



.UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA



Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Piper angustifolium*

(Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y

Pseudomonas aeruginosa

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE

BACHILLER EN MEDICINA

AUTOR: SANDRA PAMELA CHUQUIMANGO FUENTES

ASESOR: Dra. ELVA MEJÍA DELGADO

TRUJILLO-PERÚ

2017

1



DEDICATORIA

A Dios por bendecirme y ayudarme
durante este largo camino,
por darme el valor necesario
para lograr mis metas y seguir adelante.

A mis padres y hermana, por su apoyo
y confianza incondicional en mí,
por su respaldo hacia el logro de mis sueños,

A mi abuela materna MARGARITA, de la cual nace la idea de
mi trabajo de tesis, y a quien le debo lo que soy; y a mi
pequeño SCOTH por el amor incondicional que siempre
me brindó

A mis amigos de la facultad y a los integrantes
Del Centro de Estudiantes de Medicina 2017.
Por su constante apoyo, motivación y
por formar parte de mi familia.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elva Mejía Delgado, mi asesora de tesis, por brindarme su amor, amistad y consejos durante toda mi carrera universitaria, por guiarme y ayudarme en la realización de nuestra investigación.

Al Mg. Alfredo Chuquimango Cercado, mi padre y amigo, por brindarme su amor y apoyo incondicional desde siempre, por haberme ayudado en la recolección de todo mi material botánico para la realización de la investigación.

A la profesora Marilú Soto Vásquez, por su apoyo en el Laboratorio de Farmacognosia- Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNT.

Al personal técnico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT, por su gran apoyo y servicio durante la ejecución de la investigación.



ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema	5
1.2. Hipótesis	5
1.3. Objetivos	5
II. MATERIAL Y MÉTODOS	7
2.1. Material de estudios :.....	7
2.1.1. Tipo de estudio	7
2.1.2 Población objetivo	7
2.1.2.1 Criterios de selección de muestra	7
2.1.3. Muestra	8
2.2. Métodos y Técnicas	10
2.2.1. De la aprobación del proyecto	10
2.2.2. De la autorización para la ejecución	10
2.2.3. De la certificación del examinador	10
2.2.4. Aceite esencial de <i>Piper angustifolium</i> (matico) para el estudio	11
2.2.4.1. Recolección de <i>Piper angustifolium</i> (Matico)	11
2.2.4.2. Identificación de <i>Piper angustifolium</i> (Matico)	11
2.2.4.3. Preparación de la Muestra vegetal	11
2.2.4.4. Obtención del aceite esencial de <i>Piper angustifolium</i> (Matico)	12
2.2.4.5. Preparación de las concentraciones de aceite esencial	12



2.2.4.6. Rendimiento del aceite.....	13
2.2.5. Cepas bacterianas para el estudio.....	13
2.2.6. Preparación del inculo.....	14
2.2.7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	15
2.2.8 Determinación de efecto antibacteriano (Prueba de Susceptibilidad).....	18
2.3. Instrumento de recolección de datos.....	18
2.4 Diseño de la investigación.....	19
2.5 Aspectos éticos.....	23
2.6 Análisis estadístico.....	23
III. RESULTADOS.....	24
IV. DISCUSIÓN.....	34
V. CONCLUSIONES.....	37
VI. RECOMENDACIONES.....	38
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
VIII. ANEXOS.....	44



RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el efecto antibacteriano “in vitro” del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio de tipo experimental del efecto antibacteriano de las concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100 % del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*, se utilizó como control Vancomicina 500 mg para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente e Imipenem 500 mg para *Pseudomonas aeruginosa*. Se empleó el método de difusión de discos y la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se realizó la prueba de análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación por pares utilizando subconjuntos homogéneos. Ambas con un nivel de significancia $P < 0.05$

Resultados: *Piper angustifolium* presentó actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente con una CMI 100 % donde UFC fue 0 y a una concentración 75 % tuvo un halo de inhibición de 20.1 ± 4 mm/ml y sobre *Pseudomonas aeruginosa* con una CMI de 75% en donde el conteo de UFC fue 0 y a una concentración de 100% tuvo un halo de inhibición de 16.8 ± 1.4 mm/ml

Conclusiones: El aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) si tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras clave: *Piper angustifolium*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Pseudomonas aeruginosa*, aceite esencial.



ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the in vitro antibacterial effect of essential oil of *Piper angustifolium* (Matico) on strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIALS AND METHODS: Experimental study of the antibacterial effect of concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% of the essential oil of *Piper angustifolium* (Matico) on strains of *Staphylococcus aureus* methicillin resistant and *Pseudomonas aeruginosa* was used as control Vancomycin 500 mg for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Imipenem 500 mg for *Pseudomonas aeruginosa*. Disc diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) were used. The Kruskal-Wallis nonparametric variance analysis test and the paired comparison test were performed using homogeneous subsets. Both with a level of significance $P < 0.05$

Results: *Piper angustifolium* showed antibacterial activity on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a MIC of 100 % the CFU count was 0 in which concentration of 75% had an inhibition halo of 20.1 ± 4 mm / ml and on *Pseudomonas aeruginosa* with a MIC of 75 % the CFU count was 0 in Whose concentration of 100% had a inhibition halo of 16.8 ± 1.4 mm / ml.

Conclusions: The essential oil of *Piper angustifolium* (Matico) has an "in vitro" antibacterial effect on strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Piper angustifolium*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, essential oil.



I. INTRODUCCIÓN:

La estancia hospitalaria, debida a múltiples enfermedades, ha aumentado considerablemente en los últimos años y las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de morbilidad en países subdesarrollados como el nuestro¹. A pesar de los avances científicos, el aumento de las infecciones nosocomiales también se ha acrecentado, debido a la falta de medidas de bioseguridad, el mal uso de los medicamentos (a los que generaran resistencia) y las condiciones del paciente como la inmunodepresión. Las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* son las principales especies responsable de infecciones intrahospitalarias en pacientes^{1,2}.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva patógena oportunista que forma parte de la microflora humana, presente en el 30 a 50 % de la población mundial, localizándose frecuentemente en el interior de la nariz, la piel y otras mucosas³. Puede causar múltiples infecciones, las cuales varían desde infecciones cutáneas como: impétigo, infecciones de heridas, infecciones asociadas a elementos prostéticos (prótesis) hasta infecciones severas, a veces fatales, como: osteomielitis, endocarditis y bacteriemia⁴.

Estudios en el Perú muestran que existe una frecuencia de infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente elevada, sobretodo en hospitales de atención compleja y de atención a quemados^{1,3,5}. Se han identificado diversos factores de riesgo que presentan relación estrecha con la infección nosocomial por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente: estancia prolongada hospitalaria, uso de antibióticos de amplio espectro, estancia en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) o unidad de quemados, infecciones quirúrgicas, defensas bajas, proximidad



a otro paciente con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente^{1,5,6}, en las que los trabajadores asistenciales son una importante fuente de transmisión de *S. aureus*^{1,3}.

Por otro lado la *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa aeróbica oportunista que constituye uno de los patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos. Por lo cual se plantea que los brotes por pseudomonas representan el 5 % de las infecciones nosocomiales, *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, por su alto grado de adaptabilidad fisiológica y los elevados niveles de resistencia que manifiesta frente a numerosos agentes antimicrobianos. Constituye, por estas razones, uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes y es reconocida como un gran problema de salud al nivel mundial. En Cuba, se ha mantenido entre los 3 primeros gérmenes de alto riesgo, causante de sepsis en los diferentes servicios hospitalarios⁷.

El desarrollo de resistencia a medicamentos en los patógenos humanos contra antibióticos usados, el alto costo y el aumento de los efectos secundarios tóxicos de estas drogas sintéticas ha hecho necesario la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas de otras fuentes, incluyendo plantas medicinales.^{8,9,10,11}

El uso de plantas medicinales para tratar enfermedades crónicas e infecciosas es bien conocida en zonas rurales de muchos países en desarrollo.¹¹

Las plantas utilizadas en la medicina no tradicional contienen una amplia gama de sustancias químicas que producen acciones fisiológicas definidas en el cuerpo humano (digestión, respiración, control del Ph, entre otras). Los más importantes compuestos bioactivos son alcaloides, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos.^{12,13}



Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios, los más destacados son: los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas.¹⁴

El matico es una planta de la familia Piperaceae de aproximadamente 3 metros de altura que crece en la costa, selva alta y baja y en los valles interandinos de la sierra; se utiliza en la medicina no tradicional como diurético, antiinflamatorio, antiséptico local y cicatrizante.^{14,15,16}

El contenido de aceite esencial de las hojas de matico es 0,63% predominando compuestos terpenoides. Los monoterpenos componen el 53% del aceite esencial y son representados por el linalol; otros constituyentes son los irinoides con propiedades antibacterianas. Los sesquiterpenos conforman el 55% del contenido del aceite esencial y son representados por diversos compuestos, especialmente el óxido de cariofileno, epóxido II de humuleno, (E) Nerolidol y α -Copaeno. También están presentes pequeñas cantidades de alil benzeno safrol y de metil cetona 2-Undecanona; además fenilpropanoides que poseen propiedades bactericidas.¹⁷

Algunos ensayos *in vitro* demostraron actividad antibacteriana contra gérmenes Gram positivos y negativos, lo cual se debería a la presencia de terpenos (limoneno, isopreno, dolicol).¹⁸

Palacios (2009) evaluó 4 plantas medicinales entre ellas *Piper angustifolium* frente a diferentes microorganismos como bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos; obteniendo como resultados que el *Piper angustifolium* tiene gran actividad antifúngica frente al hongo dermatofito *Trichophyton rubrum*, pero por otra parte



presenta una mediana actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*, sin embargo no tuvo ninguna capacidad inhibitoria frente a *Proteus vulgaris*¹⁹.

Abad (2009) realizó un estudio in vitro de los microorganismos: *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* frente a sustancias de origen natural como *Piper angustifolium* (Matico) utilizando diferentes concentraciones de los extractos metanólicos para determinar su inhibición, obteniendo como resultado que *Piper angustifolium* no tiene ningún efecto antibacteriano frente a las bacterias utilizadas, pero que si tiene efecto antifúngico en las especies estudiadas²⁰.

Ruiz y col (2009) investigaron la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de diferentes plantas del nororiente peruano entre ellos *Piper angustifolium* (hojas) Los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*; y los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporum cani*; dando como resultados que *Piper angustifolium* (hojas) tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, pero no presenta ningún efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa*²¹.

Zuta (2014) evaluó el efecto antibacteriano in vitro de extracto de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a diferentes concentraciones, obteniendo como resultado, que la concentración del 100 % de *Piper angustifolium* mostro una actividad antibacteriana significativa en



la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, y que a concentraciones menores del extracto en estudio el efecto antibacteriano no fue significativo²².

1.1 PROBLEMA:

¿Tiene efecto antibacteriano “in vitro” el aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*?

1.2 HIPÓTESIS

Ha: El aceite esencial de *Piper angustifolium* (matico) si tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

H0: El aceite esencial de *Piper angustifolium* (matico) no tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 GENERAL:

- Evaluar el efecto antibacteriano “in vitro” del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2 ESPECÍFICOS:

- Determinar el diámetro promedio de los halos de inhibición de las cuatro concentraciones del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) al 25%, 50 %, 75% y 100% frente a cepas de



Staphylococcus aureus meticilino resistente, ATCC 25923 y sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- Determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) promedio de las cuatro concentraciones del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) al 25%, 50 %, 75% y 100% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, ATCC 25923 y sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Determinar la concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) al 25%, 50 %, 75% y 100% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, ATCC 2592 y sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL DE ESTUDIO.

2.1.1 TIPO DE ESTUDIO:

- **Según la interferencia del Investigador en el fenómeno que se analiza:** Experimental

2.1.2 POBLACIÓN OBJETIVO

Estuvo constituida por cultivos de *Staphylococcus aureus* metilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*, aislados de pacientes y conservados en la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.1.2.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRA

Criterios de inclusión

Placas con soya tripticasa con macrodilución de *Pseudomonas aeruginosa*, y la concentración de aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) correspondiente.

Placas con soya tripticasa con macrodilución de *Staphylococcus aureus* metilino resistente, y la concentración de aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) correspondiente.

Criterios de eliminación

Placa Petri con la macrodilución que sufrieron deterioro o daño durante la conservación y los procedimientos, que no permitieron su medición posterior.



2.1.3 MUESTRA

Unidad de análisis

La unidad de análisis la constituyeron los halos de inhibición y el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) producto del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper angustifolium* “Matico” sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra

Se obtuvo 11 placas Petri por grupo con el programa estadístico Minitab17, se distribuyó 88 placas Petri para los 8 grupos experimentales y 44 para los 4 grupos controles.

GRUPOS PARA *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

- GRUPO 1: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 25% (268.65 mg/mL)
- GRUPO 2: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 50% (537.3 mg/mL)
- GRUPO 3: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 75% (805.5 mg/mL)
- GRUPO 4: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 100% (1074.6 mg/mL)



- GRUPO 5: 11 placas Petri utilizando discos de Vancomicina 500 mg
- GRUPO 6: 11 placas Petri utilizando discos de Tween 80

GRUPOS PARA *Pseudomonas aeruginosa*.

- GRUPO 1: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 25% (268.65 mg/mL)
- GRUPO 2: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 50% (537.3 mg/mL)
- GRUPO 3: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 75% (805.5 mg/mL)
- GRUPO 4: 11 placas Petri utilizando aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) a una concentración de 100% (1074.6 mg/mL)
- GRUPO 5: 11 placas Petri utilizando discos de Imipenem 500 mg
- GRUPO 6: 11 placas Petri utilizando Tween 80

2.2.MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.2.1.DE LA APROBACIÓN DEL PROYECTO:

Para la realización de la investigación se obtuvo el permiso para la ejecución, mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Medicina de



la Universidad Nacional de Trujillo y la correspondiente Resolución de Decanato.

2.2.2. DE LA AUTORIZACIÓN PARA LA EJECUCIÓN:

Una vez aprobado el proyecto se solicitó el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.2.3. DE LA CERTIFICACIÓN DEL EXAMINADOR.

El investigador se certificó por su asesora experta en el tema y por 2 expertos del departamento de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional De Trujillo, para la certificación se codificó las 132 placas utilizadas para el conteo de UFC (grupos experimentales más controles) la codificación fue desde 001 hasta 132; de las cuales se eligieron aleatoriamente 12 placas Petri, se realizó la lectura de las 12 placas Petri mediante la inspección visual de cada placa; se realizó la medición de los halos de inhibición de 12 placas Petri también elegidas aleatoriamente codificadas previamente desde 001 hasta 132, la medición de los halos de inhibición se realizó con un vernier en milímetros entre el investigador, asesora y los 2 expertos (ANEXO N°1-3).

2.2.4. ACEITE ESENCIAL DE *Piper angustifolium* (MATICO) PARA EL ESTUDIO

2.2.4.1. Recolección de *Piper angustifolium* (Matico)

Se recolectó 12 kg de hojas verdes y talluelos de *Piper angustifolium* (Matico), del departamento de Cajamarca, provincia de Chota, ubicada



a 2,640 msnm. Los cuales fueron conservadas a temperatura ambiente, sin desecar hasta el momento de la extracción del aceite esencial.

2.2.4.2. Identificación de *Piper angustifolium* (Matico)

La planta medicinal completa, fue identificada en el *Herbarium Truxillense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo

2.2.4.3. Preparación de la Muestra vegetal

Selección de *Piper angustifolium* (Matico): Obtenida la muestra necesaria de la planta fue llevada al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo y se eliminaron las hojas que presentaron signos de enfermedades evidentes como pigmento café, amarillo u oscuro.

Lavado: Se lavó el material vegetal con agua destilada, seguido de desinfección, utilizando hipoclorito de sodio al 0.5 %. Posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada estéril, para retirar los residuos de hipoclorito²³.

2.2.4.4. Obtención del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico)

El aceite esencial fue extraído a partir de 500g de hojas, previamente cortadas en trozos de aproximadamente 2 cm, este material se colocó en un recipiente de vidrio; así como 500 mL de agua destilada en un balón de vidrio de 1000 mL. Luego se armó el equipo de destilación, sometiendo la muestra a una corriente de vapor de agua sobrecalentada,



arrastrando la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, fue condensada, repitiéndose esta operación hasta completar los 2.5 kg de muestra seleccionada. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre agua y aceite esencial, para lo cual se utilizó una pera de separación de vidrio, deshidratándose las impurezas de agua en el aceite esencial con Na_2SO_4 anhidro. Finalmente se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar estéril (para evitar la descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura de 4 a 8 C°²⁴.

2.2.4.5. Preparación de las concentraciones de aceite esencial:

Se preparó según el siguiente cuadro:

Volumen de aceite esencial	Volumen de Tween 80	Volumen final	Concentración (%)
1.25 mL	3.75 mL	5 mL	25
2.50 mL	2.50 mL	5 mL	50
3.75 mL	1.25 mL	5 mL	75
3 mL	-	3 mL	100

Luego, se colocó cada una de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar estéril, para protegerlas de la luz, llevándolas posteriormente a refrigeración de 4 a 8 °C, hasta la realización del análisis microbiológico²⁵.



2.2.4.6. Rendimiento del aceite ²⁵.

El rendimiento del aceite fue de 0.41ml por cada 100g de hoja seca (0.41%), obteniéndose una densidad de 1.0746 g/mL.

Las concentraciones al transformarse en mg/mL se obtienen sus respectivas equivalencias:

Densidad del aceite (mg/mL)	Concentración (%)
268.65 mg/mL	25
537.3 mg/mL	50
805.5 mg/mL	75
1074.6 mg/mL	100

2.2.5. CEPAS BACTERIANAS PARA EL ESTUDIO

Se trabajó con cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*, obtenidos del laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.



2.2.6. PREPARACIÓN DEL INOCULO.

Obtenidas las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ,se cultivaron en tubos de ensayo cerrados herméticamente conteniendo el medio agar Soya tripticasa. Se incubaron a 37°C con el fin de obtener colonias jóvenes.

Las cepas se diluyeron en caldo Mueller Hinton hasta obtener una concentración semejante al tubo 0.5 de la escala de Mac Forland que corresponde a una concentración de 3×10^8 b/ml

2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

- En tubos de ensayo se colocó 0.8 ml de cada dilución del *Piper angustifolium* al 25%, 50%, 75% y 100%.
- Se adicionó un inóculo de 0.2 ml del cultivo preparado tanto de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* a cada tubo (incluyendo los 2 tubos control) y se incubaron a 37°C por un lapso de 24 horas.
- El crecimiento microbiano se evaluó por turbidez del medio de cultivo.
- Se realizó el sembrado en placa con agar Muller-Hinton del contenido de los tubos para determinar las cuentas viables para lo cual se tomó 0,1 ml de cada tubo y se dispersó en toda la placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) por cada



concentración, para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y para *Pseudomonas aeruginosa*.

- Después del sembrado las placas se incubaron a 37°C por 24 horas
- Todos los ensayos se realizaron bajo condiciones asépticas y fueron 11 placas Petri por concentración.
- Se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) para cada concentración, en los casos en que las UFC fueron mayores de 300 se realizó el conteo de UFC empleando la siguiente fórmula²⁶:

$$\text{UFC} = \text{N}/4 \times \text{A} \times \text{D}$$

N= número de colonias; **A**= Área; **D**= Dilución

- Las placas en donde las UFC fueron cero son las que tuvieron el efecto bactericida.

2.2.8. DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIBACTERIANO (PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD)

Para la prueba de susceptibilidad se utilizó el método de Difusión en discos.

Se preparó discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada una de las concentraciones del aceite esencial de *Piper angustifolium*, luego con una aguja estéril estos se colocaron sobre los cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en placas Petri con agar Mueller Hinton y sobre cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* previamente preparados.



Se preparó 11 placas Petri por cada concentración, y en cada placa utilizada se colocó 4 discos de sensibilidad. De igual manera se prepararon 11 placas Petri para el control con vancomicina de 500 mg en los cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y con Imipenem de 500 mg en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, además de 11 placas para control negativo con Tween 80 para las 2 bacterias estudiadas.

Posteriormente las placas Petri se incubaron a 37°C por 24 horas. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm. de la llama de un mechero.

Pasadas las 24 horas se realizó la lectura de resultados. Se midieron los halos de inhibición, incluyendo el área del disco de papel de filtro con una regla milimetrada, procediéndose de igual manera con ambos controles. La lectura de los halos de inhibición producidos se midió en milímetros tomando en cuenta la escala de Duraffourd²⁷.

Escala de Duraffourd²⁷

Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.

- Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.



Halos de inhibición referenciales (NCCLS)

- Vancomicina para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923: **17 -21 mm.**
- Imipenem para *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853: **16 mm**

2.3. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

Se llenaron los datos obtenidos en las fichas elaboradas (Anexo N° 4-7)

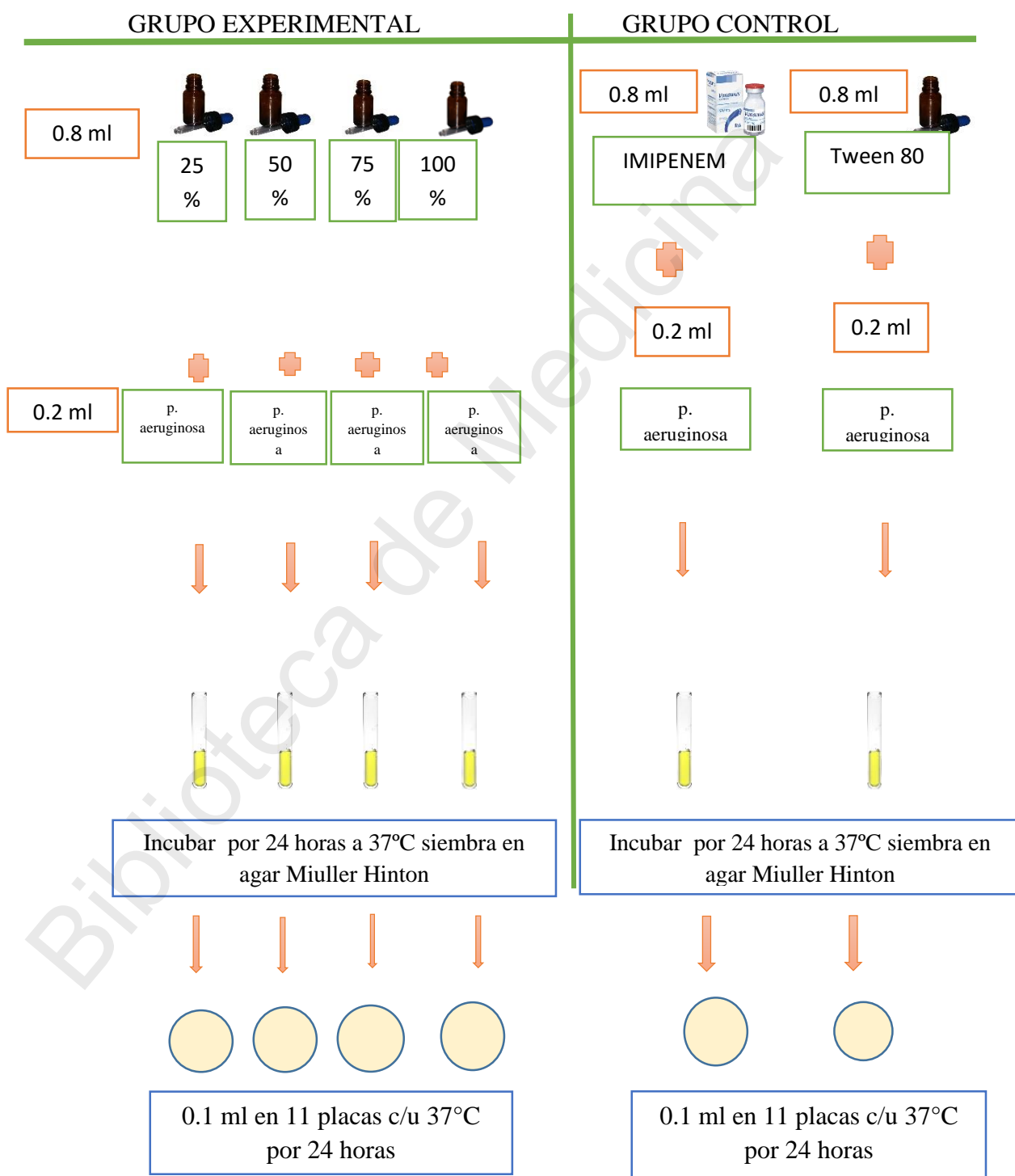
El instrumento contiene:

1. El conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
2. Medida de halos de inhibición expresada en milímetros (mm).



Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

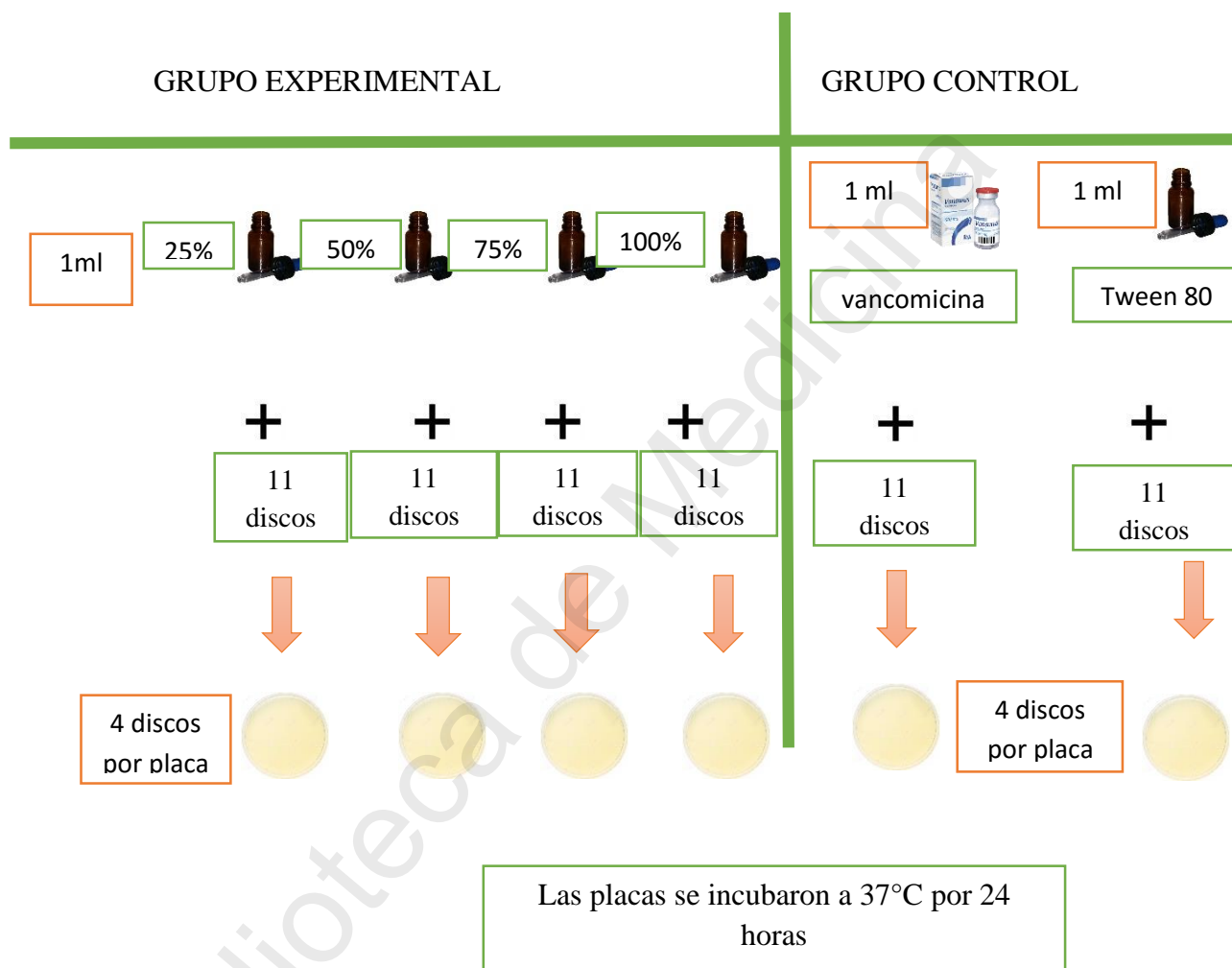
Aceite esencial de *Piper angustifolium* y *Pseudomonas aeruginosa*.





Determinación de efecto antibacteriano (Prueba de Susceptibilidad) en

Staphylococcus aureus meticilino resistente

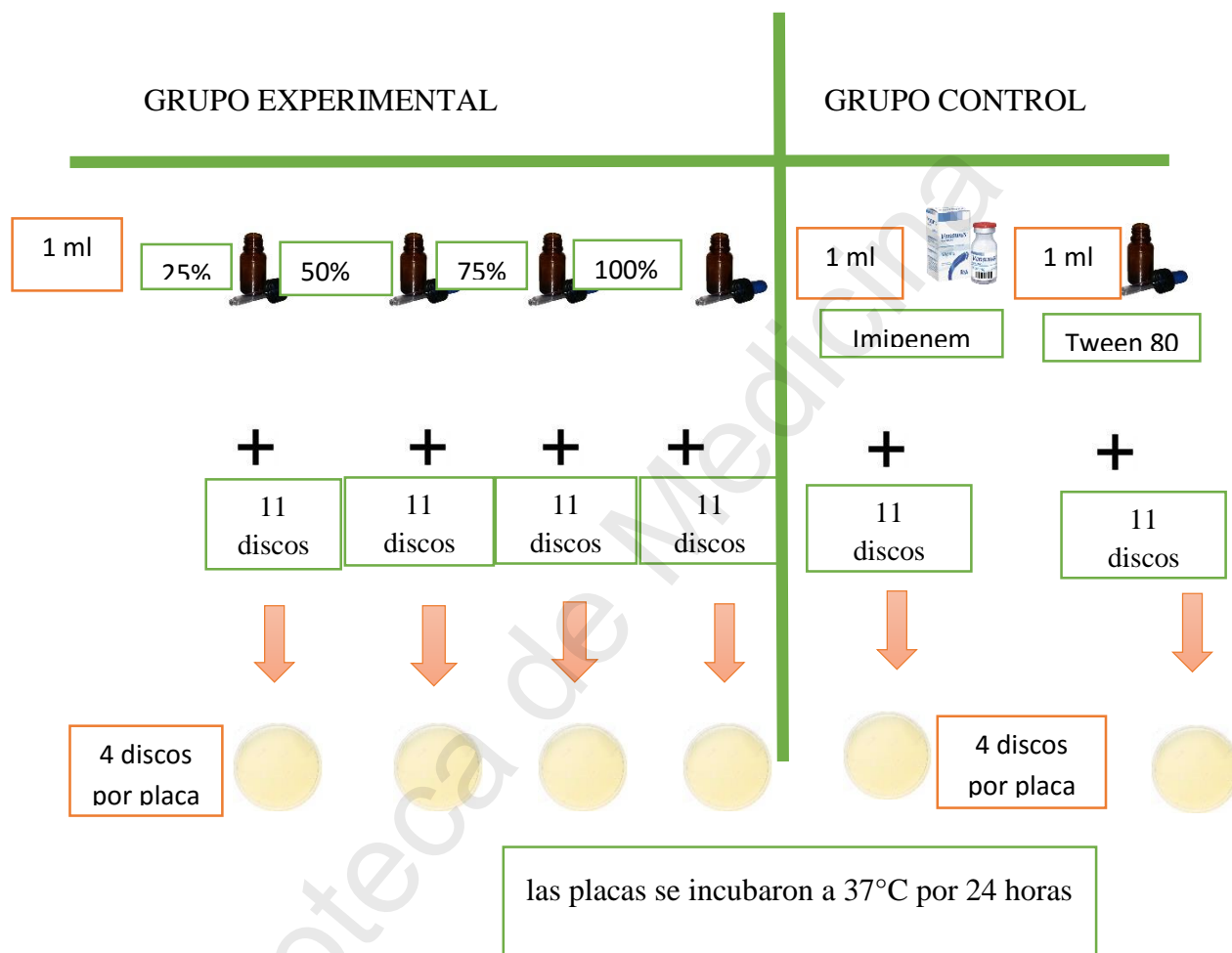


LA LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PRODUCIDOS SE MIDIERON EN MILIMETROS TOMANDO EN CUENTA LA ESCALA DE DURAFFOURD



Determinación de efecto antibacteriano (Prueba de Susceptibilidad)

en *Pseudomonas aeruginosa*



**LA LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN
PRODUCIDOS SE MIDIERON EN MILIMETROS TOMANDO
EN CUENTA LA ESCALA DE DURAFFOURD**



2.5. ASPECTOS ÉTICOS:

Al realizar la presente investigación, se tuvo en cuenta el principio de precaución en conformidad con el Principio 15 de la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo²⁸. Asimismo, se tuvo presente el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica²⁹, considerando los riesgos para la salud humana.

Además se presenta:

- Constancia de Asesoría. (Anexo N° 5)
- Constancia de aprobación para ejecución del proyecto por el Comité Permanente de Investigación de la Escuela Académico Profesional de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo N° 6)

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se evaluó la normalidad de la muestra con la prueba de Shapiro-Wilk considerando distribución normal si $p < 0.05$. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para evaluar los diámetros de los halos de inhibición y las unidades formadoras de colonias entre los grupos experimentales, considerando un nivel de significancia $p < 0.05$.

Para determinar que concentración es más efectiva contra *Staphylococcus aureus* metilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* se aplicará la prueba de comparaciones múltiples utilizando subconjuntos homogéneos, ambas con un nivel de significancia de $p < 0,05$.



III. RESULTADOS

Al determinar el efecto antibacteriano “in vitro” del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; se encontró que en el grupo 1 (C 25%) tuvo un diámetro de halo de inhibición promedio de 11.8 ± 1.7 mm/ml, mientras que se obtuvieron diámetros promedios de 12.7 ± 1.9 mm/ml, 20.1 ± 4 mm/ml y 27.3 ± 3.8 mm/ml para los grupos 2 (C 50%), 3 (C 75%) y 4 (C 100%), respectivamente. El grupo control positivo tuvo un diámetro de halo de inhibición de 19 mm/ml. Se halló diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) (Gráfico 01), la concentración mínima para los halos de inhibición fue de 75% (Tabla 01). Al analizar las UFC se evidenció que en el grupo 1 (C 25%) se contaron en promedio 100.36 ± 21.30 UFC/ml, mientras que se obtuvieron promedios de 19 ± 21.96 UFC/ml, 0.45 ± 0.82 UFC/ml y 0 UFC/ml para los grupos 2 (C 50%), 3 (C 75%) y 4 (C 100%), respectivamente. En el grupo control positivo se contaron 0 UFC/ml. Se halló diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) (Gráfico 02) y la concentración mínima inhibitoria para las UFC fue al 100 % de aceite esencial. (Tabla 02).

Para determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se encontró que en el grupo 1 (C 25%) tuvo un diámetro de halo de inhibición promedio de 11.6 ± 1.3 mm/ml, mientras que se obtuvieron diámetros promedios de 12.8 ± 3.3 mm/ml, 12.2 ± 1.8 mm/ml y 16.8 ± 1.4 mm/ml para los grupos 2 (C 50%), 3 (C 75%) y 4 (C 100%), respectivamente. El grupo control positivo tuvo un diámetro de halo de inhibición de 16 mm/ml. Se halló diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) (Gráfico 03) y la concentración mínima inhibitoria para los diámetros de los halos

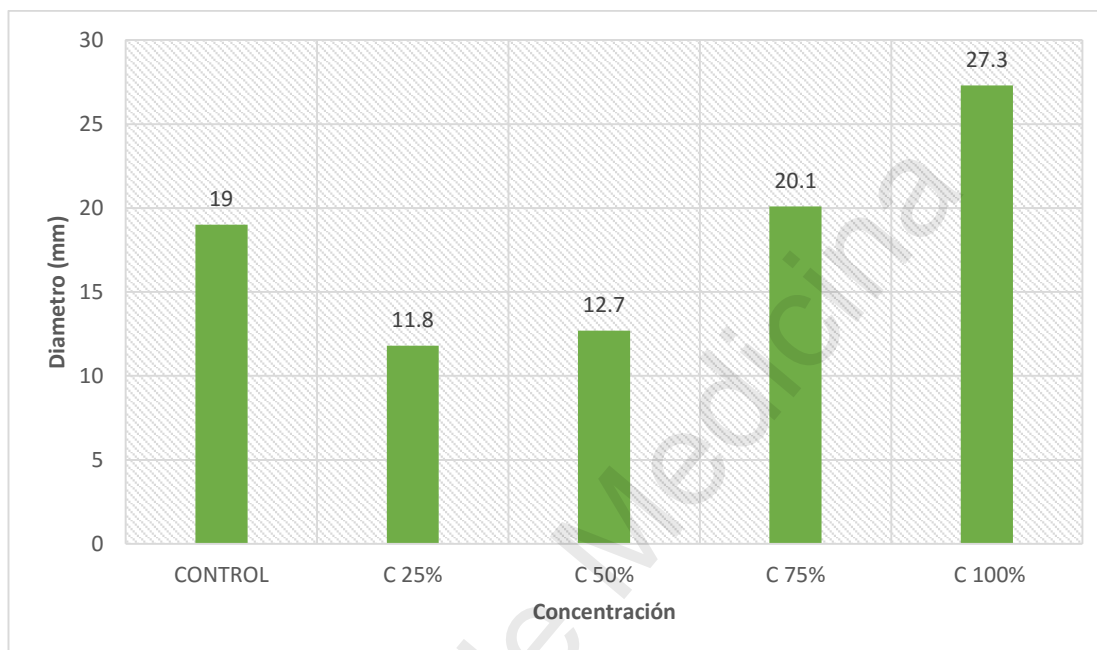


de inhibición fue al 100 % de aceite esencial. (Tabla 03). Al analizar las UFC se evidenció que en el grupo 1 (C 25%) se contaron en promedio 218 ± 28.71 UFC/ml, mientras que 82.64 ± 23.04 UFC/ml, 0 UFC/ml y 0 UFC/ml para los grupos 2 (C 50%), 3 (C 75%) y 4 (C 100%), respectivamente. En el grupo control positivo se contaron 0 UFC/ml. Se halló diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) (Gráfico 04) y la concentración mínima inhibitoria para las UFC fue al 75 % de aceite esencial. (Tabla 04).

Biblioteca de Medicina



Gráfico N°01: Medida del Halo de inhibición en mm a diferentes concentraciones de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y control con Vancomicina

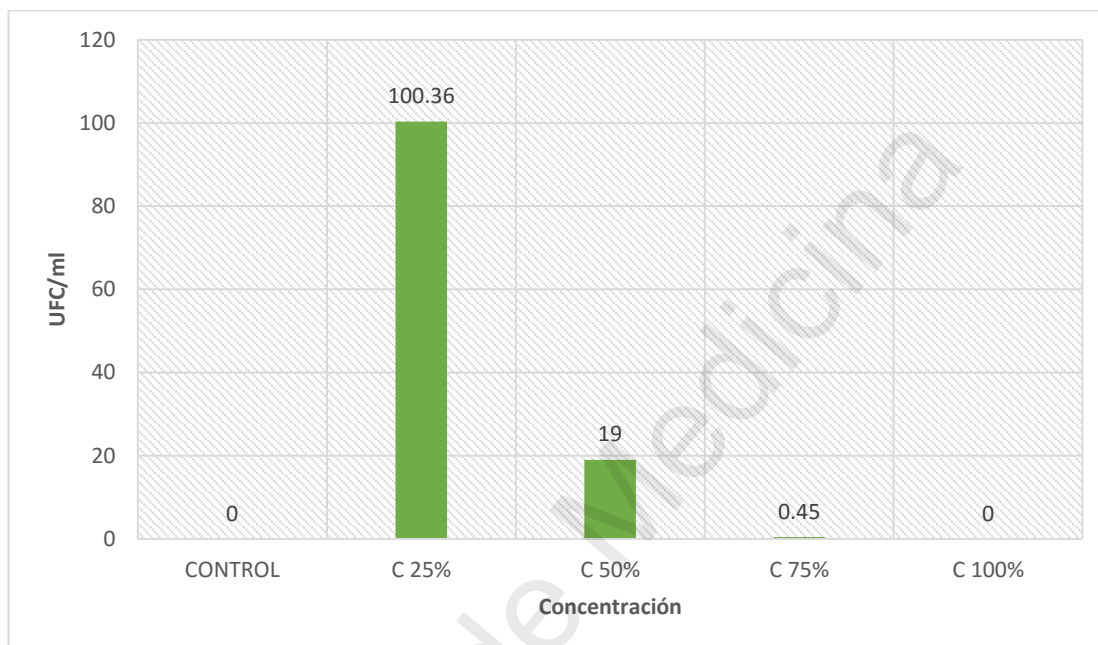


Prueba de Kruskal-Wallis para Diámetro de Halo de Inhibición mm/mL sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

X² KW	38.16
gl	3
P	0.0000



Gráfico N°02: Medida para Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml en diferentes concentraciones de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y control con Vancomicina



Prueba de Kruskal-Wallis sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

X² KW	39.26
gl	3
P	0.0000

**Tabla N° 01: Comparación por pares para Diámetro de Halo de Inhibición****mm/mL sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente**

Contraste			P
25%	vs	50%	0.14100
25%	vs	75%	0.00006
25%	vs	100%	0.00004
50%	vs	75%	0.00008
50%	vs	100%	0.00004
75%	vs	100%	0.00066



Tabla N° 02: Comparación por pares para Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Contraste			P
25%	vs	50%	0.00024
25%	vs	75%	0.00008
25%	vs	100%	< 0.05
50%	vs	75%	0.00008
50%	vs	100%	< 0.05
75%	vs	100%	NS



Gráfico N°03: Medida del Halo de inhibición en mm a diferentes concentraciones de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y control con Imipenem.



Prueba de Kruskal-Wallis para Diámetro de Halo de Inhibición mm/mL sobre *Pseudomonas aeruginosa*

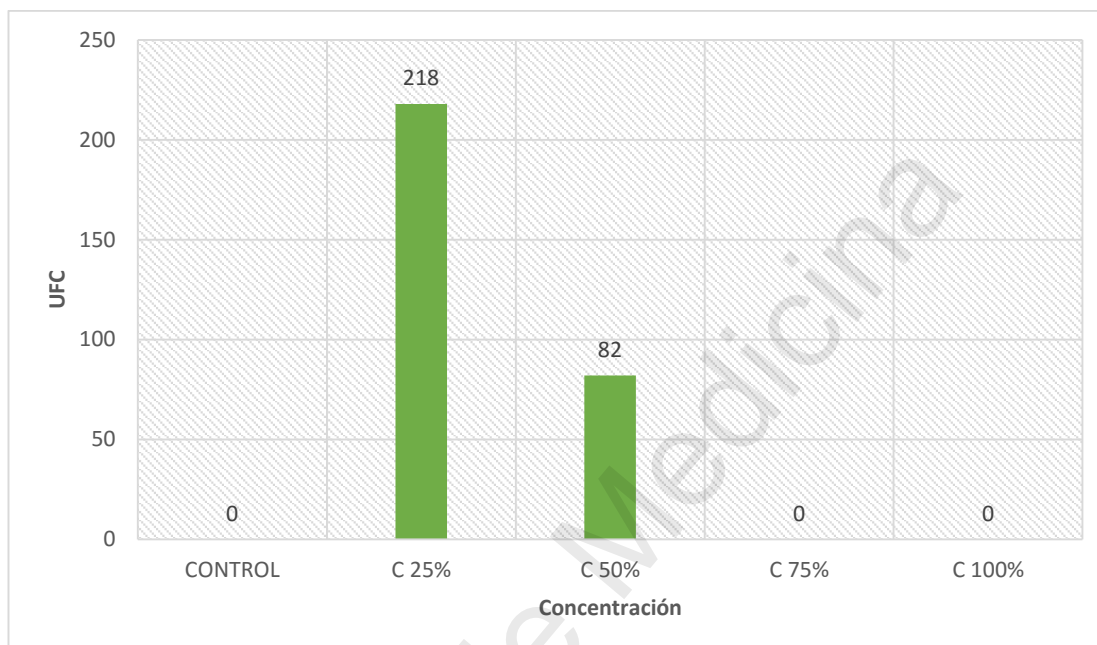
X² KW	20.70
gl	3
P	0.0001

**Tabla N°03: Comparación por pares para Diámetro de Halo de Inhibición**mm/mL sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Contraste			P
25%	vs	50%	0.77300
25%	vs	75%	0.24800
25%	vs	100%	0.00005
50%	vs	75%	0.77300
50%	vs	100%	0.00862
75%	vs	100%	0.00011



Gráfico N°04: Medida para Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml en diferentes concentraciones de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y control con Imipenem



Prueba de Kruskal-Wallis para Unidades Formadoras de Colonias UFC/ml sobre *Pseudomonas aeruginosa*

X² KW	41.48
gl	3
P	0.0000

**Tabla N° 04: Comparación por pares para Unidades Formadoras de****Colonias UFC/ml sobre *Pseudomonas aeruginosa***

Contraste			P
25%	vs	50%	0.00008
25%	vs	75%	< 0.05
25%	vs	100%	< 0.05
50%	vs	75%	< 0.05
50%	vs	100%	< 0.05
75%	vs	100%	NS



IV. DISCUSIÓN

En nuestro estudio mediante los ensayos in vitro para evaluar la susceptibilidad de las cepas frente a las cuatro concentraciones de aceite esencial se determinó que la especie *Piper angustifolium* (Matico) presentó una actividad antibacteriana sumamente sensible debido a que el halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* meticilino resistente fue de 20.1 ± 4 mm/ml al 75 % (805.5 mg/mL) y una Concentración Mínima Inhibitoria al 100% en donde el conteo de UFC fue cero. En relación a *Pseudomonas aeruginosa* la actividad antibacteriana fue muy sensible debido a que al 100% (1074.6 mg/mL) tuvo un halo de inhibición de 16.8 ± 1.4 mm/ml y la Concentración Mínima Inhibitoria fue del 75% en donde las UFC fue cero. Estos datos contrastan con resultados hallados en estudios anteriores, como el realizado por Abad (2009) el cual realizó un estudio in vitro de los microorganismos: *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* frente a sustancias de origen natural como *Piper angustifolium* (Matico) utilizando diferentes concentraciones de los extractos metanólicos (10ug/ml, 100 ug/ml, 1000 ug/ml) para determinar su inhibición, obteniendo como resultado que *Piper angustifolium* tuvo un halo de inhibición de 8 mm sobre *S. aureus* y un halo de inhibición no reactivo frente a *P. aeruginosa*, por ende concluyeron que *Piper angustifolium* (Matico) no tiene ningún efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* ²⁰.

Ruiz et al (2009) investigaron la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de diferentes plantas del nororiente peruano entre ellos *Piper angustifolium* frente a las bacterias *Staphylococcus*



aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*; y los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporium cani*; la actividad antimicrobiana fue medida como el diámetro (mm) de halo de inhibición del crecimiento bacteriano, el halo de inhibición contra *Staphylococcus aureus* fue 21 mm de promedio (extracto etanólico 20mm, metanólico 23 mm e hidroalcohólico 21 mm) siendo sumamente sensible, así estos datos se correlacionan con nuestros resultados con respecto a *Staphylococcus aureus*; sin embargo nuestros datos se contraponen en relación a *Pseudomonas aeruginosa* en donde el halo de inhibición no fue reactivo en ninguno de los extractos, por lo tanto concluyeron que *Piper angustifolium* tiene efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, pero no presenta ningún efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Según el estudio este efecto antibacteriano de *Piper angustifolium* sería debido a la presencia entre sus componentes de taninos y compuestos fenólicos²¹.

Semejantes resultados obtuvo Palacios (2009) en donde evaluó 4 plantas medicinales entre ellas *Piper angustifolium* frente a diferentes microorganismos como bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Proteus vulgaris*) y hongos (*Trichophyton rubrum*); para ello utilizó extractos metanólicos a 4 concentraciones 10 uL, 5 uL, 2 uL, 1 uL, obteniendo como resultados que el *Piper angustifolium* tiene una gran actividad antifúngica frente al hongo dermatofito *Trichophyton rubrum*, mientras que presenta una mediana actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*; ya que presentó un halo de inhibición de 14 mm con una CMI de 5 uL, sin embargo no tuvo ninguna capacidad inhibitoria frente bacterias Gram negativas (*Proteus vulgaris*), según el



estudio el carácter antibacteriano de *Piper angustifolium* se le atribuye debido a que esta planta presenta lignanos y flavonoides ¹⁹.

Otro estudio que se correlaciona con nuestros resultados con respecto a *Staphylococcus aureus* es el realizado por Zuta (2014) en el cual evaluó el efecto antibacteriano in vitro de extracto de *Piper angustifolium* (Matico) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a diferentes concentraciones (25 %, 50%, 75%, 100%) obteniendo como resultado que la concentración del 100 % de *Piper angustifolium* mostro una actividad antibacteriana significativa en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, y que a concentraciones menores del extracto en estudio el efecto antibacteriano no fue significativo²², los resultados se correlacionan con los de nuestro estudio donde la CMI fue al 100 %.



V. CONCLUSIONES.

- El aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) si tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.
- La concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) fue al 100% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.
- La concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) fue del 75% frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aislar los principios activos de *Piper angustifolium* (Matico) responsables de su actividad antimicrobiana.
- Se recomienda realizar otros tipos de estudio con *Piper angustifolium* (Matico) para comparar con el aceite esencial y determinar la variedad de su actividad antimicrobiana,
- Se recomienda realizar estudios in vivo para valorar la efectividad y toxicidad que podrían producir componentes activos de *Piper angustifolium* (Matico), obteniendo dosis terapéuticas para la población humana, en sus diferentes presentaciones.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Echevarria J, Iglesias D. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered. 2003; 14(4): 195-203.
2. Chinchá O, Cornelio E, Valverde V y Acevedo M. Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. Rev. Perú med. 2013; 30(4): 616-620.
3. Ávila E. Identificación y caracterización de *Staphylococcus Aureus* meticilino resistente (SARM) en personal de las unidades de terapia intensiva del Hospital Regional Docente de Trujillo-La Libertad-2013. Pueblo Cont.2013; 24(2): 343-348.
4. Castellano M, Bermúdez E, Perozo A, Camacho L, Harris B y Ginestre M. *Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2005; 25(2).
5. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J and Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(5): 909-914.
6. Mamani E, Luja D y Pajuelo G. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. An. Fac Med. 2006; 67(2): 120-124.
7. Leveque Y, Morris H, Calàs N. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. Revista Cubana de Medicina. 2006;45(1):



8. Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol* 2000; 31 (4): 247-256.
9. Ramírez R, Mojica D. Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx. contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Col. Inv. Sal.* 2014; 1(1):63-71.
10. Valarmathy K, Gokulakrishnan M, Salma M, Paul K. A Study of Antimicrobial Activity of Ethanolic Extracts of Various Plant Leaves against Selected Microbial Species. *IJPSR* 2010; 1(8): 293-295.
11. Hassan A, Rahman S, Deebe F, Mahmud S. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. *J Med Plant Res* 2009; 3(1):20-23.
12. Gibbons S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 2008; 74: 594-602.
13. Soto M, Soto K, Serrano A. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. (Polemoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas” *Arnaldoa* 2014; 21 (1): 81 – 90
14. Lazo C. Efecto de un Extracto Seco de Matico (BG126) sobre el daño oxidativo inducido por Biorreducción De Nitrofurantoína [Tesis], Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2010



15. Arroyo J. Chávez R, Anampa A, Donaires R, Ráez J. Protective Effect of Piper aduncum Capsule on DMBAinduced Breast Cancer in Rats. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 2015; 9:41–48
16. Arroyo J, Bonilla P, Moreno L, Ronceros G, Tomás G, Huamán J, et al. Efecto gastroprotector y antisecretor de un fitofármaco de hojas de matico (*Piper aduncum*). *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2013, 30(4): 608-615.
17. Dousseau S, De Souza I, De Castro E, Alves A, Alves E, Brasil J, et al. Caracterización del limbo de *Piper aduncum* L. (Piperaceae): Análisisestructurales, histoquímicos y de sus aceites esenciales. *Gayana Bot*. 2014; 71(1): 147-162
18. Chang L, García A, Rosabal Y, Espinosa A, Ramos M, Remon H. Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos dehojas y tallos de *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Rev Mex Cienc Farm*.2013; 44 (4):30-35.
19. Palacios Chamba D. Aplicación de métodos bioautográficos para la identificación de compuestos antimicrobianos en extractos totales de cuatro especies vegetales de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper sp.*, *Piper ecuadorensis* (matico), *Lepechinia mutica Benth* (turuyante), *Niphogeton dissecta* (culantrillo del cerro). [Tesis de grado]. Loja: Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Católica de Loja; 2009.
20. Abad Albán X. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorensis* (matico), *Lepechinia mutica Benth* (turuyante), *Fuschia ayavacensis* (pena-pena), *Niphogeton dissecta* (culantrillo del cerro),



- empleando los métodos de difusión en placa, concentración mínima inhibitoria e inhibición del crecimiento radial. [Tesis de grado]. Loja: Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Católica de Loja; 2009.
21. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-orientes peruano. *Ciencia e Investigación*. 2009; 12(1): 41-47.
22. Zuta Arriola N. Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de *Piper angustifolium* (matico) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple [Tesis doctoral]. Lima: Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Callao; 2014.
23. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba. 2002.
24. Albarracín G., Gallo S. Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia de Manizales Ingeniería Química. 2003.
25. Arteaga Damazón J. Efecto antibacteriano “in vitro” el aceite esencial de *Piper angustifolium* (Matico) sobre *Streptococcus pyogenes* Grupo A. [Tesis para obtener grado de bachiller]. Trujillo: Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo; 2016.
26. Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Alkyl G. Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2): 549-555.
27. Duraffourd C, D’hervicourt, Lapraz J. Cuaderno de fitoterapia Clínica. Barcelona: Masson, 1987.



28. Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo. Río de Janeiro Río; 3-14 de junio de 1992. Río de Janeiro: Departamento de Asuntos Económicos y Sociales. División del Desarrollo Sostenible. Organización Mundial de la Salud. 1992.
29. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Nairobi; mayo de 1992 Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2000

Biblioteca de Medicina



VIII. ANEXOS



Anexo N°01

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA

Yo, ELVA MEJÍA DELGADO, Profesora Principal Nombrada a tiempo Completo del Departamento Académico de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

CERTIFICO

*Haber corroborado con las mediciones, de las Unidades Formadoras de Colonias y diámetros de halos de inhibición de 12 placas Petri elegidas aleatoriamente, obtenidas por la investigadora del trabajo de tesis : **Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Piper angustifolium (matico) en cepas de Staphylococcus aureus metilino resistente y Pseudomonas aeruginosa, cuyo autor es la Estudiante de Pregrado Sandra Pamela Chuquimango Fuentes, identificada con DNI. N° 46851094; Carnet Universitario N° 1021801112, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.***

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 31 de julio de 2017

Dra. ELVA MEJÍA DELGADO

Experto



Anexo N° 02

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA

*Yo, **JULIO CARRANZA**, Profesor Principal Nombrad a Tiempo Completo del Departamento Académico de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.*

CERTIFICO

*Haber corroborado con las mediciones de las Unidades Formadoras de Colonias y diámetros de halos de inhibición de 12 placas Petri elegidas aleatoriamente obtenidas por la investigadora del trabajo de tesis : **Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Piper angustifolium (matico) en cepas de Staphylococcus aureus meticilino resistente y Pseudomonas aeruginosa, cuyo autor es la Estudiante de Pregrado Sandra Pamela Chuquimango Fuentes, identificada con DNI. N° 46851094; Carnet Universitario N° 1021801112, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.***

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 31 de julio de 2017

Dr. JULIO CARRANZA

Experto



Anexo N°03

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA

Yo, MARCO ZARATE ARCE, Profesor Principal Nombrad a Tiempo Completo del Departamento Académico de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

CERTIFICO

*Haber corroborado con las mediciones, de las Unidades Formadoras de Colonias y diámetros de halos de inhibición de 12 placas Petri elegidas aleatoriamente, obtenidas por la investigadora del trabajo de tesis : **Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Piper angustifolium (matico) en cepas de Staphylococcus aureus metilino resistente y Pseudomonas aeruginosa, cuyo autor es la Estudiante de Pregrado Sandra Pamela Chuquimango Fuentes, identificada con DNI. N° 46851094; Carnet Universitario N° 1021801112, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.***

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 31 de julio de 2017

Dr. MARCO ZARATE ARCE

Experto



Anexo N° 04 Diámetros de halos de inhibición en mm en función a cuatro concentraciones de *Piper angustifolium* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente Control: Vancomicina (control positivo), Tween 80 (control negativo)

Medición de los halos de inhibición de <i>Piper angustifolium</i>						
N° de repetición	Concentración del aceite esencial de <i>Piper angustifolium</i>				Control negativo (mm)	Control positivo (mm)
	25% (mm)	50% (mm)	75% (mm)	100% (mm)	Tween 80	vancomicina
1	12	13	15	29	6	19
2	11	9	15	25	6	19
3	13	14	18	30	6	19
4	10	11	17	26	6	19
5	9	15	29	20	6	19
6	12	13	18	23	6	19
7	12	11	20	31	6	19
8	11	13	21	24	6	19



9	12	12	19	30	6	19
10	16	12	23	32	6	19
11	11	16	23	27	6	19
12	12	13	23	31	6	19
Promedio	11.8	12.7	20.1	27.3	6	19

Biblioteca de Medicina



Anexo N° 05 Diámetros de halos de inhibición en mm en función a cuatro concentraciones de *Piper angustifolium* sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Control: Imipenem (control positivo), Tween 80 (control negativo)

		Medición de los halos de inhibición de <i>Piper angustifolium</i>				
N° de repeticiones	Concentración del aceite esencial de <i>Piper angustifolium</i>				Control negativo (mm)	Control positivo (mm)
	25% (mm)	50% (mm)	75% (mm)	100% (mm)	Tween 80	Imipenem
1	12	14	13	14	6	16
2	13	18	11	18	6	16
3	14	19	13	16	6	16
4	13	16	8	16	6	16
5	10	12	13	16	6	16
6	12	11	14	14	6	16
7	11	10	14	16	6	16
8	10	11	11	14	6	16
9	12	10	11	22	6	16



10	11	10	14	22	6	16
11	11	12	13	16	6	16
12	10	10	11	18	6	16
Promedio	11.6	12.8	12.2	16.8	6	16

Biblioteca de Medicina



Anexo N° 06: UFC cuatro concentraciones del aceite esencial de *Piper angustifolium* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y Control: Vancomicina (control positivo), Tween 80 (control negativo)

N° de Repetición	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA					
	<i>Piper angustifolium</i> "Matico"					
	25% UFC/ml	50% UFC/ml	75% UFC/ml	100% UFC/ml	Control negativo (tween 80)	Control positivo (vancomicina)
1	121	17	2	0	10 ⁶	0
2	103	10	0	0	10 ⁶	0
3	102	10	0	0	10 ⁶	0
4	80	84	1	0	10 ⁶	0
5	83	8	2	0	10 ⁶	0
6	64	8	0	0	10 ⁶	0
7	130	13	0	0	10 ⁶	0
8	103	11	0	0	10 ⁶	0
9	81	17	0	0	10 ⁶	0
10	127	21	0	0	10 ⁶	0



11	110	10	0	0	10⁶	0
PROM	100.36	19	0.45	0	10⁶	0

Biblioteca de Medicina



Anexo N° 07: UFC cuatro concentraciones del aceite esencial de *Piper angustifolium* sobre *Pseudomonas aeruginosa* Control: Imipenem (control positivo, Tween 80 (control negativo))

N° de Repetición	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA					
	<i>Piper angustifolium</i> "Matico"					
	25% UFC/ml	50% UFC/ml	75% UFC/ml	100% UFC/ml	Control negativo (Tween 80)	Control positivo (Imipenem)
1	196	53	0	0	10 ⁶	0
2	225	86	0	0	10 ⁶	0
3	188	76	0	0	10 ⁶	0
4	175	117	0	0	10 ⁶	0
5	249	93	0	0	10 ⁶	0
6	227	62	0	0	10 ⁶	0
7	268	83	0	0	10 ⁶	0
8	225	67	0	0	10 ⁶	0
9	203	55	0	0	10 ⁶	0
10	199	121	0	0	10 ⁶	0



11	246	96	0	0	10⁶	0
PROM	218.27	82.64	0	0	10⁶	0

Biblioteca de Medicina



ANEXO N° 08

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA

CONSTANCIA DE ASESORIA

Yo, ELVA MEJÍA DELGADO, Profesora Principal Nombrada a Tiempo Completo del Departamento Académico de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

CERTIFICO

*Ser asesora de la Tesis titulada: **Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Piper angustifolium (matico) en cepas de Staphylococcus aureus meticilino resistente y Pseudomonas aeruginosa**, cuyo autor es la Estudiante de Pregrado **Sandra Pamela Chuquimango Fuentes**, identificada con DNI. N° 46851094; Carnet Universitario N° 1021801112, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.*

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 31 de julio de 2017

Dra. ELVA MEJÍA DELGADO

Asesora



ANEXO N°09

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE MEDICINA
Unidad de Investigación
CARRERA DE MEDICINA ACREDITADA



Resolución de Presidencia del Consejo Directivo Ad Hoc N° 029-2015 COSUSINEACE/CDAH-P de fecha 12.02.2015

P.I.B – MED. 0083 - 016

CONSTANCIA

La Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina-UNT, ha APROBADO el Proyecto de Investigación titulado:

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper angustifolium* (MATICO) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE Y *Pseudomonas aeruginosa*”.

PRESENTADO POR LA ALUMNA DE MEDICINA:

**SANDRA PAMELA
CHUQUIMANGO FUENTES**

El proyecto puede seguir con el trámite establecido.

Trujillo, 12 de Octubre del 2016

 **DR. PEDRO GABRIEL ALDAVE PAREDES**
Director
Unidad de Investigación
Facultad de Medicina-UNT

FECHA DE PRESENTACION DE INFORME DE AVANCE: **12 DE ENERO DE 2017**
LUGAR: **OFICINA DE INVESTIGACIÓN – FACULTAD DE MEDICINA**

Jr. Salaverry 545 – Trujillo - Teléfono: 044-232131 (Anexo 109)
e-mail: cpi_medunt@hotmail.com cpimed@hotmail.com





ANEXO N° 10

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE MEDICINA
Unidad de Investigación
CARRERA DE MEDICINA ACREDITADA

Resolución de Presidencia del Consejo Directivo del H.º N.º 029-2013 COM-SIN-EAC/CDH.º P. de fecha 11.02.2013

CONSTANCIA

La Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina-UNT, hace Constar que la alumna de Medicina:

**SANDRA PAMELA
CHUQUIMANGO FUENTES**

Ha presentado el **INFORME DE AVANCE** de su Proyecto de Investigación:

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper angustifolium* (MATICO) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE Y *Pseudomonas aeruginosa*”.

PRESENTACIÓN DE INFORME FINAL: 14 DE AGOSTO DE 2017

Trujillo, 14 de Marzo de 2017


Dr. JULIO HILARIO VARGAS
Director
Unidad de Investigación
Facultad de Medicina UNT



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
HERBARIO TRUXILLENSE (HUT)
FLORA PERUANA

Familia: Piperaceae

Nombre científico: *Piper aduncum* L. o *Piper angustifolium* Lam.

Leg: Chuquimango Fuentes Sandra Pamela

(Alumna de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo)

Código: 59197-59198







IX. ANEXOS DE LA EVALUACION DE LA TESIS :

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DEL INFORME FINAL DE

LOS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN EN LA FACULTAD

DE MEDICINA DE LA UNT

Aspectos	Puntajes
1. TITULO	
a. Contiene las variables del problema de investigación. No es mayor a quince palabras.	1
b. El título refiere de manera general las variables del problema. Tiene más de 15 palabras	0.5
c. El título no refleja el contenido del trabajo.	0.1
2. RESUMEN	
a. Tiene no más de 200 palabras y palabras clave.	0.5
b. Tiene más de 200 palabras y palabras clave.	0.3
c. Tiene más de 200 palabras o no tiene palabras clave.	0.1
3. ABSTRACT	
a. Tiene no más de 200 palabras y palabras clave con correcto uso del idioma inglés.	0.5
b. Tiene más de 200 palabras y palabras clave con correcto uso del idioma inglés.	0.3
c. Tiene más de 200 palabras en idioma inglés o no tiene palabras clave o uso incorrecto del idioma inglés.	0.1
4. INTRODUCCIÓN	
a. Se basa en antecedentes de conocimientos previos, presenta el problema con sustento, la hipótesis es coherente con el problema y objetivos.	3.5
b. Se basa en antecedentes de conocimientos previos, el problema no está bien sustentado o la hipótesis no es coherente con el problema y/o objetivos.	2
c. Se basa en antecedentes de conocimientos previos. No presenta problema y/u objetivos.	1
5. MATERIAL Y MÉTODO	
a. La muestra recolectada es representativa, adecuada y plantea un diseño experimental apropiado a la solución del problema.	3
b. La muestra recolectada es representativa, adecuada y no plantea un diseño experimental apropiado a la solución del problema.	2
c. La muestra recolectada no es representativa, ni adecuada.	1
6. RESULTADOS	



a. Presenta los resultados en forma sistemática en función de las variables del problema e incluye pruebas estadísticas, figuras y tablas de acuerdo a las normas internacionales.	4
b. Presenta los resultados en forma sistemática en función de las variables del problema. No incluye pruebas estadísticas, figuras y tablas de acuerdo a las normas internacionales.	2
c. No presenta los resultados en forma sistemática en función de las variables del problema.	1
7. ANALISIS Y DISCUSION	
a. Discute cada uno de los resultados para probar su validez y contrasta con las pruebas estadísticas mencionadas en los resultados. Busca generalizaciones y establecer las posibles implicancias de los nuevos conocimientos.	4
b. Discute algunos resultados para probar su validez y no contrasta con las pruebas estadísticas mencionadas en los resultados. Busca generalizaciones y establecer las posibles implicancias de los nuevos conocimientos.	2
c. Discute algunos resultados para probar su validez y no contrasta con las pruebas estadísticas mencionadas en los resultados. No busca	1
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
a. Replantea sumariamente el problema y las características de la muestra. Formula conclusiones lógicas y emite recomendaciones viables.	2
b. Replantea sumariamente el problema y las características de la muestra. No formula conclusiones lógicas o no emite recomendaciones viables.	1
c. No replantea sumariamente el problema, ni las características de la muestra.	0.5
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
a. Presentan citas justificables y asentadas de acuerdo a un solo sistema de referencia bibliográfica reconocido internacionalmente	1
b. No presenta citas justificables que están asentadas de acuerdo a un solo sistema de referencia bibliográfica reconocido internacionalmente	0.5
c. Presenta citas que no se justifican o usa más de un sistema de referencia bibliográfica reconocido internacionalmente	0.2
10. APÉNDICE Y ANEXOS.	
a. Presentar valores ordenados sistemáticamente de acuerdo a las normas internacionales.	0.5
b. Presentar valores desordenados, pero de acuerdo a las normas internacionales.	0.3
c. Presentar valores desordenados que no están de acuerdo a las normas internacionales	0.1
CALIFICACIÓN DEL INFORME FINAL	



CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA DEFENSA DE LA TESIS EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNT

Aspectos	Puntajes
1. EXPOSICIÓN	
a. Formalidad lógica, lingüística y metodológica y uso adecuado de	5
b. Exposición con formalidad lógica lingüística y metodológica pero no hace uso adecuado de los medios audiovisuales	3
c. Incongruencia en la formalidad lógica, lingüística y metodológica y uso inadecuado de medios audiovisuales.	1
2. CONOCIMIENTO DEL TEMA	
a. Fluidez, dominio del tema y suficiente en responder preguntas	5
b. Fluidez, dominio del tema pero lentitud e inseguridad en las	3
c. No dominio del Tema, respuestas contradictorias o no responde	1
3. RELEVANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	
a. Relevancia completa de las conclusiones en la salud.	4
b. Relevancia parcial.	2
c. Ninguna relevancia	1
4. ORIGINALIDAD	
a. Original.	4
b. Repetitivo en nuevo ámbito	2
c. Repetitivo	1
5. FORMALIDAD	
a. Presentación personal formal acorde con el acto académico.	2
b. Presentación formal pero no acorde con el acto académico.	1
c. Presentación informal	0.5
CALIFICACION DE LA DEFENSA DE LA TESIS	

CALIFICACION DEL INFORME FINAL (A):

 x 3 =

CALIFICACION DE LA DEFENSA DE LA TESIS (B):

 x 1 =

SUBTOTAL(A+B) / 4 = NOTA

NOTA:

Jurado:



IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS:

Nombre:

Autor:

CALIFICACIÓN FINAL:

(Promedio de las 03 notas del Jurado)

JURADO:	Nombre	Código Docente	Firma
Presidente:	Dr.....
Grado Académico:		
Secretario:	Dr.....
Grado Académico:		
Miembro:	Dr.....
Grado Académico:		



EVALUACIÓN DE LA TESIS

El Jurado deberá consignar las observaciones y objeciones pertinentes, si los hay, relacionados a los siguientes ítems:

TESIS:.....

.....

TÍTULO:.....

RESUMEN:.....

.....

ABSTRACT:.....

.....

INTRODUCCIÓN:.....

.....

MATERIAL Y MÉTODOS:

.....

.....

.....

RESULTADOS:.....

.....

.....

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN:

.....

.....

.....

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

.....

.....

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

.....

.....

ANEXOS:

.....

.....

Nombre

Firma



RESPUESTAS DE TESIS A OBSERVACIONES DEL JURADO

El Tesisista deberá responder en forma concreta de las observaciones del jurado a manuscrito en el espacio correspondiente:

- a) *Fundamentando su discrepancia.*
- b) *Si está de acuerdo con la observación también registrarla.*
- c) *Firmar.*

TESIS:.....

.....

.....

FUNDAMENTACIÓN:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Nombre

Firma



CONSTANCIA DE REVISIÓN DE INFORME FINAL DE TESIS

CÓDIGO: P.I.B.-MED. 0073-016

Trujillo, 31 de julio del 2017

Por le presente, yo, **MEJÍA DELGADO ELVA MANUELA**, docente del Departamento Académico de Ciencias Básicas – Sección de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, **ASESORA** de la tesis titulada: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “in vitro” EL ACEITE ESENCIAL DE *Piper angustifolium* (MATICO) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE Y *Pseudomonas aeruginosa*”; cuya autora es CHUQUIMANGO FUENTES SANDRA PAMELA, alumna de la Escuela de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, identificado con D.N.I. 46851094 y número de matrícula 1021801112, dejo constancia de que he revisado esta tesis y que el informe final se encuentra terminado, por lo cual el autor se encuentra en condiciones de iniciar el proceso para su sustentación.

Se expide el presente, a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente

Atentamente:

Dra. Mejía Delgado Elva Manuela
Asesora
Código docente: 3147



Biblioteca de Medicina