría hasta

Resultado:



+
La formación de
un precipitado rojo
ladrillo es positivo.

Reactivo de Molish



Agregar 3 gotas de la muestra
+
2 gotas del reactivo



Adicionar 2 gotas ácido
sulfúrico (H_2SO_4)

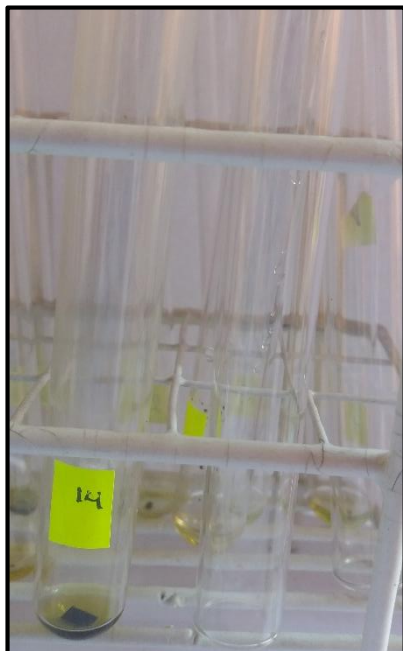
Resultado:



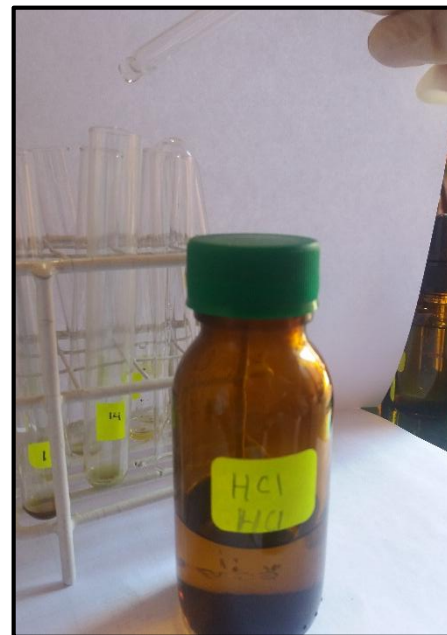
+
La formación de un anillo
color violeta en la interface,
la reacción es positiva

I) Identificación de flavonoides

Con R. Shinoda.



Agregar 3 gotas de la muestra
+
1 limadura pequeña de
magnesio



Adicionar 2 gotas de HCl
concentrado

Resultado:

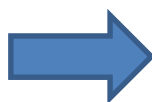


+
Un color anaranjado
intenso indicará un
resultado positivo.

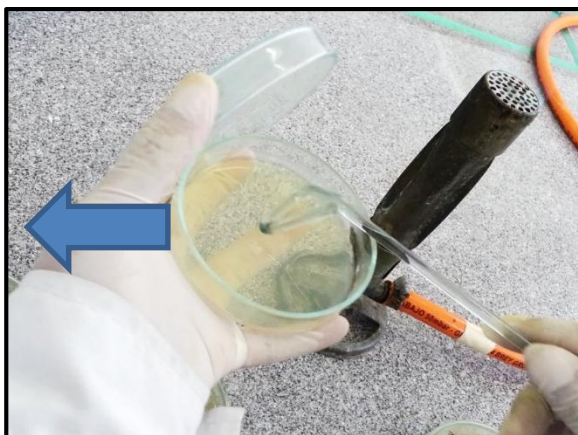
ANEXO 14: Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Punica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar.



Se tomó de 3 a 5 colonias y se diluyó en tubos de suero fisiológico estéril



Preparación y estandarización del inóculo



Con la ayuda de la espátula de Drigalsky homogenizar el inóculo.



Agregar 100 µl de cada inóculo bacteriano a cada una de las placas Petri con Agar Mueller Hinton



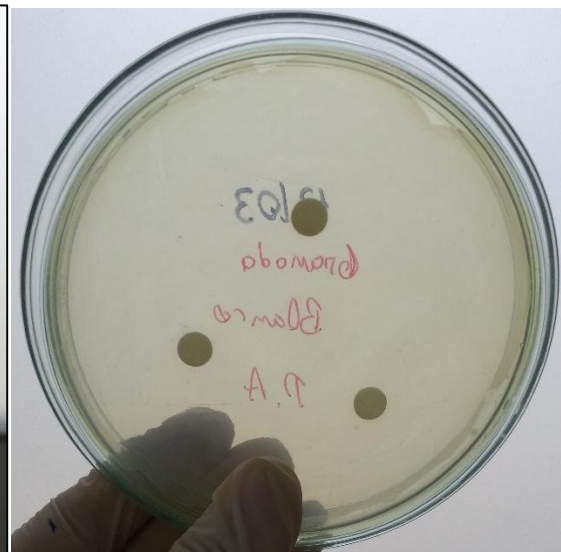
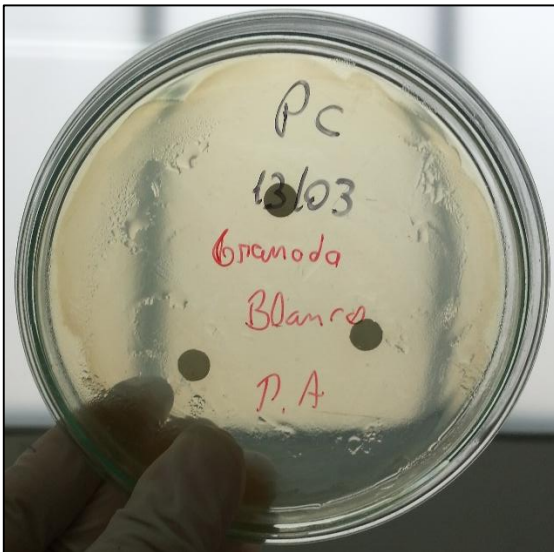
Colocar los discos en las placas inoculadas



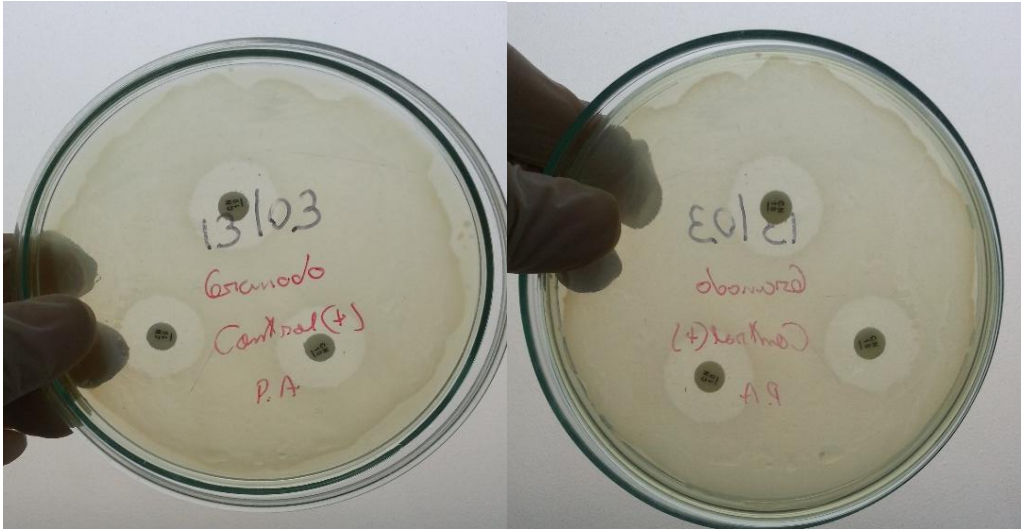
Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.

RESULTADOS

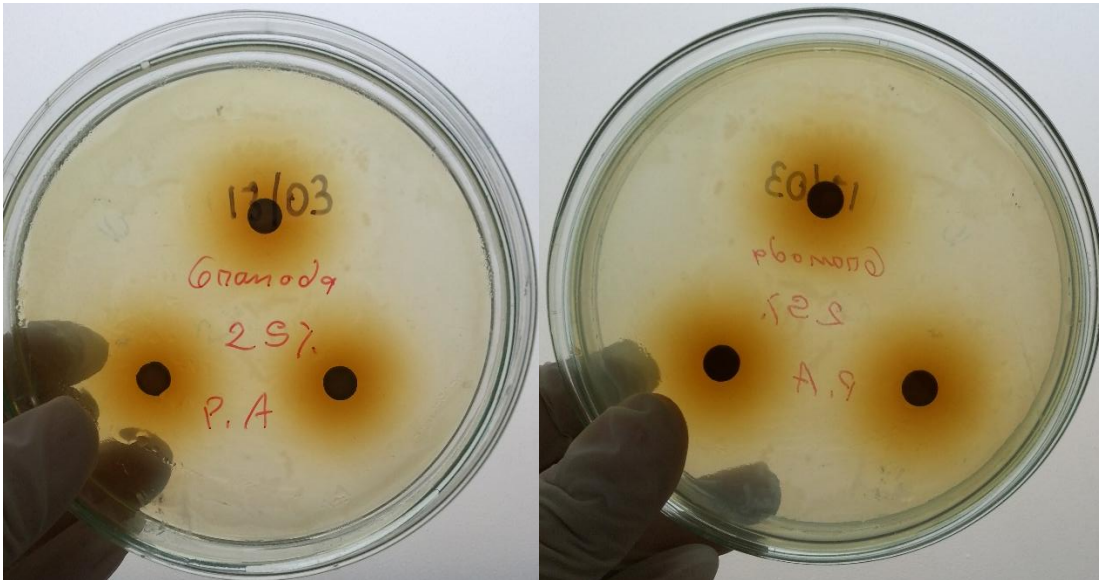
a) Con *Pseudomonas aeruginosa*



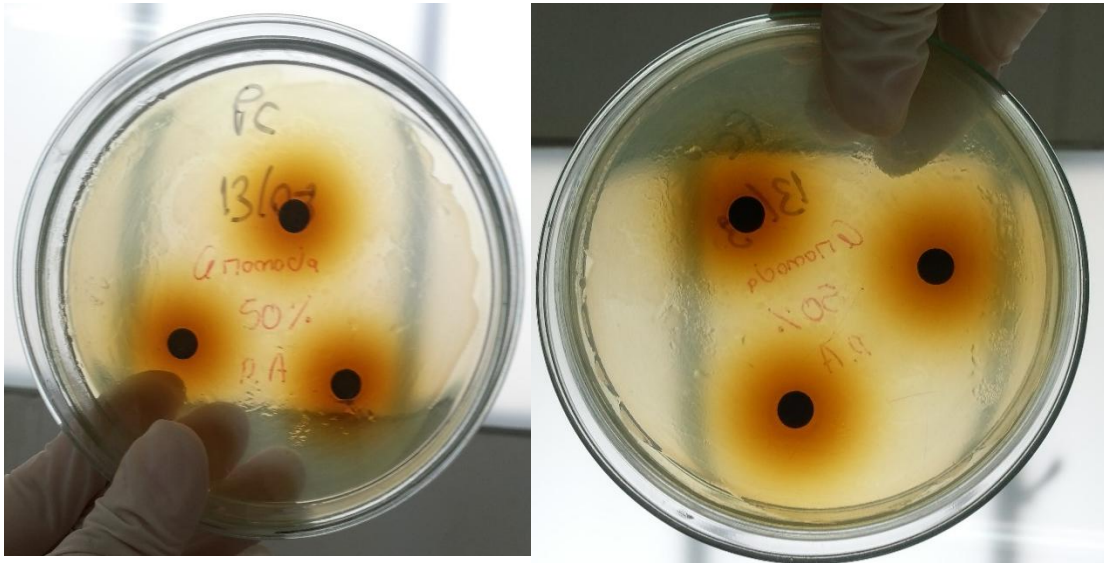
Blanco de *Pseudomonas aeruginosa*: No presentó inhibición



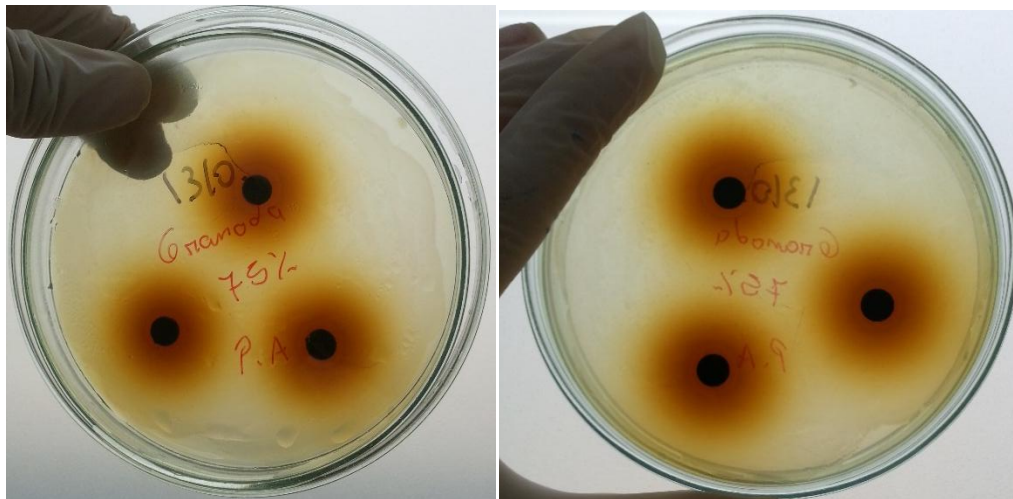
Control positivo de *Pseudomonas aeruginosa* (gentamicina 10 ug):
 Disco 1: 17,68 mm; Disco 2: 18,86mm; Disco 3: 17,89mm



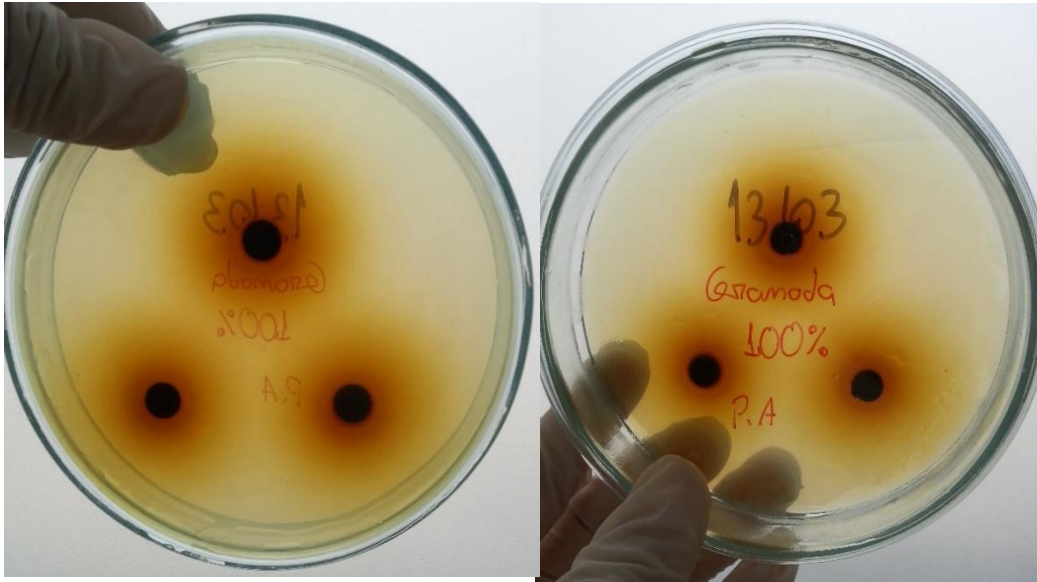
Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 25%: Disco 1:
 6,25 mm; Disco 2: 6,59 mm; Disco 3: 6,33 mm



Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 50%: Disco 1: 6,83 mm; Disco 2: 7,21 mm; Disco 3: 6,28 mm

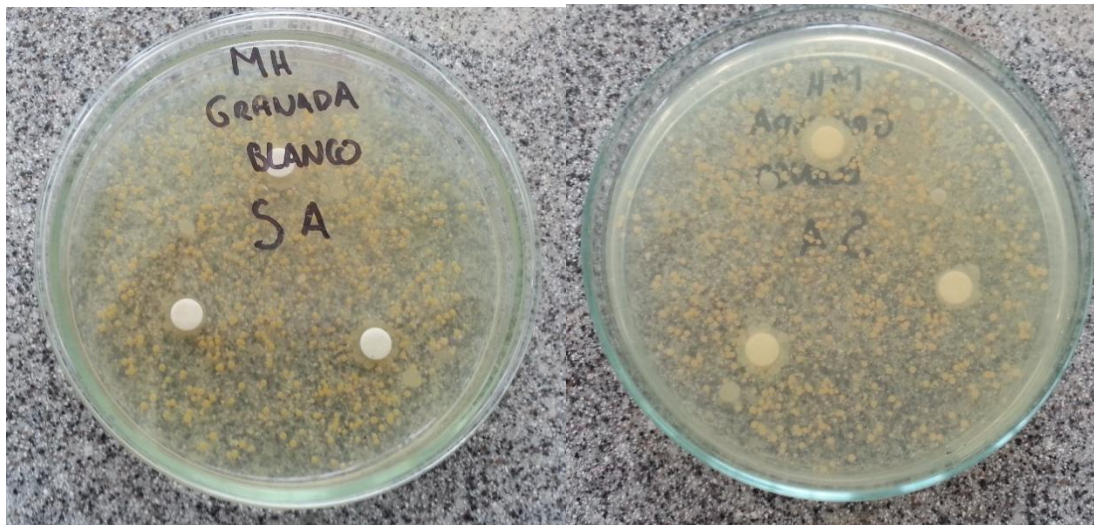


Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 75%: Disco 1: 9,6 mm; Disco 2: 10,4 mm; Disco 3: 9,39 mm

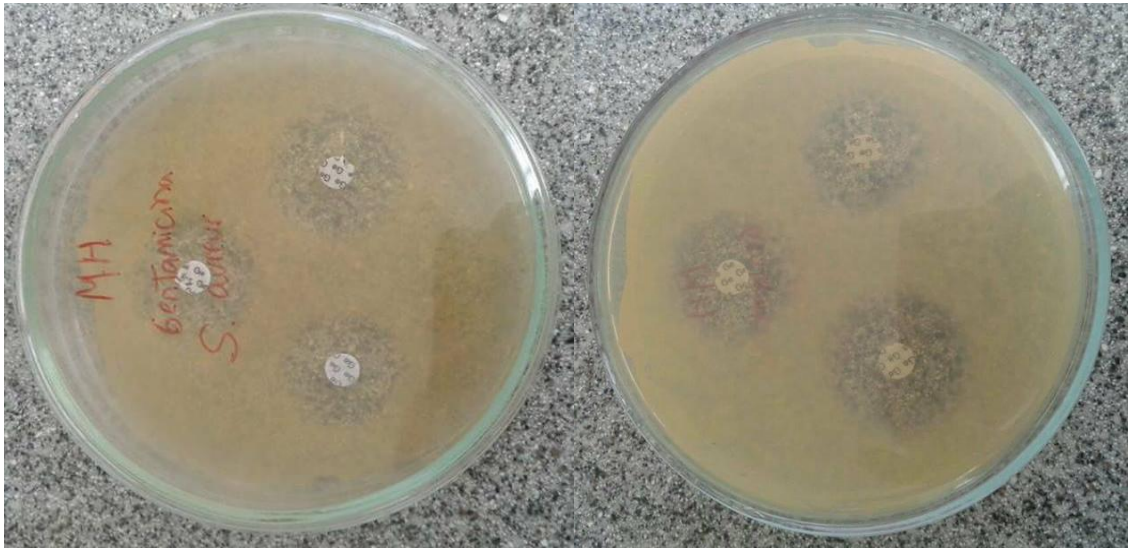


Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 100%: Disco 1: 10,32 mm; Disco 2: 9,41 mm; Disco 3: 10,38 mm

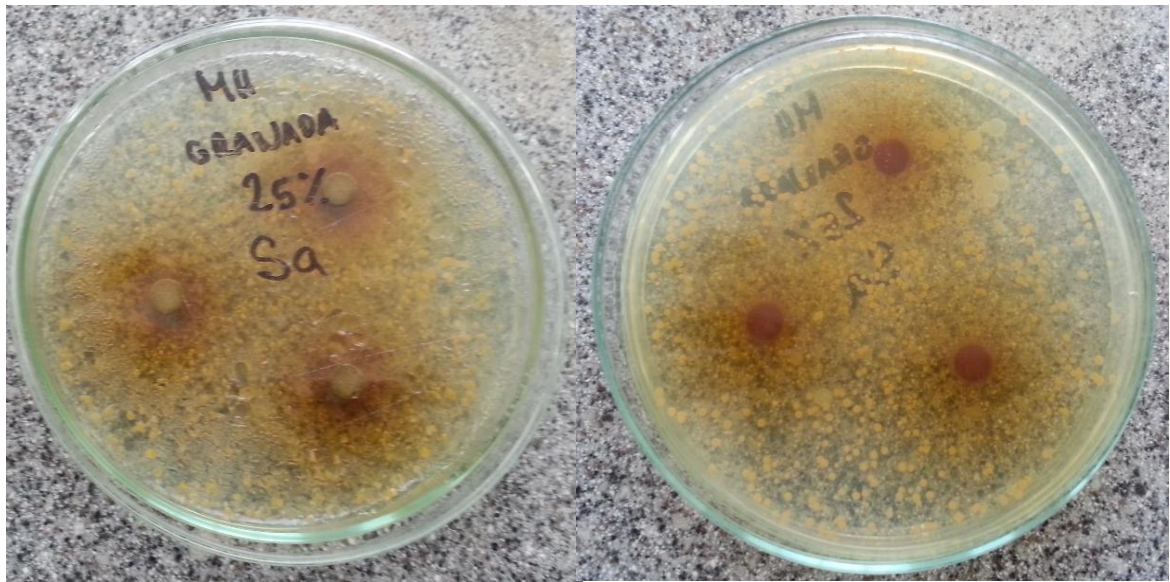
b) Con *Staphylococcus aureus*



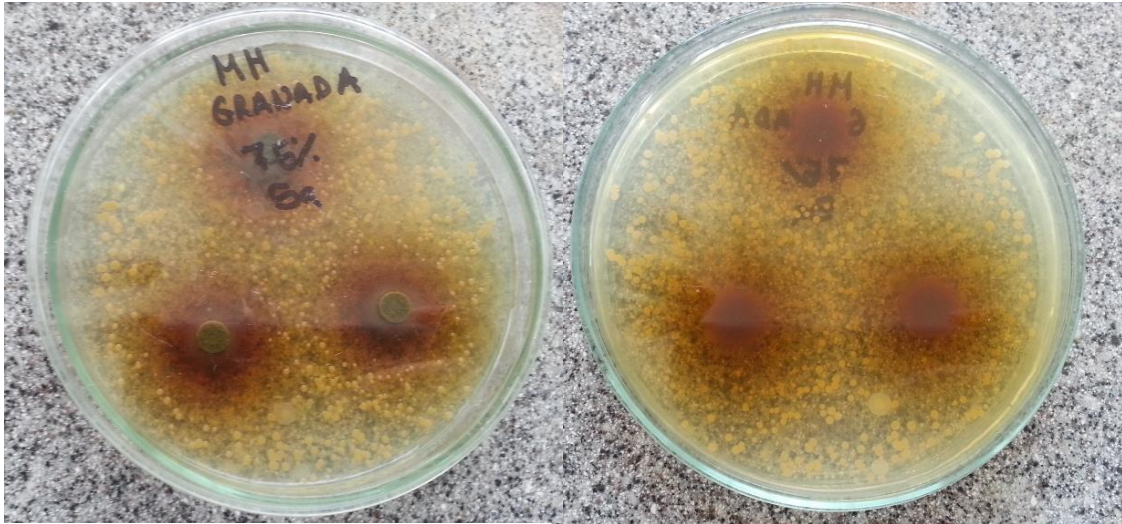
Blanco de *Staphylococcus aureus*: No presentó inhibición



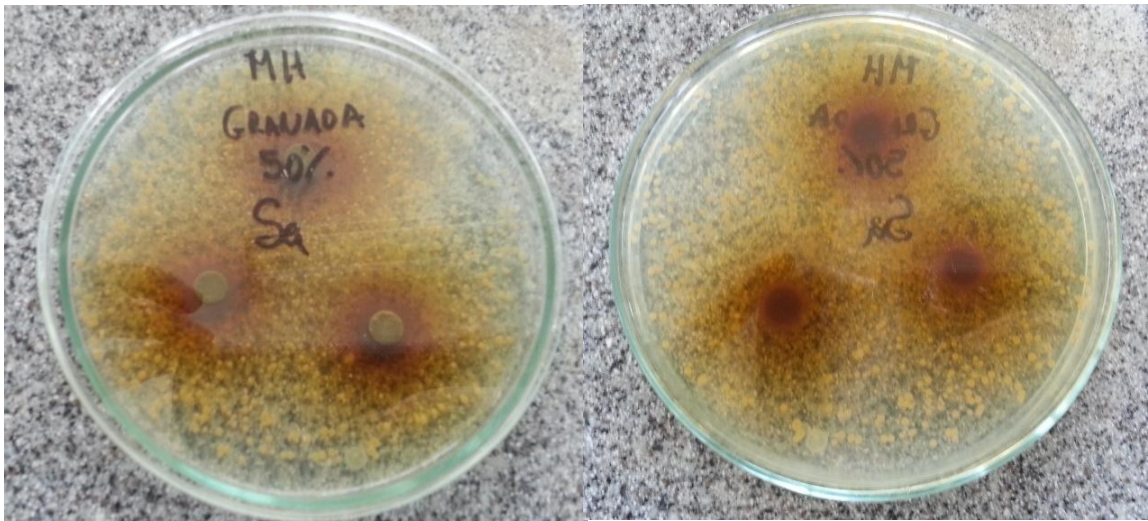
Control positivo de *Staphylococcus aureus*: Disco 1: 29,84 mm; Disco 2: 33,62mm; Disco 3: 31,10mm



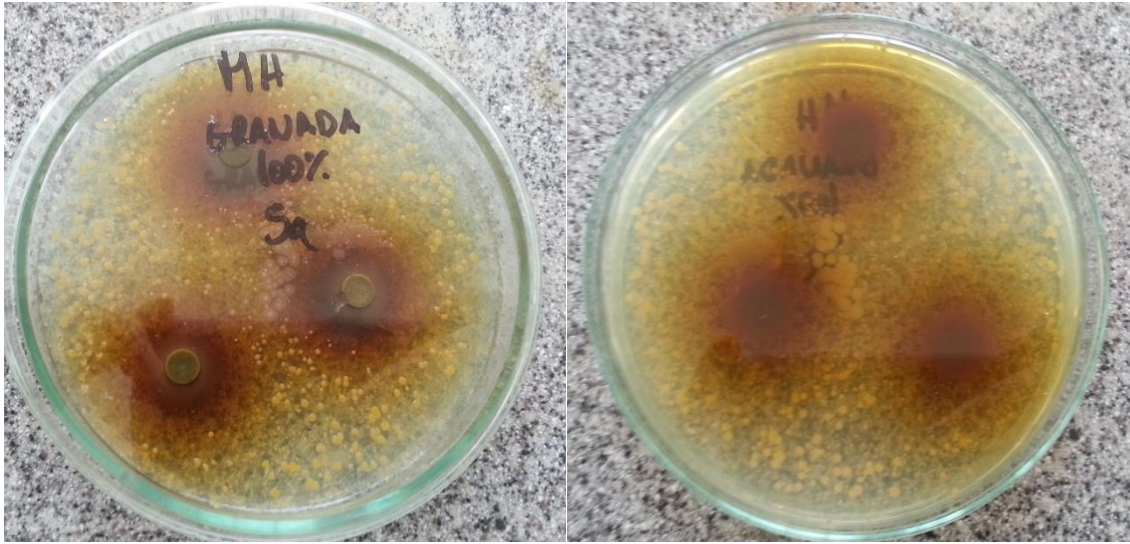
Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 25%. Disco 1: 22,39 mm; Disco 2: 23,05mm; Disco 3: 20,66mm



Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 75%. Disco 1: 24,56 mm; Disco 2: 25,97mm; Disco 3: 25,15mm



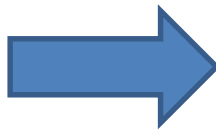
Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 50%. Disco 1: 24,73 mm; Disco 2: 25,95mm; Disco 3: 25,54mm



Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 100%. Disco 1: 27,16 mm; Disco 2: 27,38mm; Disco 3: 27,52mm

ANEXO 15: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las hojas de *Púnica granatum* (granada) frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de macrodilución.

A) Preparación del caldo tripticasa soya



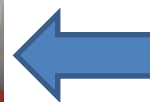
De acuerdo a las instrucciones del fabricante (se cogió 30 g del medio deshidratante)



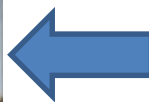
Se disolvió 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada



La preparación se llevó al autoclave 121° por 15 minutos.



Se agregó 10 mL del caldo preparado a los tubos y se llevó a la autoclave a 121 ° C a 15 lb/pg² durante 15 minutos



Luego se deja enfriar a temperatura de ambiente

B) Preparación de los inóculos



Se tomó de 3 a 5 colonias



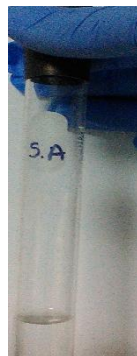
Luego se diluyó en tubos con suero fisiológico estéril



Para la *Pseudomona aeruginosa* 1×10^8 UFC/mL

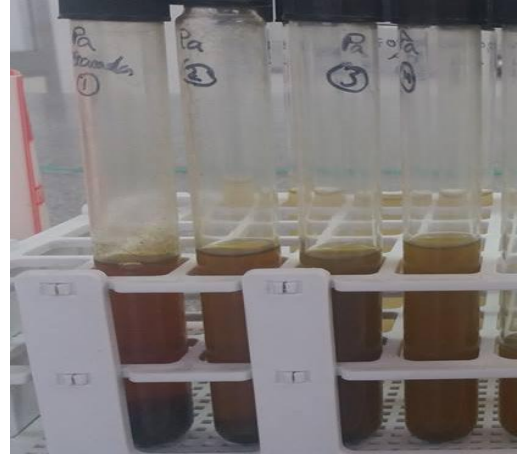
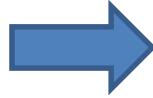


Se hizo la preparación y estandarización del inóculo



Para el *Stafilococcus aerus* 1×10^6 UFC/mL

c) Preparación de los tubos con el extracto etanólico y Caldo Trypticasa Soya (TSB)



Se retiró una cantidad de caldo TSB correspondiente a la cantidad de extracto que se debía agregar.

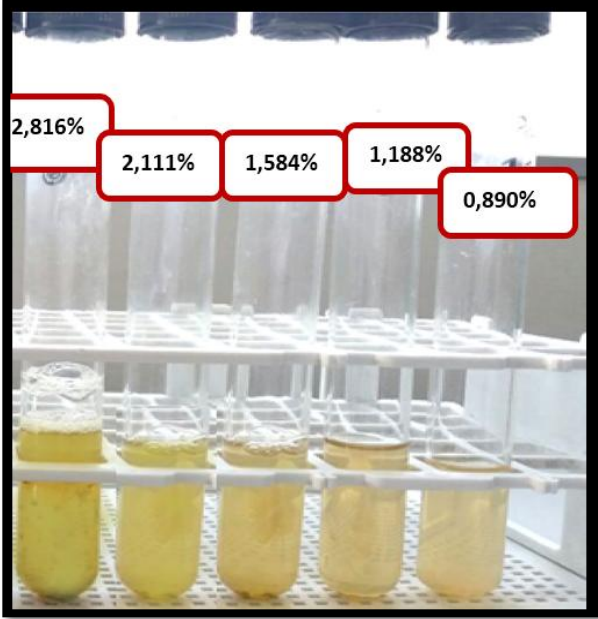
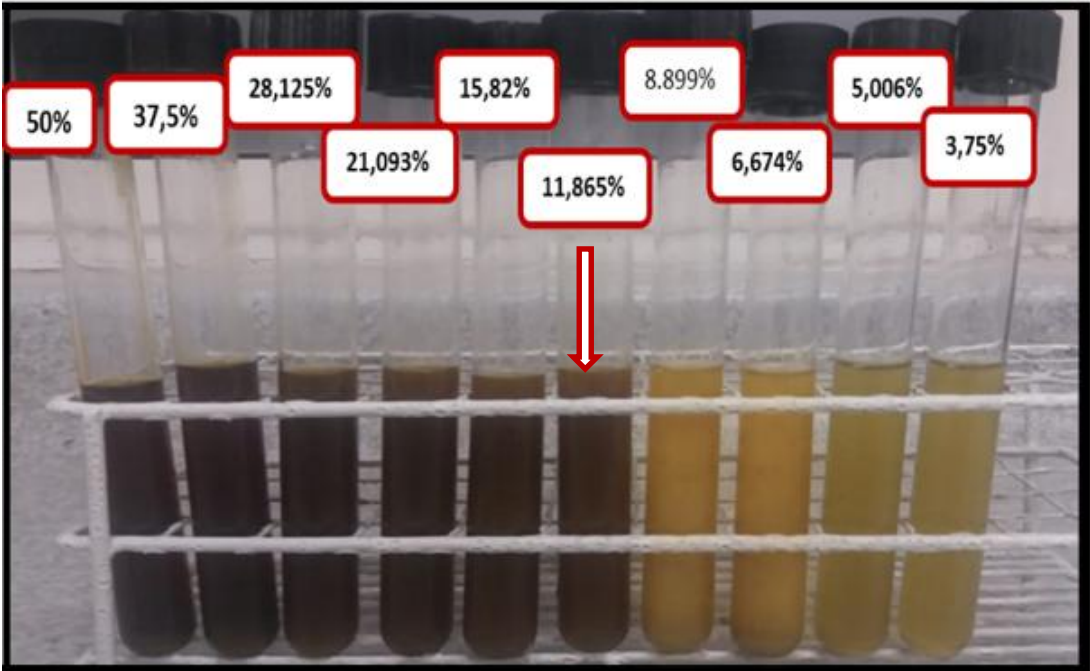
Se agregó el extracto correspondiente a la cantidad de caldo que se retiró

d) Inoculación e incubación de los tubos



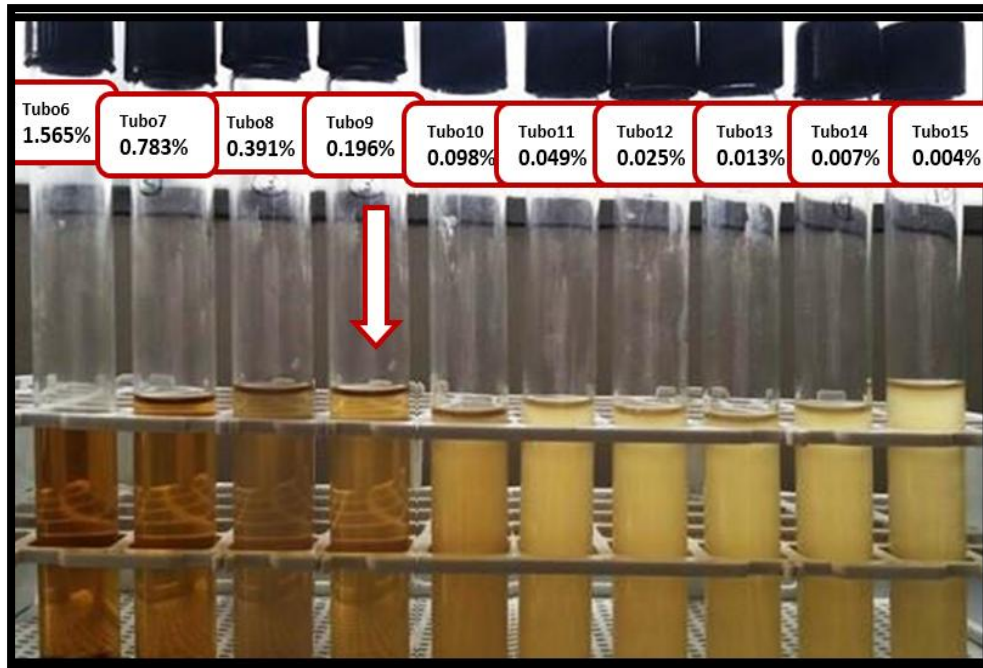
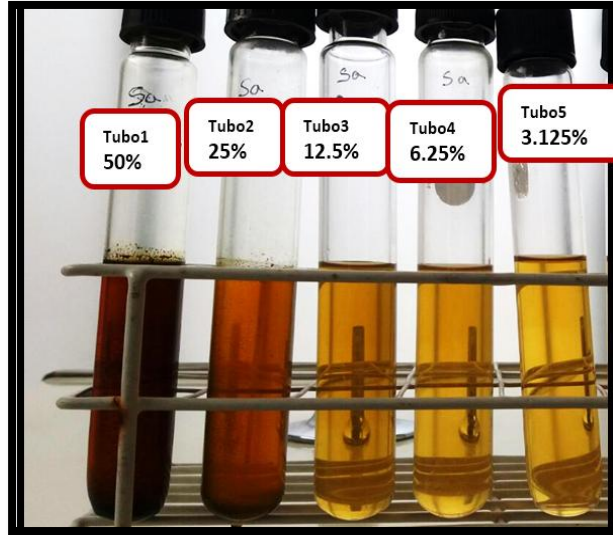
Luego agregamos 100uL del inóculo en cada batería de tubos y lo llevamos a la incubadora a 35°C durante 24 horas

e) Resultados de la CMI *Pseudomonas aeruginosa*



La CMI para *Pseudomonas aeruginosa* es de 11.865 %.

d) Resultados de la CMI del *Staphylococcus aureus*



La CMI para la *Staphylococcus aureus* es de 0.196 %;

