



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE NUTRICIÓN

**EFEECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Psidium guajava* L. “GUAYABA” FRENTE A
Staphylococcus aureus.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN**

AUTOR:

**CINTHIA ELIZABETH CARRERO MONTENEGRO
ORCID:0000-0003-1114-9583**

ASESOR:

Dr. JORGE LUIS DÍAZ ORTEGA

ORCID: 0000-0002-6154-8913

Dra. ROSA PATRICIA GÁLVEZ CARRILLO

ORCID: 0000-0002-4612-109

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

PROMOCIÓN DE LA SALUD Y DESARROLLO SOSTENIBLE

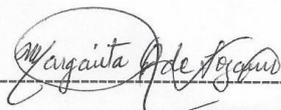
Trujillo - Perú

2019

PÁGINA DEL JURADO



Mg. Dan Altamirano Sarmiento
Presidente.



Mg. Margarita Ojeda Pereda

Mg. Margarita Ojeda Pereda
Secretario.



Dra. Rosa Patricia Gálvez Carrillo

Dra. Rosa Patricia Gálvez Carrillo
Vocal.

DEDICATORIA

Hay personas que con sólo existir hacen de nuestras vidas un sendero feliz, que iluminan tu camino con su amor y dedicación. A ellos les dedico este triunfo.

A mi Madre, por ser la luz de mi vida, por confiar en mí y darme seguridad infinita, por hacerme comprender que siempre se puede llegar más lejos, por enseñarme que no hay nada imposible, solo hay que proponérselo para llegar al final del camino.

A mi Padre, por su infinito apoyo y por guiarme por el camino correcto.

A mi Hermana, le dedico este importante momento de mi vida, por formar parte de mí y porque en ello encontrado el apoyo y la fuerza necesaria para llevar a cabo todo mi propósito.

AGRADECIMIENTO

A mis Padres por el esfuerzo, cariño, admiración, confianza y la dedicación que han tenido durante toda mi vida, a quienes les debo mucho porque se han sacrificado, dando todo para que yo sea la persona que soy hoy, porque con su apoyo incondicional puedo seguir adelante y vencer todos los obstáculos, pero sobre todo por haberme regalado la vida.

A mi Hermana por la confianza y el apoyo inigualable que siempre me ha brindado por darme lo que necesitaba en los momentos más oportunos de mi carrera y además por formar parte de mi vida profesional.

A la Mg. Margarita Ojeda por el apoyo incondicional y por sus valiosos conocimientos durante el proceso de mi desarrollo de tesis.

A mis asesores Dr. Jorge Díaz y Dra. Patricia Gálvez por su enseñanza y aprendizaje que me han demostrado durante este proceso.

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo Cinthia Elizabeth Carrero Montenegro con Documento nacional de identidad N° 47578305 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas - Escuela de Nutrición, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 27 de Mayo 2019

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada Efecto antimicrobiano *In Vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium Guajava L.* “Guayaba” frente a *Staphylococcus aureus*. La misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Nutrición.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACIÓN	vi
ÍNDICE.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MÉTODO	6
2.1 Tipo y diseño de Investigación.....	6
2.2 Operacionalización de variables	6
2.3 Población y muestra.....	7
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	8
2.5 Procedimiento	8
2.6 Método de análisis de datos.....	10
2.7 Aspectos éticos.....	11
III. RESULTADOS.....	12
IV. DISCUSIÓN.....	14
V. CONCLUSIONES.....	17
VI. RECOMENDACIONES	18
REFERENCIAS.....	19
ANEXOS	23

RESUMEN

El presente trabajo de investigación es de tipo trasversal con diseño experimental, se realizó con el propósito de determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de tres concentraciones 2.25 %; 6.7 % y 9 % del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” frente a *Staphylococcus aureus*. La muestra estuvo constituida por 20 medios de cultivos de *Staphylococcus aureus*. Se utilizaron cuatro grupos, tres experimentales inducidos con extracto de hoja de *Psidium guajava* L “guayaba”, y un control positivo con ciprofloxacino. Para la recolección de datos se utilizó el método de Kirby Bauer (difusión en disco) prueba que permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de los microorganismos patógenos. El análisis de los resultados se realizó en el programa SSPS versión 25, a través de la prueba estadística Kruskal Wallis; $p < 0.05$. Se determinó que el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de hoja de *Psidium guajava* a concentraciones 2,25 %; 6.7 % y 9 % mostraron diámetros de halos de inhibición en cultivos de *Staphylococcus aureus*, con valores 0.00 mm; $8,15 \pm 0,745$ mm; $12,25 \pm 0,851$ mm respectivamente; en comparación con el efecto antimicrobiano de ciprofloxacino que fue $23,35 \pm 1,137$ mm. Se concluye que el mayor efecto antimicrobiano de *Psidium “guajava”* Guayaba fue en la concentración de 9% frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras claves: *Psidium guajava*, *Staphylococcus aureus*, flavonoides.

ABSTRACT

The present research was transversal type with experimental design; it was carried out with the purpose of determining the antimicrobial effect in vitro with three concentrations 2.25 %; 6.7 % and 9 % of the hydroalcoholic extract of leaves of *Psidium guajava* L "guava" against *Staphylococcus aureus*. The sample consisted of 20 cultivates of *Staphylococcus aureus*. In the experiment were used four groups, three so-called experimental ones induced with leaf extract of *Psidium guajava* L "guayaba", and a positive control group with administration of ciprofloxacin. To collect the data the Kirby, it was used the Kirby Bauer method. The analysis of the results was carried out in the program SSPS version 25, through the Kruskal Wallis statistical test; $p < 0.05$. It was determined that the effect of three concentrations (2.25 %, 6.7 % and 9 %) of the hydroalcoholic leaf extract of *Psidium guajava*, whose values were 2.25 % = 0.00 mm; 8.15 ± 0.745 mm; 12.25 ± 0.851 mm; and as for ciprofloxacin 5 mcg = $23.35 \pm 1,137$ mm. It concluded that the highest antimicrobial effect of *Psidium "guajava" Guava* was in the concentration of 9 % against *Staphylococcus aureus*.

Key Words: *Psidium guajava*, *Staphylococcus aureus*, flavonoids.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos proviene del griego formado por “mikro” que significa pequeño y “organon” quiere decir órgano. Localizándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos. Algunos microorganismos pueden incluso permanecer en las condiciones extremas¹.

Se sabe que en el cuerpo humano hay numerosas células bacterianas como en la piel y en el tracto digestivo. El sistema inmune hace que el microorganismo sea inofensivo o beneficioso, como algunas que pueden causar enfermedades infecciosas. Para ello se suele utilizar diferentes tipos de antibiótico ya que se han comprobado científicamente que inhiben contra las bacterias².

Una de las plantas más vistas y obtenido por su efecto antimicrobiano y por su valor nutricional es la planta de Guayaba cuyo nombre científico es *Psidium guajava L.*

Esta planta corresponde a la familia de las Mirtáceas, se han encontrado más de 3.000 especies de árboles. En el Perú la producción de guayaba se da en las provincias de: Loreto, Huánuco, San Martín, Junín, Cuzco y Lima (Chosica)³.

Las enfermedades que atacan al estómago y al intestino son generalmente ocasionadas por bacterias, hongo, parásitos y virus.

La composición química del género *Psidium* muestra la presencia de saponinas, sapogeninas, elagitaninos y triterpenos. Además, vitamina C, cariofileno, carbohidratos, taninos, flavonoides, triterpenoides, esteroides, alcaloides, benzofenona, galoil-glicósido, guaijaverin, quercetina-glicósidos, morin-3-O-lixósido, el morin-3-O-arabinósido⁴.

El presente estudios se enfoca en determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava L* “guayaba”, frente a la bacteria Gram positivo *Staphylococcus aureus* y con ello demostrar si tienen o no un efecto antimicrobiano.

Martínez L, et al⁵ en Cuba 2015; evaluaron la actividad antimicrobiana y antifúngica de extracto fluido al 40 % (etanol al 40 %) de *Psidium guajava L.* mediante el método de difusión en agar a una concentración de 107 mg/ml; para ello utilizaron microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; y *clostridium tetani*, concluyendo que el extracto de *Psidium guajava L.* frente a *S. aureus* se evidencia una respuesta antimicrobiana obteniendo como resultado final un halo de 12 mm con respecto al resto de microorganismo que obtuvieron menor diámetro en los halos.

Torres M, et al⁶ en Cuba 2015; se estudió el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *Psidium guajava L.* mediante el método de Kirby Bauer contra *Bacillus antracis*, *Staphylococcus aureus* y *clostridium tetani*. Se trabajó con concentraciones de 100 mg/ml, 200 mg/ml y 400 mg/ml, lo que concluyeron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Psidium guajava L.* presenta mayor efecto antimicrobiano frente *Staphylococcus aureus*, dando como resultado halos de 13 mm por lo que se atribuye a la presencia de taninos en las hojas de la planta de guayaba.

Oranday J, et al⁷ en México 2015; desarrollaron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas pertenecientes a las familias *Myrtaceae* (*Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus camaldulensis*, y *Psidium guajaba*) y *Lauraceae* (*Cinnamomum zeylanicum*) con tres solventes (etanol, agua y acetona) de distinta polaridad sobre bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, mediante el método de difusión en placa con discos de papel filtro, con concentraciones de 25 mg/ml, 75 mg/ml y 100 mg/ml. Como resultado observaron halos de 10 mm frente a *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 y *clostridium tetani*.

Vieira M, et al⁸ en Brasil 2015; en su estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de etanol, de agua y de acetona de hojas de guayaba y hojas de papaya. Utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* para su ensayo, con concentraciones de 25 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml. Los extractos de hojas de papaya (*Carica papaya Linn*) no mostró actividad microbiana mientras que los extractos de hojas de guayaba (*Psidium guajava L*) mostro halo superior a 13 mm de diámetro.

Carvalho G, et al⁹ en Brasil 2016; realizo un estudio de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y ramas de *Psidium guajava L.* sobre bacterias gram-positivo (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus antracis* y *clostridium tetani*), a concentración de 100 mg/ml; para lo cual utilizaron el método Kirby Bauer;

concluyendo que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L. presenta una mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* teniendo un halo de 12 mm.

Gonzales R¹⁰ en Brasil 2016; evaluaron la acción antimicrobiana hidroalcohólica de hojas de guayaba frente a bacterias como: *Staphylococcus aureus* y *clostridium tetani*, en lo que se trabajó con unas concentraciones de 25 mg/ml y 50 mg/ml. Indicaron que fue el más inhibido por *Staphylococcus aureus* en dichos extractos teniendo halos de 12.4 mm, gracias a su composición química de dicha hoja.

La guayaba corresponde a la familia de las Mirtáceas, es un árbol que tiene como estructura física: su hoja mide de 3 a 6 de largo, su tallo es grueso y en tiempo de otoño brota una flor grande con pétalos de color blanco. Se clasifica por ser una planta muy larga, con hojas de color verde oscuro, posee raíz y tallo, también tiene flores y semillas, viene de la familia Myrtaceae y de especie *Psidium guajava*.¹¹

En español y en portugués es conocida como guayaba, guayabo y en el Perú es conocida mayormente como guayaba. El género *Psidium guajava* es natural de América tropical¹².

Los primeros en conocer este vegetal fueron los mexicanos que le dieron como nombre xalxócotl (en idioma náhuatl) que significa “fruto duro-ácido” (xocotl) y “arenoso” (xalli). Al ver que el fruto fue comercializado, tantos portugueses como españoles llevaron semillas para ser sembradas y luego ellos mismo ser exportados a diferentes países. Fernández de Oviedo en su obra “Historia General y Natural de las Indias” llamó como guayaba al fruto de este árbol¹³. La primera publicación científica sobre las propiedades de la guayaba data de 1949 a partir de los trabajos de Collière quien descubrió propiedades bacteriostáticas del extracto acuoso.¹⁴

En 100 g del fruto contiene: 69 kcal, agua 80,6 g; proteínas 1g; lípidos 0,4 g; carbohidratos 17, 3 g; fibra 5.6 g.¹⁵ En cuanto a la raíz, corteza, fruto, flor y hoja; cada uno contiene diferentes componentes químicos; es por ellos que solo nos centraremos en la composición química de la hoja ya que contiene: como vitamina C, aceite esencial, carbohidratos, taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides así mismo compuestas del Aceite esencial cariofileno, nerolidiol, beta - bisaboleno, aromandreno, p – selineno y contienen además beta sitosterol, triterpenoides, leucocianidinas y alrededor de un 10 % de taninos. En cuanto a sus beneficios tanto

en taninos como los flavonoides tiene propiedades antimicrobianas, antioxidante, antiinflamatorio¹⁶.

El principio activo de la hoja de guayaba es gracias al ácido ascórbico, tiamina, riboflavina y calcio, aceite esencial: extraído de sus hojas contiene cariofileno, nerolidiol, sitosterol y ácido ursólico. Y gracias a los aceites esenciales de la hoja de guayaba actúa contra diferentes tipos de bacterias como salmonella, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, en lo que ayuda a inhibir el crecimiento o proliferación de bacterias¹⁷.

El extracto hidroalcohólico es una sustancia concentrada de consistencia líquida que se obtiene de una planta por distintos procedimientos.

Staphylococcus aureus principalmente está en la zona de la piel y genitales externos y rara vez en el colon y la vagina. También puede presentarse algunas infecciones en el torrente sanguíneo por medio de una abertura de la piel infectando a otros órganos como: pulmones, huesos, sistema nervioso, corazón y las articulaciones. Es un microorganismo Gram positivo de forma esférica, de aproximadamente 1µm de diámetro. Son anaerobios facultativos, crecen bien a 37°C en 24 horas de incubación en medios simples. Sus colonias son cremosas, generalmente de color amarillo dorado, de allí su nombre *aureus*, aunque algunas cepas no causan pigmento y se observan de color blanco.¹⁸

El ciprofloxacino es una quinolona de segunda generación (agentes con actividad antimicrobiana), actúa contra diversas bacterias, incluyendo: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Shigella*, *Salmonella*, entre otros. Es usado para el tratamiento de diferentes infecciones entre ellas para las diarreas y cólicos estomacales.¹⁹

El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos, Así mismo el antibiograma sirve para determinar si una bacteria es resistente o sensible a un extracto determinado. Tiene además un interés terapéutico y epidemiológico²⁰

Por lo previamente manifestado en el presente estudio se plantea el siguiente problema ¿Cuál es el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L. “Guayaba” frente a *Staphylococcus aureus*?

Esta investigación se realizó con el objetivo de determinar la capacidad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de hoja de *Psidium guajava L.* “Guayaba” frente a una cepa de *Staphylococcus aureus*.

El principio activo de la hoja *Psidium guajava L.* “Guayaba” se debe a los taninos (9-10 %), contiene grasa (6 %), ácido maslinico y elágico, triterpenoides, ácidos orgánicos y flavonoides derivados de la quercitina como guayaverina.²¹.

Se han demostrado estudio que alta presencia de taninos, flavonoides y quercitina que presenta la hoja de guayaba ayuda a inhibir el crecimiento antimicrobiano, este estudio también contribuye a ser parte de la medicina alternativa ya que por su misma composición y propiedades de la hoja de *Psidium guajava* favorece a excluir problemas que causan afecciones a la piel y estomacales ya que muchas veces tenemos el contacto con microorganismo, también se utiliza como hipoglucemiante, reducir los niveles de colesterol y por su alta concentración en antioxidantes se encarga en combatir los efectos de los radicales libre ²².

Es por ello que se quiere demostrar el efecto antimicrobiano del extracto de hoja de guayaba frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Para responder al problema de investigación se plantea como hipótesis alterna: El extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava L.* “Guayaba” tiene mayor efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*. Y como hipótesis nula: El extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava L.* “Guayaba” no tiene efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*.

Como objetivo principal sé planteo: Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de tres concentraciones 2.25 %, 6.7 % y 9 % del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava L* “guayaba” frente a *Staphylococcus aureus*. Y como objetivos específicos fue:

- Determinar los diámetros de halos de inhibición en cultivos de *Staphylococcus aureus* por efecto de tres concentraciones del extracto de hoja de *Psidium guajava* “Guayaba” (2,25 %, 6.7 % y 9 %)

- Comparar el efecto antimicrobiano de tres concentraciones (2,25 %, 6.7 % y 9 %) del extracto de *Psidium guajava* L “guayaba” con el antibiótico ciprofloxacino en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

II. MÉTODO

2.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es de tipo experimental con estímulo creciente, comparativo, transversal.²³

G0-----O---X (grupo control)
Staphylococcus aureus: **G1 -----X₁ -----O1**
G2 -----X₂ -----O2
G3-----X₃-----O3
G4 -----Ciprofloxacino-----O4

G0-4: Placas Petri con *Staphylococcus aureus*.

Donde:

X₁= Extracto de la hoja de guayaba al 2.25 %

X₂ = Extracto de la hoja de guayaba al 6.7 %

X₃= Extracto de la hoja de guayaba al 9 %

X₄= Ciprofloxacino (Control positivo)

O: Medición de halo formado, post aplicación del extracto de hoja de guayaba.

2.2. Operacionalización de variables

Variables:

Dependiente

- Efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*.

Independiente

- Extracto hidroalcohólico de *Psidium Guajava* L. “ Guayaba”

Operacionalización

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Hoja de <i>Psidium guajava</i> l. “guayaba”	Es un árbol de hoja perenne que mide entre 3 y 6m. (hasta 10 m.) de altura. ²⁴	Se elaboró extracto hidroalcohólico de <i>Psidium Guajava</i> “Guayaba”, a partir del cual se preparó 3 soluciones.	Concentración 2.25% Concentración 6.7% Concentración 9% Ciprofoxacino 5 mcg	Nominal
Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Produce la muerte o impide el crecimiento de la bacteria <i>S. aureus</i> . Se observa mediante la formación de halo de inhibición alrededor de cada Cepa. ²⁵	El efecto antimicrobiano evidenciado mediante el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Milímetros (mm)	Cuantitativa De razón

2.3. Población y muestra

Población: *Staphylococcus aureus* procedente de la escuela de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Psidium guajava “Guayaba” procedente del Jardín Botánico “Manuel Hernández” Del Distrito De Trujillo.

Muestra: Se utilizó 20 cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Se utilizó 530 g de hoja de *Psidium* “guajava” procedente del Jardín Botánico “Manuel Hernández” Del Distrito De Trujillo.

Unidad de análisis: Cada uno de los cultivos de *Staphylococcus aureus*

Método de muestreo: Para el caso de *Staphylococcus aureus* probabilístico, por lo que se evaluaron el crecimiento en cada placa Petri y para el caso de *Psidium* “guajava” no es probabilístico. Se considera por conveniencia.

Criterios de inclusión:

- Cultivo de *Staphylococcus aureus* viable obtenida del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Hoja de *Psidium* “guajava” Guayaba, obtenida del Jardín botánico “Manuel Hernández” del distrito de Trujillo.

Criterios de exclusión:

- Cultivo de *Staphylococcus aureus* contaminados.
- Hoja de *Psidium guajava* en mal estado.

2.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos

2.4.1. Técnica de recolección de datos

La técnica la que se utilizó para el trabajo de investigación fue la observación

2.4.2. Instrumento

Se utilizó una ficha de recolección de datos (anexo 02) que tuvo como finalidad recopilar los diámetros de los halos de inhibición en dichas concentraciones que se observaron en el laboratorio de la Universidad César Vallejo; la misma que por sus características no requiere ser validado.

2.5. Procedimiento

El procedimiento para la recolección de la información es la siguiente:

Recolección de la hoja de *Psidium* Guajava

Las hojas apicales de la especie *Psidium guajava* L. “Guayaba” fueron recolectadas del jardín botánico “Manuel Hernández” del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo y departamento de la Libertad. Luego fue llevado a la escuela de microbiología de la

Universidad Nacional de Trujillo para evaluar su taxonomía y contar con el certificado.

Procedimiento de la hoja de *Psidium guajava*

Se selecciona de acuerdo al estado fresco de la hoja sin contaminación y sin cortes, luego se lavó en agua potable a chorro, para retirar cualquier partícula extraña (tierra, polvo). Se procedió a desinfectar con hipoclorito a 100 ppm por 5 minutos, luego se enjuaga con agua destilada estéril para poder retirar el hipoclorito. Posteriormente se lleva al horno a una temperatura de 40° por 3 días. Se procedieron a moler las hojas secas con el molino de mano, se pesó el polvo obtenido para luego ser llevadas a la maceración.

Teniendo ya la hoja molida se pesó 216.4 g se coloca en un frasco color ámbar con 865.6 ml de solución de alcohol al 80°, estableciéndose una dilución ¼. Se dejó macerar por una semana a temperatura ambiente, posteriormente se filtra para obtener el extracto.²⁶

Preparación de las concentraciones de las diluciones

El extracto de hoja de *Psidium guajava*, se llevó a evaporación para obtener una mayor concentración. Luego se tomó una muestra para hacer su lectura de los grados Brix en un refractómetro ATC obteniéndose el valor de 9° Brix. A partir de dicho dato se preparan soluciones del extracto con concentraciones al 2.25 %; 6.7 % y 9 % en soluciones fisiológica.

Preparación del agar Mueller Hinton

El cultivo de *Staphylococcus aureus*, se obtuvo del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Se Preparó el medio a partir de la base deshidratada. Se autoclavó y se dejó enfriar en baño de agua hasta 45°C - 50°C. Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente.²⁷

Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo de *Staphylococcus aureus*. Se empleó el método directo de inoculación a partir de un cultivo joven de 18 horas de aislamiento en agar Manitol salado para *Staphylococcus aureus*, se preparó una suspensión directa de 5 ml de solución salina fisiológica, en lo que se obtuvo una turbidez que fue equilibrada a 1×10^8 UFC/ml. Utilizando el tubo N° 1 de nefelómetro de Mac Farland.²⁸

Inoculación de las placas

Dentro de 15 minutos de haber ajustado la turbidez del inóculo, luego se sumerge con un hisopo estéril varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo para remover el exceso del inóculo. Se inoculó a las placas de agar Muller Hinton (12 ml a 15 ml), estriando con el hisopo en 3 direcciones para asegurar una distribución uniforme. Se deja secar las placas en la estufa a 37°C por media hora para eliminar exceso de humedad antes de colocar los discos.²⁹

Prueba de susceptibilidad

Se empleó el método de Kirby Bauer, preparando disco de papel de filtro Whatman N° 42 de diámetro, en cada una de las diluciones (2.25 %, 6.7 % y 9 %) con ayuda de pinza de acero se presionó cada disco para asegurar el contacto de la superficie del agar Muller Hinton, se incubó las placas en posición invertida a 37° por 24 a 48 horas, luego de la incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición alrededor de cada disco utilizando Vermeer (regla milimetrada).³⁰

Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Se mide los diámetros de cada halo, haciendo girar en cruz, luego se interpreta los diámetros basados en las recomendaciones del Comité Nacional de Normas del Laboratorio (NCCLS) de la zona inhibición como sensible, intermedio y resistente. Todo este dato se registra en la ficha de recolección de datos³¹.

2.6. Método de análisis de datos

Finalmente, los datos fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Shapiro Wilk para la verificación de la normalidad de la muestra, determinándose que los datos no presentan distribución normal ($p < 0.05$) (Ver anexo n°04) por consiguiente se aplicó

la Prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis (ver anexo n° 04), a través del Programa SPSS versión 25.³²

2.7. Aspecto éticos

Se solicitó el permiso del uso del laboratorio de investigación de la Universidad Cesar Vallejo. Para la realización de la investigación se tuvo en cuenta las medidas de bioseguridad y protección del medio ambiente, personal y muestras frente a los riesgos que son ocasionados por el uso de sustancias químicas, agentes físicos, el uso y/o manejo de los materiales biológicos utilizado en los laboratorios establecidos³³.

III. RESULTADOS

Tabla 01 Diámetros de halos de inhibición en cultivo de *Staphylococcus aureus* por efecto de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de hoja de *Psidium guajava* (2,25 %; 6,7 % y 9 %)

Grupos (n=20)	Promedio de Diámetro de halo de inhibición ± desviación estándar (mm) en cultivo de <i>S.aureus</i> .
EHA <i>Psidium guajava</i> 2.25 %	0,00
EHA <i>Psidium guajava</i> 6,7 %	8,15 ± 0,745
EHA <i>Psidium Guajava</i> 9 %	12,25 ± 0,851
Ciprofloxacino 5 mcg	23,35 ± 1,137

Leyenda:

EHA; extracto hidroalcoholico de hoja de *Psidium Guayaba*

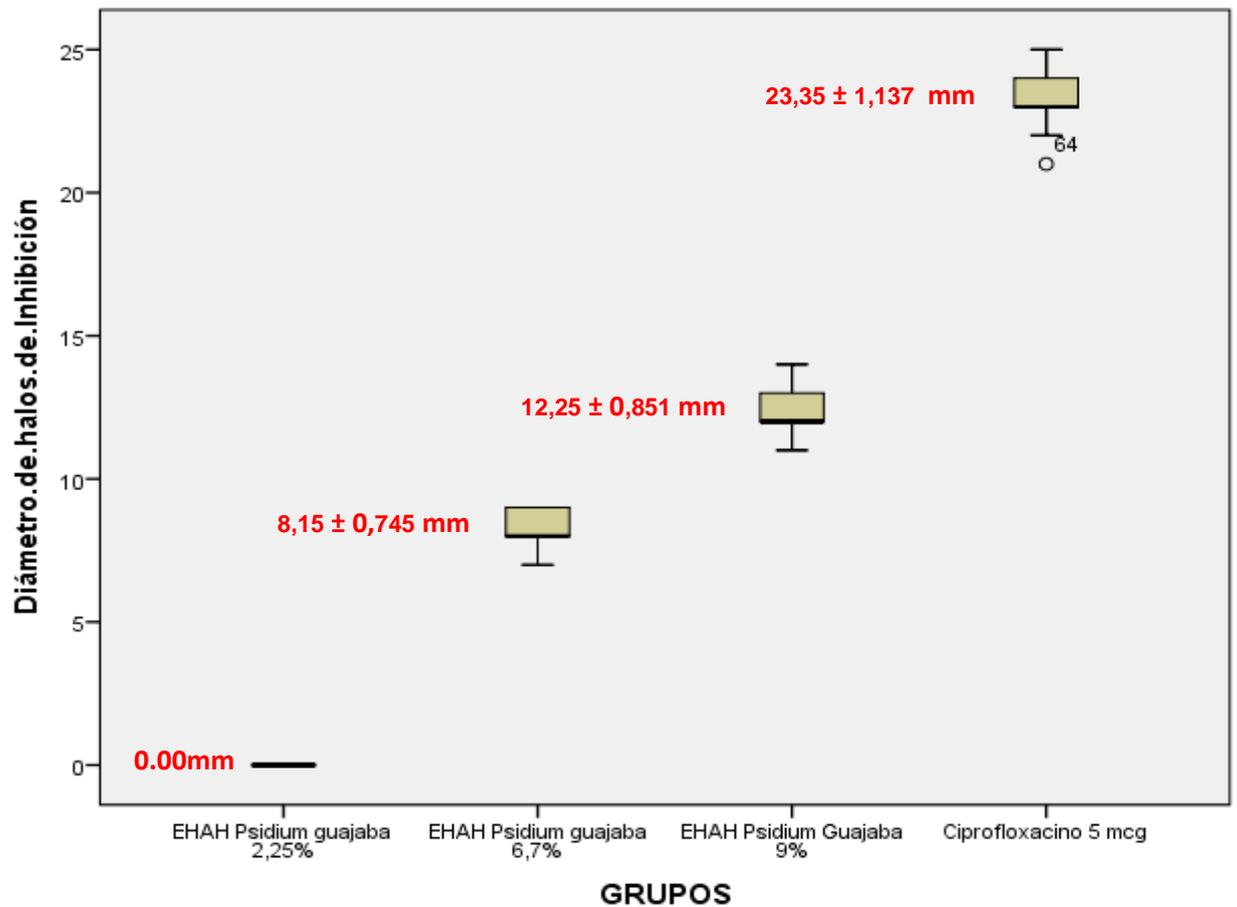


Figura 1. Comparación del efecto antimicrobiano de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava L* “guayaba” y el efecto antimicrobiano de ciprofloxacino en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Leyenda: EHA

Prueba Kruskal Wallis; $p < 0.05$; Los grupos difieren entre sí (Anexo N° 04)

IV. DISCUSIÓN

Esta investigación se propuso determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Psidium guajava* L “guayaba” frente a *Staphylococcus aureus*. A pesar de ser una planta reconocida por sus bondades farmacológicas no son muchos los estudios que se le han realizado para evaluar la actividad antimicrobiana.

En la tabla 1, los diámetros de los halos de inhibición en cultivo de *Staphylococcus aureus* por efecto de las concentraciones 2.25 %; 6,7 % y 9 % del extracto de hoja de *Psidium guajava* procedente del jardín botánico “Manuel Hernández” del distrito de Trujillo, 0,00; $8,15 \pm 0,745$ mm; $12,25 \pm 0,851$ mm respectivamente. En cuanto al diámetro del halo de inhibición en dicho cultivo producido por ciprofloxacino 5 mcg fue $23,35 \pm 1,137$ mm. Los resultados de la actividad antimicrobiano frente a *S. aureus* observados en la presente investigación con el extracto hidroalcohólico al 9 % es similar al de Carvalho⁵ quien reportó un diámetro de inhibición de 12 mm, por efecto del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Psidium guajava* “Guayaba” procedente de la comunidad "El Dorado" (Iquitos). En otros estudios como en el caso de Rathish y Chanda³⁴, se han utilizado extracto de metanol de hoja *psidium guajava* en donde la concentración de 25 mg/ml del extracto metanólico ha logrado alcanzar diámetros de halos de inhibición de 10 mm con cepas de *Staphylococcus aureus* y con concentración de 12.5 mg/ml alcanzo un diámetro de halo de inhibición 9 mm con dicha cepa. Siendo ambos menores han encontrado en el presente estudio en el extracto hidroalcohólico al 9 % que es equivalente a una concentración de 90 mg/ml

En la figura 1, se observa la comparación del efecto antimicrobiano de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de hoja de *Psidium guajava* y el control farmacológico donde ciprofloxacino tuvo efecto antimicrobiano más significativo en comparación con el extracto hidroalcohólico de la hoja de *Psidium guajava* al 9 %. El cual también tuvo efecto antimicrobiano en la concentración de 6.7 % ($P < 0.05$) y el extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* a la concentración de 2.25 % no presento efecto antimicrobiano ($p < 0.05$).

Según el Comité Nacional de Normas del Laboratorio (NCCLS) presenta estándares para evaluar prueba de sensibilidad de *Staphylococcus aureus*: ≥ 12 mm (sensible), 11 mm (intermedio) y < 10 mm (resistente). De esta manera el *Staphylococcus aureus* presenta una sensibilidad intermedia ante el extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* al 9 %. Para ciprofloxacino: ≤ 15 mm (resistente), 16 – 20 mm (intermedio), ≥ 21 mm (sensible)³⁵.

El efecto antibacteriano de la *Psidium guajava L.* se da por la presencia de flavonoides (morin-3-O-lixósido, morin-3-O-arabinósido, quercetina y quercetina-3-O-arabinosido) en la composición química, se cree que sus componentes tienen efecto sinérgico. La acción antibacteriana que realiza la quercetina como la guayaverina es la interrupción de la membrana celular y de la inactivación de proteínas intracelulares. Los taninos han recibido mucha atención en los últimos años. Debido a su modo de acción antimicrobiana puede estar relacionado con su capacidad para inactivar las enzimas, las proteínas de transporte de la envoltura celular, etc. También se combinan con los polisacáridos³⁶.

En otros estudios el extracto acuoso ha identificado compuestos fenólicos como: alcaloides, flavonoides, taninos y antioxidantes presentes en *Psidium guajava*, y que individualmente tiene actividad antimicrobiana³⁷.

El hecho que ciprofoxacino tenga mayor actividad se debe a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues súper helicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas. La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano, aunque no se conoce con exactitud porqué la inhibición de la DNA-girasa conduce a la muerte de la bacteria³⁸.

De esta manera se observa que el extracto hidroalcohólico del presente estudio tiene aproximadamente 50 % del efecto antimicrobiano de ciprofloxacino, sin embargo, se tendrá que seguir probando con mayor concentración y tener en cuenta el tiempo de maceración.

V. CONCLUSIONES

- ✓ El mayor efecto antimicrobiano de *Psidium* “guajava” Guayaba fue en la concentración de 9% frente a *Staphylococcus aureus*.
- ✓ El efecto antimicrobiano producido por las tres concentraciones 2.25 %, 6.7 % y 9 % del extracto hidroalcohólico de *Psidium guajava* L “guayaba” no alcanzaron el efecto antimicrobiano producido por ciprofloxacino en cultivo de *Staphylococcus aureus* ($p < 0.05$).

VI. RECOMENDACIONES

Realizar diferentes investigaciones sobre actividad antimicrobiana en corteza, fruto o tallo de *Psidium guajava* y con diferentes solventes orgánicos como: cloroformo, diclorometano o benceno ya que no hay muchos estudios con respecto a ello.

Continuar realizando investigaciones que promuevan la búsqueda de medicina alternativas que puedan servir como tratamiento para: dispepsia, edema, hipoglucemiante, diarrea, y además en la prevención del cáncer por su efecto antioxidante.

Se recomienda seguir realizando investigaciones referentes al efecto antimicrobiano del extracto de guayaba con otras concentraciones y frente a otras bacterias y que sirva como referente para la extracción de antimicrobianos naturales y para la elaboración de algún tipo de fitofármaco.

REFERENCIAS

1. Aldave Pajares A; Mostacero León José: Botánico Farmaceutica. Editorial Libertad. Lima, Perú.2014.
2. Alonso J: Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas. 2014. Editorial ISIS. Argentina.
3. Brack A: Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. 2009.
4. Bravo L: Farmacognosia. 2015. Editorial Elsevier. Madrid, España.
5. Martinez L, Bruneton J, Merino J, Aliaga M, Cotrina W, Sanchez K, et al. Método de estudio de sensibilidad microbiana. 2ª Edición. 2015. Editorial Acribia S.A.
6. Torres M, Diaz S, Cruz M, Pretell A, Garcia M, Hernández G, et al. Diarrheogenic Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology Reviews, USA; 2015. April, 11: (142-201). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC121379>
7. Oranday J, Lopez I, Hernandez G, Méndez M, García E, Corrales J, Polo M, et. al. Manual Práctico de Microbiología. Barcelona-España. Editorial MASSON S.A. 2015. (3): 45-195-122-124-127-128-129-130-131-208. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/6351/1/Rivera%20Suescun%20Guadalupe%20Tatiana.pdf>
8. Viera M, Laurence B, Parker K, Chávez R, Hernández J, Rodríguez H, et al. Actividad antimicrobiana en planta. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 12va edición. Año 2015.
9. Carvalho G, Taroco R, Seija V, Torres M, Macedo Y, Merino J, et al. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica. España (36): 663, 664. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
10. González K, Añanca E, Medina J, Toledo M, Herrera B, Florián R, et al. Efecto Antimicrobiano *In Vitro* del Extracto de Psidium guajava en Cepas de Staphylococcus Aureus. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica. Tacna, México. 2016.
11. Ruele G. El cultivo de la guayaba en Florida. Agric trop. 1964; 20: 555-564 Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2014.

12. Ochse J. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, Vol I. México: LIMUSA; 1976. Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2010.
13. Nwinyi Obinna C, Chinedu Nwodo S. and Ajani ola Yinka O. Evaluation of antibacterial activity of *Psidium guajava* and *Gongronema Latifolium*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 2(8), pp. 189-192, August. (2014)
14. Collière JP, Kaper J. Diarrheagenic Clin Microbiol Rev; (2014).11:142-201.
15. Álvarez L, Matinés E, Cabrera M, Damián J, Rodríguez H, Macedo, T, et. al. Efecto antibacteriano *in vitro* de *Psidium guajava* y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). Biosalud 2014; 4 (46-55).
http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%204_6.pdf
16. Antai S. Incidence of *Staphylococcus aureus*, extract the guayaba, coliforms and antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli* in rural wáter supplies in Port Harcourt Journal of Applied Bacteriology. Clinical Microbiology Reviews, USA; 1987. Apr; 62(4):371-5.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3298188>.
17. LeChevallier M. *the Psidium Guajava* in rural drinking- wáter. Applied and Environmental Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, USA; 1980. April; vol 39, (739-742).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291411/pdf/aem00234-0062.pdf> Glenn
18. Torres L. Organización Mundial de la Salud. El primer informe de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone en manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Ginebra. 30 de abril de 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
19. Ruiz J. Actividad Antifungica *In Vitro* y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Micro dilución de ocho plantas medicinales. *Senna reticulata* (Willd.) H.S. Irwin & Barneby. Lima – 2015.
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2590/1/Ruiz_qj.pdf
20. Martínez A. Quinonas y compuestos relacionados, Facultad de Química Farmacéutica, Medellín. Noviembre 2015
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonas.pdf>

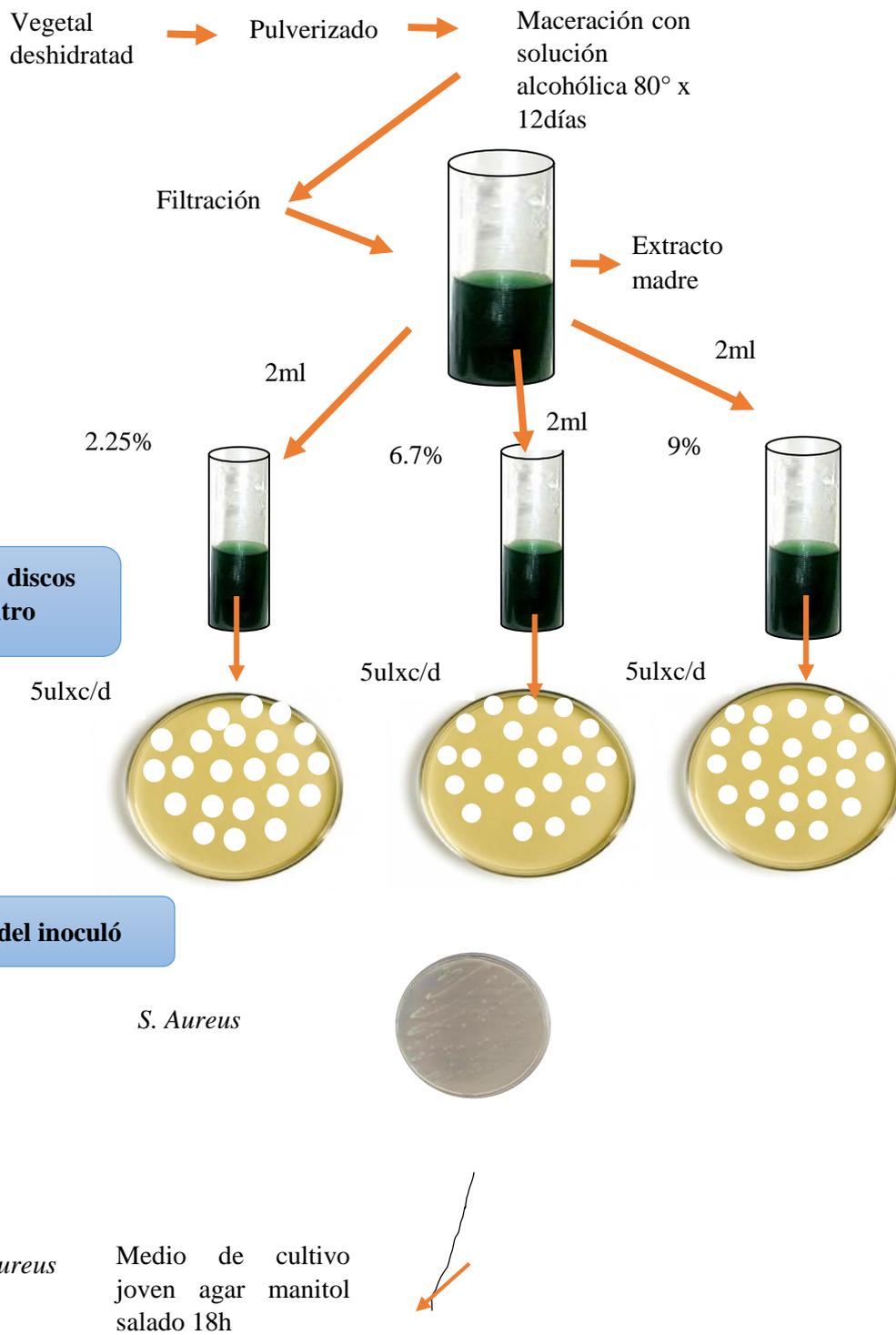
21. Lozoya X, Cañigüeral S. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. Revista de Fitoterapia 2008; 6 (Supl 1) 3-131. http://www.fitoterapia.net/revista/revista_sumarios.php?rev=6&num=6
22. Moran E. Efecto antibacteriano in vitro de Psidium guajava y Ludwigia polygonoides H.B.K. (Clavo de laguna). Biosalud 2005; 4 (46-55). http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%204_6.pdf
23. Laurence B, Parker K. Manual de farmacología y terapéutica. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 12va edición. Año 2010.
24. Taroco R, Seija V. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica. España (36): 663, 664. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>.
25. Definición ABC. Definición de plantas medicinales. <http://www.definicionabc.com/general/plantas-medicinales.php#ixzz3HPuIvFl>.
26. Lock O. Análisis Fitoquímico y metabolitos secundarios. Pontifica Universidad Católica del Perú. capitulo IV. <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>
27. Martínez A. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín. Septiembre 2009. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>.
28. Performance Standars for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standars Institute January 2015 http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. 2010; 27(1): 48-52.
30. Koneman EW, Allen SD. Diagnóstico Microbiológico. 5ta Edición. Editorial Médica panamericana S.A. Madrid.
31. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad Antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima Perú. 2002. (Citado 11 Octubre 2014). Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf.
32. Ministerio de Salud. Manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad por el método de disco difusión, Sistema de Gestión de calidad de PRONAHEBAS. Lima-

- Perú 2004. Disponible en:
[http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/MANUAL%20ODE% 20BIOSEGURIDAD.pdf](http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/MANUAL%20ODE%20BIOSEGURIDAD.pdf).
33. LeChevallier M, Seidler R. Environmental Microbiology, Clinical Microbiology Reviews, USA; 1980. April; vol 39, (739-742).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291411/pdf/aem00234-0062.pdf>.
 34. Ramirez A, Isaza G. Access to essential medicines: a global necessity. In: Essential drugs monitor 2003; 32. (12-13). Switzerland: World Health Organization.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502013000100007.
 35. WHO. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. Report of a WHO global survey. 30 June 2010.
http://www.who.int/medicines/technical_briefing/tbs/Technical_briefing_11_10.pdf.
 36. Flores M. Incidence of Staphylococcus aureus, coliforms and antibiotic-resistant strains of clostridium tetanie in rural wáter supplies in Port Harcourt Journal of Applied Bacteriology. Clinical Microbiology Reviews, USA; 1987. Apr; 62(4):371-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3298188>.
 37. Performance Standars for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standars Institute January 2015 http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf.
 38. Ramírez L, Marín D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica 2009; 42: 263-67.

ANEXOS

Anexo N° 01

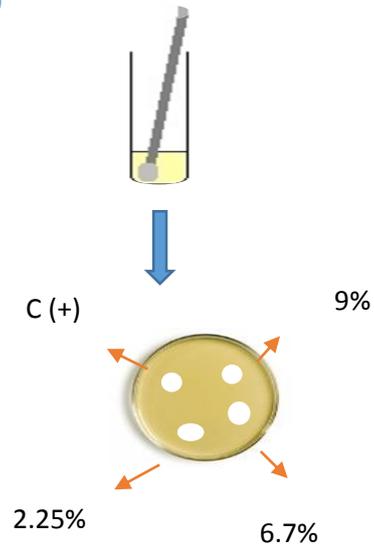
DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



2ml *ssf*

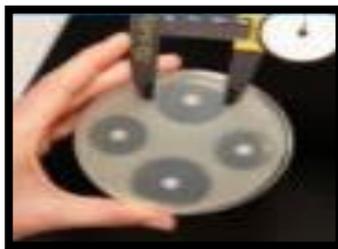


Siembra de la suspensión en placa de agar Mueller Hinton



Incubar a 37° x 24h a 48h

Lectura de placas e interpretación de los resultados



Anexo N°02

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos serán registrados en la siguiente ficha

Método empleado: Kirby Bauer

Cepa empleada: *Staphylococcus aureus*

Extracto Hidroalcohólico de Hoja de guayaba

PROMEDIO DE HALOS	DIÁMETRO DE HALO (mm)			CONTROL ANTIBIOTICO Ciprofloxacino (5 mcg)
	CONCENTRACIONES %			POSITIVO
	AL 2.25%	AL 6.7%	AL 9%	
1	0	9	12	23
2	0	9	13	23
3	0	8	12	23
4	0	8	11	21
5	0	7	13	22
6	0	7	13	22
7	0	8	14	25
8	0	8	14	25
9	0	9	12	23
10	0	9	11	24
11	0	9	11	24
12	0	9	13	24
13	0	9	12	25
14	0	8	12	25
15	0	8	12	23
16	0	8	12	23
17	0	8	12	23
18	0	7	12	23
19	0	7	12	22
20	0	8	12	24
PROMEDIO (\bar{X})	0	8.15	12.25	23.35

Fuente: Propia

Anexo n° 03

Determinación de inhibición de halos según la NCCLS:	
Resistente	≤10mm
Intermedio	11mm
Sensible	≥12mm

Fuente: NCCLS Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests

Anexo N°04

Pruebas de normalidad^a

	GRUPOS	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro.de.halos.de.Inhibición	EHAH Psidium guajaba 6,7%	,230	20	,007	,809	20	,001
	EHAH Psidium Guajaba 9%	,316	20	,000	,844	20	,004
	Ciprofloxacino 5 mcg	,221	20	,012	,910	20	,063

a. Diámetro.de.halos.de.Inhibición es constante cuando GRUPOS = EHAH Psidium guajaba 2,25%. Se ha omitido.

b. Corrección de significación de Lilliefors

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Diámetro.de.halos.de.Inhibición
Chi-cuadrado	75,724
Gl	3
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:

GRUPOS

Anexo N° 05

Procedimiento de la elaboración del efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de la hoja de *Psidium guajava*.



Hojas De *Psidium* Guajava
"Guayaba"



Lavado Y Clasificación De
Las Hojas De *Psidium*
Guajava "Guayaba"



Secado De Las Hojas De
Psidium Guajava "Guayaba"
Por 3 Días En El Horno



Moler Las Hojas De *Psidium*
Guajava "Guayaba"



Pesado De Las Hojas De
Psidium Guajava "
"Guayaba"



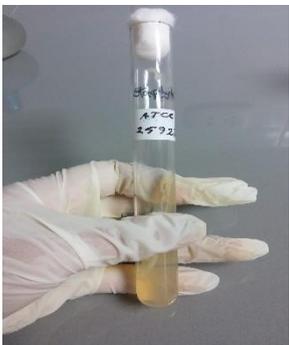
Maceración De Las Hojas
De *Psidium* Guajava
"Guayaba"



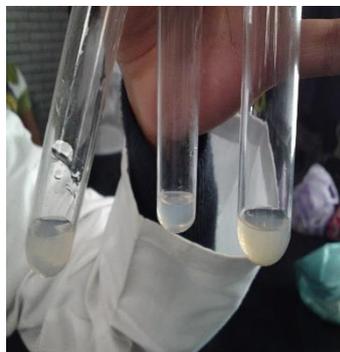
Filtrado De La
Maceración
Hidroalcohólico De Las
Hojas De *Psidium* Guajava
"Guayaba"



Evaporación En Baño
Amarilla Del Extracto
De Las Hojas De *Psidium*
Guajava "Guayaba"



Medio de cultivo



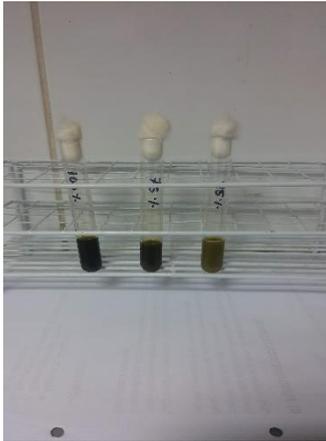
Agregar La Turbidez
Con Hisopo



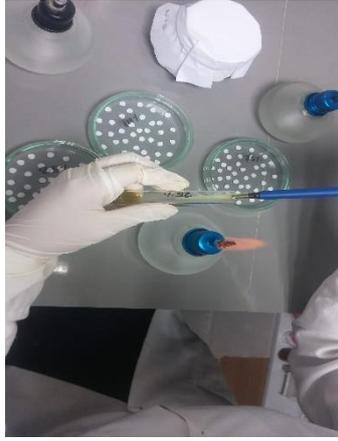
Sembrado En Las
Placas Petri



Placas petri con
medio de cultivo



Concentraciones De Las Diluciones Del Extracto De Hoja De Psidium Guajava "Guayaba"



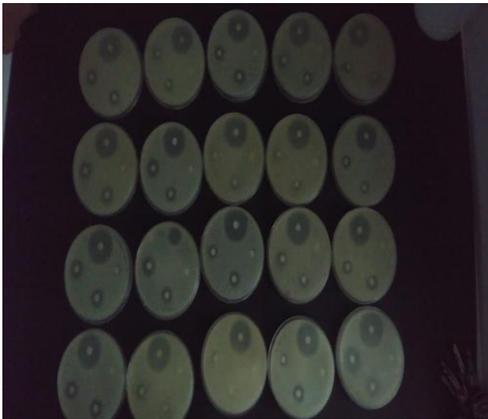
Agregado De Las Diluciones Con La Micropipeta



Colocar Los Disco De Papel De Tornsol



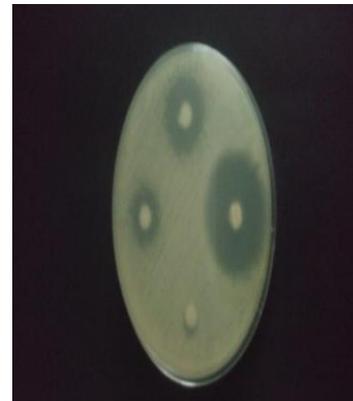
Colocar Las Placas Petri En El Horno Por 24h A 48h



Placas Petri Con Medio De Cultivo



Lectura del diámetro de Halo de inhibición



Resultado De La Actividad Antimicrobiano

