

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS PECUARIAS



**“EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE GUAYABA
(*Psidium guajava* L.), EN EL CONTROL DE LOS AGENTES
ETIOLÓGICOS DE LA MASTITIS EN EL ALTO HUALLAGA”**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

DURAND CHÁVEZ, Gerson Luís.

PROMOCIÓN 2007 - 1

Tingo María - Perú

2009

L73

D97

Durand Chavez, Gerson L.

Efecto del Extracto Etanólico de Hojas de Guayaba (*Psidium guajava* L.), en el Control de los Agentes Etiológicos de la Mastitis en el Alto Huallaga. Tingo María, 2009

39 h.; 8 cuadros; 32 fgrs.; 21 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Zootecnia.

PSIDIUM GUAJAVA L. / AGENTES ETIOLÓGICOS / ENFERMEDAD
/ EXTRACTO ETANÓLICO / ETIOLOGÍA - MASTITIS / TINGO
MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE ZOOTECNIA**

Av. Universitaria Km. 2 Teléfono: (062) 561280
TINGO MARÍA

"Año de las Cumbres Mundiales del Perú"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 30 de diciembre del 2008, a horas 7:00 p.m. para calificar la tesis titulada:

Efecto del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) en el control de los agentes etiológicos de la mastitis, en el Alto Huallaga.

Presentada por el bachiller **GERSON LUIS DURAND CHAVEZ**; después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobada con el calificativo de **"MUY BUENO"**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el **TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título, de conformidad con lo establecido en el Artículo 95, inciso "i" del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 30 de diciembre del 2008

M.Sc. TEODOLFO VALENCIA CHAMBA
Presidente



Ing. LAURIANO ZAVALETA DE LA CRUZ
Miembro

(Ausente)

M.Sc. MEDARDO DIAZ CESPEDES
Miembro

Méd. Vet. LISANDRO TAFUR ZEVALLOS
Miembro

DEDICATORIA

Esta página se la dedico primeramente a Dios, ya que sin Él nada podemos hacer. Dios es quien nos concede el privilegio de la vida y nos ofrece lo necesario para lograr nuestras metas. GRACIAS DIOS, Gracias de todo corazón por permitirme llegar hasta aquí.

También le dedico esta página a mis padres, porque ellos siempre están aquí en las buenas y en las malas; me educan, me aconsejan, me imparten valores para conducirme correctamente y me ofrecen el sabio consejo en el momento oportuno.

Además dedico esta página a mis hermanos, son los mejores del mundo a mis tíos y primos. Y a todas aquellas personas que me apoyan, que siempre están conmigo en las buenas y en las malas; y no solamente a los que me apoyan, sino también para todo aquel que se pueda beneficiar de este trabajo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS creador del universo, que me dió y me seguirá dando fortaleza para seguir adelante todos los días. Agradezco a mi familia que siempre esta presente con mis ideas, y jugó un papel muy importante en la toma de decisiones, su apoyo fue de suma importancia especialmente mi padre Sr. Floriano Durand Inocente, y mi madre Sra. Jacinta Chávez de Durand, mis hermanos River y Diana, mis tías sra. Alberta Chávez Sabino, Marcelina Chávez Sabino y mis primos Marleny Durand Chávez, Joel Lliuya Cháves.

No puedo dejar de mencionar las siguientes personas que me brindan su apoyo, tiempo, y experiencia sin ningún tipo de interés.

- Ing. Msc. Miguel Angel Perez Olano
- Med. Vet. Lisandro Roger Tafur Zevallos
- Med. Vet. Teodolfo Valencia Chamba
- Ing. Msc. Medardo Dias céspedes
- Ing. Lauriano Zavaleta de la Cruz
- Laboratorista. Félix Ramirez Vega

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades de la mastitis.....	3
2.1.1 Agentes etiológicos.....	3
2.1.2 Epidemiología.....	4
2.1.3 Patogenia.....	5
2.1.4 Signos clínicos.....	8
2.1.5 Diagnóstico.....	8
2.1.6 Prevención y control.....	10
2.1.7 Tratamiento.....	11
2.2 Generalidades de la guayaba (<i>Psidium guajava</i>).....	12
2.2.1 Taxonomía.....	11
2.2.1 Distribución y origen.....	12
2.2.3 Habitad.....	13
2.3 Uso de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.), en Medicina Veterinaria...	14
2.3.1 Farmacología.....	14
2.3.2 Composición química.....	15
2.3.3 Farmacognosia.....	16
2.4 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	17
2.4.1 Destrucción e inactivación del antibiótico.....	17
2.4.2 Barreras de permeabilidad.....	18
2.4.3 Alteración del sitio blanco.....	18

2.4.4	Bases genéticas de la resistencia.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1.	Lugar y fecha de ejecución del trabajo.....	20
3.2	Tipo de investigación.....	21
3.3	Población y muestra.....	21
3.4	Cepas bacterianas.....	21
3.5	Médios de cultivo.....	21
3.6	Controles.....	22
3.7	Material vegetal.....	22
3.8	Obtención del extracto etanólico.....	22
3.9	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	23
3.10	Variables independientes.....	24
3.11	Tratamientos.....	24
3.12	Análisis estadístico.....	2
3.13	Variables dependientes.....	25
IV.	RESULTADOS.....	26
4.1.	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	26
4.2	Valor de disolución del extracto etanólico.....	28
V.	DISCUSIÓN.....	31
5.1	Evaluación de la actividad antibacteriana.....	31
5.2	Valor de disolución del extracto etanólico.....	32
VI.	CONCLUSIÓN.....	34
VII.	RECOMENDACIONES.....	35

VIII. ABSTRACT.....	36
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	38
X. ANEXO.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L., frente a los principales agentes etiológicos de la mastitis (diámetro del halo expresado en mm).	27
Cuadro 2. Nivel de significancia del valor de disolución en porcentaje ajustado con la formula $\sqrt{X+1}$	29
Cuadro 3. Datos obtenidos de la medición del diámetro de halos encontrados en cada tratamiento expresado en mm.	43
Cuadro 4. Datos ajustados con la formula $\sqrt{X+1}$ para ser procesados en un diseño completamente al azar.	44
Cuadro 5. ANVA de un diseño completamente al azar de la actividad antibacteriana del extracto etanolico de <i>Psidium guajava</i> L., frente a <i>staphylococcus aureus</i> (diámetro del halo expresado en mm).	44
Cuadro 6. Comparación media de cuadrados mínimos de cepas de <i>staphylococcus aureus</i> por concentraciones.	45
Cuadro 7. ANVA de un diseño completamente al azar de la actividad antibacteriana del extracto etanolico de <i>Psidium guajava</i> L., frente a <i>Streptococcus agalactiae</i> , (diámetro del halo expresado en mm).	45
Cuadro 8. Comparación media de cuadrados mínimos de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> por concentraciones.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L., frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	29
Figura 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> L., frente a <i>Streptococcus agalactiae</i> .	30

RESUMEN

El experimento se realizó en el laboratorio de sanidad animal de la facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, de Tingo Maria, departamento de Huánuco - Perú. Con el objetivo de evaluar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Huallága. Se estudió la actividad antibacteriana de un extracto etanólico a disoluciones de 10, 20, 30 y 40%. Se utilizó cepas de microorganismos que incluyen: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en agar. Como control negativo se utilizó una solución de etanol al 10%, como controles positivos se empleó Estreptomicina (10 mg/ml) para gram positivas y Levofloxacin (4 mg/ml) para gram negativas. Los resultados indican una efectividad antibacteriana de 53% respecto al control positivo con la disolución 30% y frente a *Streptococcus agalactiae* se encontró una efectividad de 83% respecto al control positivo con la disolución 30% y un ausente efecto antibacteriano en todas las disoluciones evaluadas ante *Escherichia coli*.

Palabras claves: guayaba (*Psidium guajava*), extracto etanólico, mastitis, actividad antibacteriana, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, mortalidad bacteriana.

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis se considera como una enfermedad compleja y es producto de la interacción de varios factores en el animal: el medio ambiente, los microorganismos y participando el ser humano en un papel decisivo. Los cálculos mundiales recientes han revelado que esta patología representa el 30% del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero y se estima que un tercio de todas las vacas lecheras en el mundo están afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos (PHILPOT, 2000). En ese contexto las principales bacterias involucradas en la mastitis en la zona del Alto Huallága son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* (MURRIETA, 2002).

Los microorganismos patógenos, tradicionalmente se combaten con antibióticos que se aplican en variadas concentraciones según el patógeno específico. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para abrir un espacio importante en la medicina natural en aras de una terapia libre de residuos farmacológicos tóxicos. Por lo tanto, la utilización de plantas medicinales como el *Psidium guajava* L., conocido popularmente como guayaba, de la familia Mirtaceae, se ha usado tradicionalmente como antidiarreico en muchos países de América y África.

Las aplicaciones medicinales de los ingredientes activos de *Psidium guajava* L., son: los flavonoides, carotenoides y terpenoides; que se emplean en la medicina herbolaria para combatir diferentes enfermedades como antibacteriano, antiséptico, astringente, antidisentérico. A los flavonoides se le atribuye la propiedad antibacteriana. Con esta investigación se requiere averiguar ¿Cuál es la efectividad del extracto etanólico de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Huallaga?. Por el alto contenido de flavonoides el extracto etanólico de las hojas maduras de guayaba (*Psidium guajava* L.), produce alta mortalidad de los agentes etiológicos de la mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*).

Objetivos:

- Evaluar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Huallaga.
- Determinar el valor de disolución del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Huallaga.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de la mastitis

2.1.1. Agentes etiológicos

Los patógenos causantes de la mastitis, desde el punto de vista epidemiológico se han clasificado en los siguientes tres grupos, de acuerdo a su origen y forma de transmisión en el rebaño: Patógenos Contagiosos, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, y *Corynebacterium bovis*; Patógenos Ambientales, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Arcanobacterium pyogenes* y muchos otros agentes y Patógenos Oportunistas, *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus intermedius* y muchas otras especies de estafilococos, que forman parte de la flora normal de piel(SCARAMELLI y GONZÁLEZ, 2000).

2.1.2. Epidemiología

La mastitis esta distribuida muy ampliamente en todas las explotaciones lecheras. Las especies afectadas son cualquier hembra de mamífero, pero sobretodo es importante económicamente en especies lecheras derivadas al consumo humano. La edad puede ser cualquiera, pero hay más incidencia conforme aumenta la edad. La transmisión se hace a través de dos vías: a través del canal del pezón o a través de heridas. La fuente de contaminación principal no es la leche, sino fecal, piel, fosas nasales. La morbilidad es según los diferentes factores puede ser muy elevada o muy baja. La letalidad va en función del tipo de microorganismo. Los hay no letales y otros muy letales, por septicemia. Si la mastitis es muy crónica, pero no hay septicemia, sólo puede llegar a perder definitivamente el cuarto afectado, pero nunca la muerte del animal (ZURITA, 1982).

SANTISTEBAN (1976) afirma que existe una incidencia alta de bacterias comprometidas en la mastitis bovina en la provincia de Leoncio prado siendo las más importantes *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (MURRIETA, 2002) los agentes etiológicos causantes de la mastitis subclínica en ganado lechero en la zona de Tingo maría y Aucayacu son: *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*.

2.1.3. Patogenia

El proceso de infección de la glándula mamaria en más del 99% de los casos se produce por vía del conducto del pezón. Los numerosos agentes patógenos llegan a la glándula principalmente a través de las manos del ordeñador, pezoneras, paños sucios y otros. Estos se localizan de preferencia en la punta del pezón, donde comienzan su colonización (ZURITA, 1982).

A. Invasión del pezón

La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño. Los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño (desprendimiento o pérdidas de la unidad o remoción de la pezonera sin haber antes cerrado el vacío). Luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto. Los organismos del ambiente (materia fecal, cama, etc.) o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal (INFOCARNE, 2006).

B. Establecimiento de la infección e inflamación del área dañada

Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y colonizando nuevos tejidos; otras pueden moverse por medio de la corriente de leche producida por el movimiento de la vaca. Las bacterias dañan primero los tejidos que recubren los grandes tubos colectores de leche. Las bacterias pueden enfrentarse con leucocitos (células blancas de la leche) presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche. Estas células son la segunda barrera de defensa debido a que pueden englobar y destruir a las bacterias. Aún así, durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche (INFOCARNE, 2006).

Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección. Ellos penetran el tejido alveolar en gran medida moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado. Los fluidos, minerales y factores de coagulación también se mueven dentro del

área infectada. La leche coagulada también puede cerrar conductos y, en efecto, aislar las regiones infectadas (INFOCARNE, 2006).

C. Destrucción del tejido alveolar

Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se aclara. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna normal. Aún así, a medida que la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso y el alvéolo comienza a reducir su tamaño. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo y cicatriza. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control. Por lo tanto a medida que la enfermedad progresa el número de células somáticas en la leche se eleva y se asocia con una reducción en la producción de leche (INFOCARNE, 2006).

2.1.4. Signos clínicos

La mastitis clínica se caracteriza por los cambios visibles en la ubre y en la leche. Las manifestaciones agudas con inflamación de la ubre se torna dura, dolorosa y caliente, la leche con aspecto purulenta o sanguinolenta. La fase crónica, cuando no es bien tratada la forma aguda, el tejido glandular de la ubre es reemplazado por tejido fibroso. Inicialmente la leche se nota con grumos, en los días siguientes estos se van haciendo más grandes hasta obstruir por completo el canal del pezón. El cuarto afectado esta ligeramente hinchado, caliente y muy sensible. Mas tarde, al cabo de unos cuatro días, es difícil ordeñar el cuarto enfermo porque el canal del pezón se encuentra tapado completamente por masas caseosas de color amarillento o rojizo y no es raro que se presente una septicemia (paso de los microbios a la sangre), que determina rápidamente la muerte de la vaca enferma (CEBA, 1998).

2.1.5. Diagnóstico

Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer debido a las evidentes alteraciones que ocurren en la glándula mamaria y su secreción. Para el diagnóstico de los casos subclínicos se requiere aplicar pruebas especiales, a fin de confirmar la presencia de un proceso inflamatorio (SCARAMELLI y GONZÁLEZ, 2000).

A. Conteo de las células somáticas

Uno de los cambios más precoces es el aumento en el número de células somáticas que normalmente es menor a 200.000 cél/ml y que durante el proceso inflamatorio supera las 500.000 cél/ml (SCARAMELLI y GONZÁLEZ, 2000).

B. Prueba para mastitis de California (MCT) y la prueba para mastitis de Wisconsin (MWT)

El CMT es una prueba de campo económica, sencilla y rápida, que detecta con buena sensibilidad y especificidad el estado de salud de la ubre, mediante una estimación gruesa del contenido de células somáticas. Se basa en la gelificación que tiene lugar cuando el ADN es liberado de las células somáticas presentes en la leche por la acción de un detergente aniónico como el alkyl-aril-sulfonato de sodio; por tanto, a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación (SCARAMELLI y GONZÁLEZ, 2000).

C. Cultivo Microbiológico.

Es la única prueba que permite identificar los agentes causales presentes en la finca, así como los cuartos y animales

infectados. Esta información permite diseñar o modificar programas de control, identificar los factores predisponentes, establecer la dinámica epidemiológica en la finca, evaluar la efectividad de las medidas de control y orientar la estrategia terapéutica. Las muestras de leche de cuartos individuales o muestras compuestas de los cuatro cuartos, pueden obtenerse en cualquier momento, pero se recomienda hacerlo inmediatamente antes o después del ordeño. Todos los casos clínicos deben ser sistemáticamente cultivados (SCARAMELLI y GONZÁLEZ, 2000).

2.1.6. Prevención y control

Para evitar la mastitis, se necesita saber los pasos correctos de ordeño como son: ordeñar primero las vacas sanas y finalmente las vacas con mastitis, se necesita tener las manos limpias, quite toda la suciedad de la ubre con una toalla limpia, ordeñe la vaca completamente, después de ordeñar sumerja los pezones en la solución de yodo, no se mantenga en una área mojada o sucia a la vaca, después de ordeñar la vaca no debe acostar, esto ayuda a los pezones a cerrarse. Por lo que hay que darle comida y agua suficiente a la vaca para impedir que se acueste (JUSTEN, 2001).

Un programa eficaz puede ser disminuyendo la duración de la infección tratando todos los cuartos de todas las vacas en período seco,

tratar los casos clínicos a medida que se presentan y descubrir los casos clínicos crónicos. Así mismo reducir el índice de infecciones nuevas lavando los pezones después de cada ordeño, mantener el equipo de ordeño limpio antes y después del ordeño, lavar las ubres antes y después de cada ordeño. Las ubres de los animales deben lavarse para evitar el barro y las heces fecales. Además, el ordeñador debe tener las manos limpias (CEBA, 1998).

2.1.7. Tratamiento

La forma clínica aguda debe ser tratada con antibiótico del tipo de la penicilina, estreptomina, vicarpen o espiromicina UNIMAST, aplicado por vía intramuscular y repetir la aplicación a las 24 horas. Según su gravedad por tres a cuatro días seguidos, debe hacerse énfasis en el aseo y vaciado previo de cada cuarto, antes del tratamiento. En la forma crónica inyectar intramamariamente durante 3 días seguidos oxitetraciclina, vicarpen, panamicina L.A o UNIMAST en dosis de 10 ml y secar el cuarto afectado. Si la vaca sufre de fiebre, es necesario aplicar en dosis altas vicarpen, panamicina L.A u oxitetraciclina asociada con antiinflamatorio antiprostaglandínico como el fadyne A4 vía intramuscular, durante 2 días (CEBA, 1998).

2.2. Generalidades de la guayaba (*Psidium guajava* L.)

2.2.1. Taxonomía

Nombre científico: *Psidium guajava* L., Arbusto perennifolio o caducifolio de 3 a 10 m de altura. Copa irregular con hojas decusadas simples, oblongas o elípticas, de color verde brillantes a verde pardusca; de olor fragante cuando se estrujan. Tronco generalmente torcido y muy ramificado. Ramas gruesas, ascendentes y retorcidas. La corteza externa es escamosa en piezas lisas, delgadas e irregulares, internamente fibrosa, de color crema rosada o parda rosado, grosor total: 5 a 8 mm. Las flores son dulcemente perfumadas, actinomorfas; sépalos en número de 4 a 5 de coloración verde en el exterior y blanco en el interior; pétalos de 4 a 5 de color blanco. Los frutos o bayas hasta de 8 cm de diámetro, ovoides, carnosas, de color crema amarillento a rosado, de olor fragante y sabor agri dulce. Cáscara exterior fina de color amarillo. El fruto contiene numerosas semillas. Sistema radical superficial. Sexualidad: hermafrodita (RODRÍGUEZ *et al.*, 1991).

2.2.2. Distribución y origen

Psidium guajava L., tiene su origen en Mesoamérica. Fue propagada por los españoles y portugueses a todos los trópicos del mundo donde se ha naturalizado con ayuda de los pájaros. Actualmente se

extiende desde México y Centroamérica, hasta Sudamérica, en específico Brasil y Perú, en las Antillas y el sur de Florida. Su área ecológica se encuentra en la franja paralela al Ecuador, con límites que no van más allá de los 30° de cada hemisferio. Siglos atrás fue llevada a África, Asia y la India y actualmente se le encuentra en más de 50 países con clima tropical. En Hawaii, la guayaba crece en franjas desérticas con precipitaciones menores a 250 mm (RODRÍGUEZ *et al.*, 1991).

2.2.3. Habidad

Común a la orilla de los caminos y cerca de casas dónde constituye a veces una verdadera plaga. Habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos, secos y templados. Las plantaciones comerciales se encuentran en climas tropicales secos, con temperaturas promedio de 18°C, precipitación anual de 600 mm y altitud entre 150 a 600 m. La temperatura adecuada para su desarrollo está entre los 15 y 30°C, aunque puede tolerar hasta 45°C. Los requerimientos pluviales se encuentran entre 1000 y 2000 mm. Se han encontrado plantas donde las precipitaciones alcanzan 5000 mm anuales. La especie tolera diversas condiciones de suelo, pero produce mejor en suelos bien drenados, con abundante materia orgánica y un pH de 4,5 a 7,5. Es tolerante a suelos ácidos y alcalinos (pH de 4.5 a 9.4), Se presenta principalmente en suelos con problemas de drenaje, tanto de origen calizo como metamórfico e ígneo (RODRÍGUEZ *et al.*, 1991).

2.3. Uso de Guayaba (*Psidium guajava* L.), en Medicina Veterinaria

2.3.1. Farmacología

La tintura de hoja de *Psidium guajava* L., inhibe al 80% de las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* (RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ y MORÓN, 1999). Se ha comprobado la actividad antimicrobiana de un extracto salino contra *Escherichia coli* (Napralert. Illinois, USA, 1990. Citado por MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997).

El extracto fluido en etanol al 40%, de hojas de *Psidium guajava* L. (procedente del Instituto de Farmacia y Alimentos), presenta actividad antimicrobiana por debajo del 50% respecto al control positivo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997), superior a la reportada para el extracto de acetona n-hexano e hidroalcohólico (Napralert. Illinois, USA, 1990. Citado por MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997), pero inferior al extracto metanólico (Cáceres, citado por MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997).

VINENT y ORTIZ (2003) realizaron una investigación en la unidad de tropas guarda fronteras Minint de Cuba. Se utilizaron un total de 80 crías porcinas entre las edades de 7 - 33 días y con un peso entre 2 – 5 kg dividido en 6 grupos; estando afectadas por colibacilosis y candidiasis. Estas fueron sometidos a diferentes tratamientos con antibioterapia por vía parenteral y medicina tradicional (tintura de guayaba y manzanilla) por vía

oral, obteniéndose la recuperación del 87.5% contra la *Candida* y el 75.0% contra la *E. coli*.

El extracto metanólico de *Verbesina encelioides* presentan actividad antimicrobiana especialmente sobre microorganismos gram positivas y *Candida albicans*, ya que el extracto fue más eficiente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, que contra bacterias gram negativas. Estos resultados, entre otros, aportan evidencia que nos permitirá continuar con los estudios tendientes a purificar la muestra e intentar aislar los principios activos (TORIBIO *et al.*, 2005)

2.3.2. Composición química

Los compuestos químicos aislados de la hoja de guayaba, son: un triterpenoide pentacíclico, el ácido guajanoico, así como, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico. Así mismo, taninos (hojas 9 a 10%, corteza 12 al 30%). polifenoles, carotenoides, vitamina C, compuestos volátiles y aromáticos, terpenos, glicosidos esteroidales, antraquinonas, flavonoides, quercitinas. el ácido psidiólico tiene actividad antiprotozoarica. La actividad antibacteriana se atribuye a los flavonoides (ECHEMENDÍA Y MORÓN, 2004).

En varias especies los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja y sitios de

ubicación (Kause *et al.*, 1999; Keinanen *et al.*, 1999; Laitenen *et al.*, 2000. Citado por VARGAS, 2006). Los flavonoides aumentan conforme avanza el desarrollo de la hoja (Cates, 1987. Citado por VARGAS, 2006). Las diferentes fuentes de flavonoides son de origen vegetal y se encuentran principalmente en las hojas (Seshadri y Vasishta, 1965; Lozoya *et al.*, 1994; Meian y Mohamed 2001. Citado por VARGAS, 2006). Los flavonoides están presentes también en partes anatómicas como corteza (Ross, 1999. Citado por VARGAS, 2006), yemas florales (Harborne, 1984. Citado por VARGAS, 2006).

2.3.3. Farmacognosia

Las partes a utilizar son: hojas, frutos y corteza secos. La quercetina presente en hojas y corteza tienen acción antisecretoria de acetilcolina en intestino. Por su contenido de taninos y su actividad astringente es efectiva en el tratamiento de la diarrea. A los flavonoides presente en las hojas, se le ha atribuido el efecto antidiarreico (ECHEMENDÍA Y MORÓN, 2004). Entre sus componentes químicos se encuentra la vitamina C2 que es muy abundante en los frutos, en las hojas hay flavonoides como quercetina, aviculatina y guaijaverina a los que se les atribuye el efecto antimicrobiano (LUTTERODIT, 1992).

2.4. Mecanismos de resistencia bacteriana

2.4.1. Destrucción e inactivación del antibiótico

La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importante es la β -lactamasa y muchas bacterias son capaces de producirlas. En las gram positivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, la tetraciclina y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas (DAZA, 1998)

La inactivación se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico. Sabemos que los antibióticos, β -Lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporina, actúan inhibiendo la enzima D-alanil D-alanin carboxipeptidasa (PBPS) encargada de la síntesis de la pared. La β -lactamasa hidroliza el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producida por bacterias gram negativas (LÁÑEZ, 1998).

2.4.2. Barreras de permeabilidad

Las barreras incluye tres componentes básicos: La estructura de la membrana externa de la bacteria; Las porinas, que son canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular; características fisicoquímicas del antimicrobiano, en el caso de los medicamentos hidrofílicos requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula (SUSSMANN; MATTOS y RESTREPO, 2002).

La resistencia a los β -lactámicos en los gérmenes gram negativas es el resultado de mutaciones que modifican la estructura o función de proteínas de membrana denominadas porinas. Estas proteínas, ubicadas en la membrana externa de los gram negativas, promueven el transporte de los antibióticos hidrofílicos a través de la bicapa lipídica. De tal forma la membrana se torna impermeable a los antibióticos (GOLD y MOELLERING, 1996)

2.4.3. Alteración del sitio blanco

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular. De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia al β -lactámicos dado que es esta enzima su sitio de acción. Respecto a las demás estructuras

ribosomales encontramos modificaciones a nivel de múltiples subunidades como 30s, 50s. Sitios de acción de aminoglucósidos, lincosamidas, y tetraciclinas. El mecanismo de resistencia (ribosomal) a gentamicina, tobramicina y amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido 12s de la subunidad 30s (GOLD y MOELLERING, 1996).

2.4.4. Bases genéticas de la resistencia

Una cepa bacteriana puede volverse resistente a un antibiótico por dos tipos principales de mecanismos: por mutación en un gen cromosómico y por introducción de un plásmido R de resistencia. Este segundo mecanismo supone el problema más serio, ya que está muy extendido; puede conferir resistencia a varios antibióticos a la vez. A diferencia del mecanismo mutacional, no suele suponer una desventaja adaptativa (no disminuye la tasa de crecimiento de la bacteria ni le hace perder sus propiedades de virulencia) (LÁÑEZ, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y fecha de ejecución del trabajo

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de sanidad animal de la facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), que se encuentra ubicada en la ciudad de Tingo Maria, en el departamento de Huánuco, provincia de Leoncio prado y distrito de Rupa rupa, con altitud de 660 msnm, a 09° 17' 03" de latitud sur y latitud oeste de 76° 01' 07".

La topografía de la ciudad es ligeramente accidentada, ecológicamente considerada como bosque pre-montano tropical muy húmedo, en promedio presenta una temperatura media anual de 24.5°C, con humedad relativa de 80.5%, y precipitación pluvial media anual de 3220 mm, distribuidos con mayor intensidad en los meses de noviembre a marzo.

El presente trabajo de investigación tuvo una duración de 3 meses; agosto, septiembre y octubre del 2008.

3.2. Tipo de investigación

La investigación es del tipo experimental

3.3. Población y muestra

La población fueron las cepas bacterianas de: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. La unidad muestral empleada fue 1/6 de la placa petri con cultivo bacteriano.

3.4. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana fueron adquiridas del laboratorio de sanidad animal de la facultad de Zootecnia, UNAS. Estas fueron aisladas de leche de vacuno en estado de mastitis clínica y subclínica, siendo las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

3.5. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron medios enriquecidos que permiten el crecimiento del microorganismo sin dificultad. Se utilizó medio antibiótico Mueller Hinton, esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 min.

3.6. Controles.

Como control negativo se utilizó una solución de etanol al 10%. En el caso de los controles positivos se empleó discos de sensibilidad estreptomicina (10 mg/ml) para las bacterias gram positivas y levofloxacina (4 mg/ml) para la bacteria gram negativa.

3.7. Material vegetal

Se utilizó 500 g de hojas frescas de guayaba (*Psidium guajava* L.), recolectadas del campus UNAS en horas de la mañana (9:00 am), en un clima nublado lluvioso. Las hojas fueron fisiológicamente maduras, seleccionadas por su ubicación en la rama: las más cercanas al tallo, por su coloración verde oscura, por su sanidad fisiológica e integridad de la hoja.

3.8. Obtención del extracto etanólico

las hojas maduras de guayaba obtenidas, fueron secadas en una estufa a 55°C por un periodo de 48 horas, luego se pesó 100g de hojas secas, las cuales fueron maceradas en 2 litros de etanol 96° en un frasco cerrado herméticamente, por un periodo de 40 días. Después de transcurrido ese tiempo, la solución obtenida fue filtrada con gaza y luego vertido en 20 recipientes de material plástico de 100 ml, luego se llevó a estufa por un periodo de 48 horas a una temperatura de 45°C, luego de ese periodo de

tiempo se retiró los recipientes que contenían la solución, resultando un caramelo de extracto etanolico. El caramelo fue molido en un mortero, obteniéndose así el extracto etanolico de hojas maduras de guayaba en polvo.

3.9. Evaluación de la actividad antibacteriana.

Las bacterias fueron inoculadas en el medio agar Mueller Hinton, previamente fundido, solidificado y mantenido a 45°C. El inóculo permitió un crecimiento en césped con una alta concentración de bacteria/ml. Luego de la inoculación en el medio, se colocó 6 perforaciones dobles de papel filtro de 6 mm de diámetro, donde se vertió las disoluciones del extracto etanólico a evaluar, igual fue para los controles negativos; los discos de sensibilidad para Los controles positivos fueron adquiridos del laboratorio clínico UNAS. Las placas con diámetro de 12 cm fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y después fueron evaluados los resultados mediante la lectura en milímetros del diámetro del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo y el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se realizó con la formula siguiente, (MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997).

$$\% \text{ efectividad de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo inhibido del extracto}}{\text{diámetro del halo inhibido del control positivo}} \times 100\%.$$

3.10. Variables independientes

- Extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.).
- Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*.

3.11. Tratamientos

Extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*), en disoluciones de:

T₁ = 10% extracto etanólico (2.5 g de extracto + 22.5 ml de agua destilada).

T₂ = 20% extracto etanólico (5 g de extracto + 20 ml de agua destilada).

T₃ = 30% extracto etanólico (7.5 g de extracto + 17.5 ml de agua destilada).

T₄ = 40% extracto etanólico (10 g de extracto + 15 ml de agua destilada).

3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico empleado, fue un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones por cada cepa de microorganismo.

Resultando el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación del j-ésimo cultivo, en la i-ésima dilución

μ = Media poblacional

T_i = Efecto de la i-ésima dilución

E_{ij} = Error experimental

Se utilizó la prueba de comparación media de cuadrados mínimos y regresión cuadrática para evaluar la significancia de las diferencias entre los tratamientos.

3.13. Variables dependientes.

- Mortalidad bacteriana de:
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus agalactiae*
 - *Escherichia coli*.

- Resistencia bacteriana

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas del *Psidium guajava* L., aparecen en el Cuadro 1. Como puede apreciarse, se evidencia una respuesta de inhibición en todos los casos con *Staphylococcus aureus*, se obtuvo hasta una efectividad del 53% respecto al control positivo con la concentración 30 y 40%, en cuanto a la respuesta de inhibición para *Streptococcus agalactiae* fue mayor, se obtuvo hasta una efectividad del 83% respecto al control positivo con la concentración 30 y 40%. Y en relación con la bacteria gram negativa, se apreció una carencia total de actividad inhibitoria con todas las concentraciones evaluadas.

Cuadro 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L., frente a los principales agentes etiológicos de la mastitis (diámetro del halo expresado en mm).

microorganismo		Disoluciones				control
		10	20	30	40	(+) ¹
<i>E. coli</i>	A	0	0	0	0	23
	B	0	0	0	0	100
<i>S. aureus</i>	A	7	7	8	8	15
	B	47	47	53	53	100
<i>S. agalactiae</i>	A	6	7.3	8	8	9.6
	B	63	76	83	83	100

¹Estreptomina (10 mg/ml para las bacterias gram positivas) y levofloxacina (4 mg/mL para *E coli*).

A: Diámetro del halo. B: Porcentaje de inhibición.

4.2. Valor de disolución del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis en el Alto Huallága.

El valor de disolución en inhibición del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) frente a los agentes etiológicos de la mastitis, se muestra en el Cuadro 2. Donde se puede apreciar que la *Escherichia coli* es resistente a todas las concentraciones probadas, no existiendo significancia entre los tratamientos. Mientras con el *Staphylococcus aureus* se obtuvo una buena cantidad de inhibición en todas las concentraciones evaluadas, no habiendo diferencia significativa entre los tratamientos. En cuanto al *Streptococcus agalactiae* se obtuvo una muy buena cantidad de inhibición en las concentraciones 20, 30 y 40%, no habiendo diferencia significativa entre estas concentraciones evaluadas.

Según la Figura 1. Se describe una recta donde se muestra que la concentración evaluada más efectiva frente a *Staphylococcus aureus* es la concentración 30%. En la Figura 2. Se describe una curva con una declinación en el punto 35.84, siendo el valor de la concentración más efectiva frente a *Streptococcus agalactiae*, con una cantidad de inhibición del 85%.

Cuadro 2. Nivel de significancia del valor de disolución en porcentaje ajustado con la formula $\sqrt{X+1}$

Microorganismos	Disoluciones			
	10	20	30	40
<i>E. coli</i>	1 ^a	1 ^{ab}	1 ^{abc}	1 ^{abcd}
<i>S. aureus</i>	6.93 ^e	6.93 ^{ef}	7.35 ^{efg}	7.35 ^{efgh}
<i>S. agalactiae</i>	8 ^{gh}	8.78666667 ⁱ	9.16 ^k	9.16666667 ^l

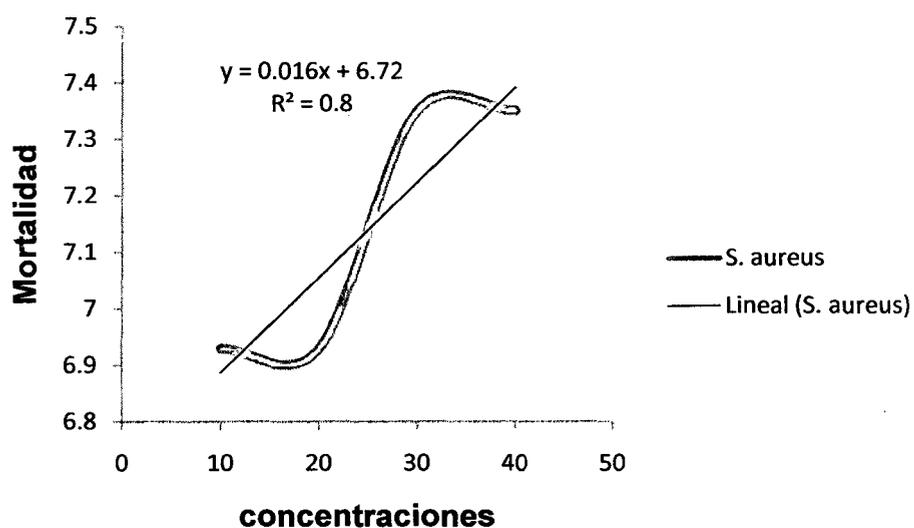


Figura 1. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L., frente a *Staphylococcus aureus*.

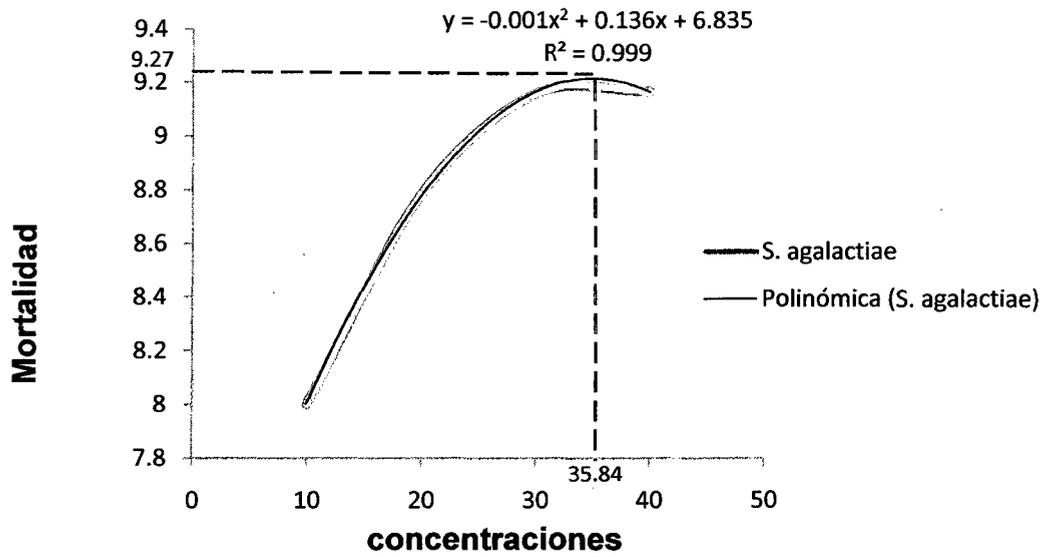


Figura 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L., frente a *Streptococcus agalactiae*.

V. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

En el presente trabajo se encontraron actividades inhibitorias hasta el 83% con el extracto de *Psidium guajava* L., frente a *Streptococcus agalactiae* y de 53% para *Staphylococcus aureus* (Cuadro 1.), lo cual puede sugerir una buena fuente de productos potenciales como antibacterianos frente a microorganismos gram positivas (LUTTERODIT, 1992; ECHEMENDÍA Y MORÓN, 2004), en tanto que el porcentaje de inhibición frente a microorganismos gram negativas no superó el 1%, en ninguna de las concentraciones. Lo anterior está de acuerdo con investigaciones donde se demuestra que los microorganismos gram positivas son más sensibles que los gram negativas (LÁÑEZ, 1998; SUSSMANN; MATTOS y RESTREPO, 2002; GOLD y MOELLERING, 1996).

En el Cuadro 1. Se muestra claramente la inactividad del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), frente a *E. coli*. Esto puede deberse, en los casos evaluados al tipo de extracto y concentración de sólidos totales de la hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.) (ECHEMENDÍA Y MORÓN, 2004; Kause *et al.*, 1999; Keinanen *et al.*, 1999; Laitenen *et al.*, 2000.

Citado por VARGAS, 2006), otra de las razones de la inactividad es por destrucción e inactivación del antibiótico (DAZA, 1998 y LÁÑEZ, 1998), mutación en un gen cromosómico y por introducción de un plásmido R de resistencia (LÁÑEZ, 1998).

5.2. Valor de disolución del extracto etanólico de hojas de guayaba

Como se observa en el Cuadro 2. frente a *E. coli*, no coinciden nuestros resultados negativos con lo reportado por (RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ y MORÓN, 1999) que explica que la tintura de hojas de guayaba inhibe al 80% de las cepas de *Escherichia coli*. Además, se ha comprobado la actividad antibacteriana de un extracto salino contra *Escherichia coli* (Napralert. Illinois, USA, 1990. Citado por MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997), en un experimento se probó la tintura de guayaba y manzanilla por vía oral, obteniéndose la recuperación del 75% contra la *E. coli* (VINENT y ORTIZ, 2003).

Los resultados observados en el Cuadro 2. Muestran que el extracto etanólico a una disolución al 30% presentó una actividad inhibitoria del 53% frente al *Staphylococcus aureus*, superior a la reportada para el extracto fluido al 40% (MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997), al extracto de acetona N-hexano e hidroalcohólico (Napralert. Illinois, USA, 1990. Citado por MARTÍNEZ; MOLINA y BOUCOURT, 1997).

En cuanto al *Streptococcus agalactiae* se presencia una respuesta inhibitoria del 85% con la concentración 35.84%, siendo muy eficiente en el control de este microorganismo muy similar a lo encontrado en un experimento, donde se evaluo un extracto metanólico de *Verbesina encelioides*; hallando buenos resultados frente a gram positivas (TORIBIO *et al.*, 2005). Además, una efectividad del 85% con respecto al control positivo, nos muestra una buena fuente como producto potencial como antibacterianos (CEBA, 1998).

VI. CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* L., evaluado presenta actividad antibacteriana de 53% respecto al control positivo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, y frente a *Streptococcus agalactiae* tiene poder antibacteriana de 85% respecto al control positivo y frente a *E. coli* el extracto carece de actividad antibacteriana.

El valor de disolución del extracto etanólico de hojas de *Psidium guajava* L., con mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* fue al 30% y frente a *Streptococcus agalactiae* fue al 35.84%.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar la investigación del efecto del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.), en el control de los agentes etiológicos de la mastitis, en el Alto Huallaga, aplicando in vivo, con la mejor disolución obtenida que fue el 30%.

VIII. ABSTRACT

EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF LEAVES OF GUAVA (PSIDIUM GUAJAVA L.) IN THE CONTROL OF THE ETIOLOGIC AGENT OF MASTITIS, IN THE ALTO HUALLAGA

The experiment was conducted at the Animal Health Laboratory of the Faculty of Zootecnia of the National Agrarian of the Forest University, Tingo Maria, Huánuco department – Perú, with the objective to evaluate the effectiveness of antibacterial ethanol extract of guava leaf (*Psidium guajava* L.) in the control of the etiologic agents of mastitis in the Upper Huallaga Valley. We studied the antibacterial activity of ethanol extract in a solution of 10, 20, 30 and 40%. We used strains of microorganisms, including: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*, using agar diffusion method. As Negative control was used a solution of 10% ethanol, and as positive controls were used streptomycin (10 mg / ml) for gram positive and levofloxacin (4 mg / ml) for gram negative. The results against *Staphylococcus aureus* indicate an antibacterial effectiveness of 53% compared to the positive control with 30% dissolution and against *Streptococcus agalactiae* was found in an effective 83% compared to the positive control with 30% dissolution, and an

absent antibacterial effect against *Escherichia coli* in all the evaluated solutions.

Key words: Guava (*Psidium guajava*), ethanol extract, mastitis, antibacterial activity, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterial resistance,

IX. BIBLIOGRAFÍA

- CEBA. 1998. Mastitis. [En línea]; (http://www.ceba.com.co/vicarmamitis_o_mastitis.htm, Documento, 8 may. 2008).
- DAZA, R. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Vol. 22.N. o 3-1998. [En línea]; MSC. (<http://www.msc.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>, journals, 8 May. 2008).
- ECHEMENDÍA, C., MORÓN, J. 2004. Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple. Rev. Cubana plant med 2004; 9(3). [En línea]; SCIELO (http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v4n2/pla_02299.pdf, journals, 29 abr. 2008).
- GOLD, H., MOELLERING, C. 1996. Antimicrobial drug resistance. New Engl. J. Med. 335(19): 1445-1453. [En línea]; The New England Journal of Medicine (<http://content.nejm.org/cgi/content/full/335/19/1445>, Journals, 29 abr. 2008).
- INFOCARNE. 2006. Mastitis. la enfermedad y su transmisión. [En línea]; Infocarne (<http://www.infocarne.com/ovino/mastitis.asp>. articulo, 26 de ene. 2009).
- JUSTEN, O. 2001. Mastitis; definición, prevención y control. [En línea]; Universidad estatal de Washington

- (<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublication/misc0344se/misc0344Se.pdf>, publicación, 26 enero 2008).
- MARTÍNEZ, J., MOLINA, N., BOUCOURT, E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev Cubana de Plant Med 1997; 2(1): 12-14. [En línea]; SCIELO, (<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v2n1/pla03197.pdf>, journals, 29 abr. 2008).
- MURRIETA, H. 2002. Incidencia e identificación del agente etiológico causante de la mastitis subclínica en ganado lechero en la zona de Tingo María – Aucayacu. Tesis Ing. Zootecnista. Tingo María, Perú. Universidad nacional agraria de la selva. 62 p.
- LÁÑEZ, E. 1998. Curso de microbiología general, resistencia bacteriana a los antibióticos. Hipertextos del área de la biología [En línea]; UNNE <http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/microianez/21micro.htm#basegen>, Libro, 8 may. 2008).
- LUTTERODIT, G. 1992. Inhibition of Microlax induced experimental diarrhoea with narcotic like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. J Ethnopharmacol 1992; 37:151-7. [En línea]; CLINIC GA (<http://rain-tree.com/clinic/clinicga.htm#G9>, journals, 29 abril. 2008).
- PINZÓN, M. 1989. Mastitis Bovina. [En línea]; FONAIAP (<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd31/texto/mastitis.htm>, documento, 8 may. 2008).

- PHILPOT, N. 2000. Strategies for controlling mastitis. Disertación pronunciada en el VII Congreso Panamericano de la Leche. FEPALE. La Habana. Cuba.
- RODRÍGUEZ, F., MARTÍNEZ, M., MORÓN, D. 1999. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*psidium guajava l.*) oral. rev cubana plant med 1999;3(2):54-6. [En línea]; SCIELO (<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v4n2/pla02299.pdf>, journals, 29 abril. 2008).
- RODRÍGUEZ, G.; ALMAGUER, G.; VARGAS, T.; ESPINOZA, J. 1991 *Psidium guajava* L. Species Plantarum 1: 470. 1753. [En línea]; CONABIO (http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrt3m.pdf. Documento, 28 abril 2008).
- SANTISTEBAN, G. 1976. Diagnóstico de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina en la provincia de Leoncio Prado. Tesis Ing. Zootecnista. Tingo María, Perú. Universidad nacional agraria de la selva. 50 p.
- SCARAMELLI, A., GONZÁLEZ, Z. 2000. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. Barquisimeto-Venezuela. [En línea]; AVPA (<http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros/manual-ganaderia/seccion/articulo9-s5.pdf>, articulo, 26 enero 2009).
- SUSSMANN, O., MATTOS, L., RESTREPO, A. 2002. Resistencia bacteriana, Unidad de Infectología, Hospital Universitario San Ignacio [En línea]; (http://www.mcrit.com/COMSOC/treballsrecerca/treballs_0405/suggestiments_04_05/suggestiments_bacteries/documents/.pdf, Artículo, 8 may. 2008).

- TORIBIO, M.; ORIANI, S.; FERNÁNDEZ, G.; SKLIAR, M. 2005. Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. InVet ; Volumen 7: 1514-6634. [En línea]; SCIELO (http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982005000100005&script=sci_arttext, journal, 8 may. 2008).
- VARGAS, D. 2006. Cinética de acumulación y distribución de Flavonoides en Guayaba (*Psidium guajava* L.). Rev. Científica de América latina y el Caribe. Vol. 40, numero 0001. [En línea]; REDALYC (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/302/30240111.pdf>, Journals, 29 abril 2008).
- VINENT, N., ORTIZ, R. 2003. Estudio sobre el efecto de la tintura de guayaba y manzanilla al 20% en diarreas porcinas. Rev. Científica de América latina y el Caribe. Volumen VIII Número 10. [En línea]; REDALYC (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/302/30240111.pdf>, Journals, 29 abril 2008).
- ZURITA, L. 1982. Mastitis bovina con especial énfasis en la realidad nacional. Rev. Medicina Veterinaria, Vol.4, N°2, diciembre 1982. [En línea]; Medicina Veterinaria (http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D7798%2526ISID%253D414,00.html, artículo 26 enero 2009).

X. ANEXOS

Cuadro 3. Datos obtenidos de la medición del diámetro de halos encontrados en cada tratamiento expresado en mm.

Microorganismo	Diluciones	Repeticiones			Promedio
		x	y	z	
<i>E. coli</i>	(-)	0	0	0	0
	(+)		24	22	23
	10%	0	0	0	0
	20%	0	0	0	0
	30%	0	0	0	0
	40%	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	(-)	0	0	0
(+)		16	14	15	15
10%		7	7	7	7
20%		7	7	7	7
30%		8	8	8	8
40%		8	8	8	8
<i>S. agalactiae</i>		(-)	0	0	0
	(+)	10	9	10	9.6
	10%	6	6	6	6
	20%	7	7	8	7.3
	30%	8	8	8	8
	40%	7	8	9	8

Cuadro 4. Datos ajustados con la formula $\sqrt{X+1}$ para ser procesados en un diseño completamente al azar.

Microorganismo	Diluciones	Repeticiones			Promedio
		x	y	z	
<i>E. coli</i>	10%	1.00	1.00	1.00	1.00000000
	20%	1.00	1.00	1.00	1.00000000
	30%	1.00	1.00	1.00	1.00000000
	40%	1.00	1.00	1.00	1.00000000
<i>S. aureus</i>	10%	6.93	6.93	6.93	6.93000000
	20%	6.93	6.93	6.93	6.93000000
	30%	7.35	7.35	7.35	7.35000000
	40%	7.35	7.35	7.35	7.35000000
<i>S. agalactiae</i>	10%	8.00	8.00	8.00	8.00000000
	20%	8.60	8.60	9.16	8.78666667
	30%	9.16	9.16	9.16	9.16000000
	40%	8.60	9.16	9.74	9.16666667

Cuadro 5. ANVA de un diseño completamente al azar, de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L., frente a *staphylococcus aureus* (diámetro del halo expresado en mm).

F. V	G.L	S.C	C.M	F - Valor	Pr > F
Modelo	3	2.69130000	0.89710000	Infin	<.0001
Error	8	0.00000000	0.00000000		
Total correcto	11	2.69130000			

CV= 0; R² = 1; Nivel de significancia= 0.0001

Cuadro 6. Comparación media de cuadrados mínimos de cepas de *staphylococcus aureus* por concentraciones.

i/j	1	2	3	4
1		1.0000	0.0120	0.0120
2	1.0000		0.0120	0.0120
3	0.0120	0.0120		1.0000
4	0.0120	0.0120	1.0000	

Conclusión

1	a
2	a b
3	a b c
4	a b c d

Cuadro 7. ANVA de un diseño completamente al azar, de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Psidium guajava* L., frente a *Streptococcus agalactiae*, (diámetro del halo expresado en mm).

F. V	G.L	S.C	C.M	F - Valor	Pr > F
A	3	2.69130000	0.89710000	Infin	<.0001
ERROR	8	0.00000000	0.00000000		
Total correcto	11	2.69130000			

CV= 1.354577; $R^2 = 0.999893$; Nivel de significancia= 0.0001

Cuadro 8. Comparación media de cuadrados mínimos de cepas de *Streptococcus agalactiae* por concentraciones.

<i>i/j</i>	1	2	3	4
1		<.0001	<.0001	<.0001
2	<.0001		0.0236	0.021
3	<.0001	0.0236		0.9659
4	<.0001	0.0215	0.9659	

Conclusión

1	a
2	b
3	b c
4	b c d

Ecuación 1. Hallando el punto máximo de disolución que tendrá mejor inhibición frente a *Streptococcus agalactiae* (Figura 3).

$$Y = 6.385 + 0.1362X - 0.0019X^2$$

$$Y' = 0.1362 - 2(0.0019X)$$

$$Y' = 0.1362 - 0.0038X$$

$$0.1362 = 0.0038X$$

$$X = \frac{0.1362}{0.0038}$$

$$X = 35.84\%$$