



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN
VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Piper
auritum* (HIERBA SANTA) SOBRE CULTIVOS DE
*Staphylococcus aureus***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR

RODRIGUEZ ORTIZ, ERMIN MERSELITO

ORCID: 0000-0002-6959-0681

ASESOR

LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO

ORCID: 0000-0003-4125-3381

TRUJILLO – PERÚ

2021

EQUIPO DE TRABAJO

AUTOR

Rodriguez Ortiz, Ermin Merselito

ORCID: 0000-0002-6959-0681

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Estudiante de pregrado
Trujillo, Perú.

ASESOR

Leal Vera, César Alfredo

ORCID ID: 0000-0003-4125-3381

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Facultad de Ciencias de la
Salud. Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica. Trujillo, Perú.

JURADO

Ramírez Romero, Teodoro Walter

ORCID: 0000-0002-2809-709X

Arteaga Revilla, Nilda María

ORCID: 0000-0002-7897-8151

Matos Inga, Matilde Anais

ORCID: 0000-0002-3999-8491

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Mgtr. Teodoro Walter Ramírez Romero

Presidente

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

Miembro

Mgtr. Matilde Anais Matos Inga

Miembro

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

Asesor

AGRADECIMIENTO

A DIOS

Quien permitió llegar hasta esta etapa de mi vida y poder desarrollar este trabajo de investigación, por cuidar de mí y de mi familia, por ser la fortaleza y el ejemplo de transcendencia de mi vida.

A MIS PADRES

Por su apoyo incondicional, por su comprensión, sus sabios consejos y orientaciones que me permitieron desenvolverme en este camino de la vida.

A MIS DOCENTES

Que, con sus grandes conocimientos, dedicación y consejos, fueron razones de motivación, que hicieron posible la realización del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Por su apoyo incondicional, sabios consejos, por su confianza en mí y que día a día guían mi camino para seguir adelante siempre con optimismo.

A MIS HERMANOS

Por su gran apoyo y confianza en mi persona, por brindarme sus sabios consejos, los cuales son de mi gran consideración y gratitud a cada uno de

RESUMEN

La presente investigación fue de tipo experimental, de nivel explicativo, con enfoque cuantitativo de razón y de corte transversal observacional. Se realizó con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* expresados en halos de inhibición bacteriana (tamaño en mm). Se trabajó con cultivos rejuvenecidos de *Staphylococcus aureus*; la droga vegetal se obtuvo del Distrito de Lucma, Provincia de Gran Chimú, Departamento de La Libertad. La extracción del aceite esencial fue obtenida por el método de hidrodestilación en el equipo clevenger; obteniéndose 1.3ml, con un rendimiento de 0.028ml cada 100g de hojas, el mismo que fue usado para obtener las concentraciones del 25% y 50% usando dimetilsulfóxido (disolvente orgánico). La evaluación de la actividad antibacteriana fue realizada por el método de Kirby Bauer, usando 20 placas Petri y divididas en tres grupos: blanco (conteniendo suero fisiológico), experimental 1 (conteniendo el A.E al 25%) y experimental 2 (conteniendo el A.E al 50%). Los resultados obtenidos, fueron tomados de las mediciones de los halos de inhibición bacteriana, y aplicando el plan de análisis de resultado de ANOVA y T-student, se determinó que en la concentración del 25% obtuvo 13.45 ± 0.60 y la concentración del 50% se obtuvo 16.65 ± 0.74 , con una significancia < 0.05 . Se determinó que el aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* presenta efecto antibacteriano in vitro sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y que el extracto del 50% presenta mayor actividad antibacteriana en comparación del extracto del 25%.

Palabras clave: Aceite esencial, *Piper auritum*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The present investigation was experimental, explanatory level, with a quantitative approach of reason and an observational cut. It was carried out with the objective of determining the effect antibacterial in vitro of the oil essential of *Piper auritum* (holy grass) leaves on *Staphylococcus aureus* cultures expressed in halos inhibition bacterial (size in mm). We work with cultures of *Staphylococcus aureus* rejuvenated; The drug vegetable was obtained in the district of Lucma, province of Gran Chimú, department of La Libertad. The extraction of the oil essential was obtained by method hydrodistillation in the equipment clevenger; obtaining 1.3ml, with a yield of 0.028ml per 100g of leaves, the same that was used to obtain the concentrations of 25% and 50% using dimethylsulfoxide (solvent organic). The evaluation of activity antibacterial was carried out by the method Kirby Bauer, using 20 Petri and divided into three groups: blank (containing serum physiological), experimental 1 (containing 25% OE) and experimental 2 (containing 50% by OE). %. The results obtained were taken from the measurements of the halos inhibition bacterial, and applying the analysis plan of the results of ANOVA and T-student, it was determined that in the concentration of 25%, 13.45 ± 0.60 and the 50% concentration. 16.65 ± 0.74 was obtained, with a significance <0.05 . It was determined that the oil essential of the leaves of *Piper auritum* has an antibacterial effect in vitro on cultures *Staphylococcus aureus* and that the extract of 50% has higher activity antibacterial compared to the extract 25%.

Keywords: Oil essential, *Piper auritum*, *Staphylococcus aureus*.

CONTENIDO

EQUIPO DE TRABAJO	ii
JURADO EVALUADOR DE TESIS	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	8
2.1. Antecedentes	8
2.2. Bases teóricas	13
III. HIPÓTESIS	17
IV. METODOLOGÍA	18
4.1. Diseño de la investigación	18
4.2. Población y muestra	19
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores	20
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	21
4.5. Plan de análisis	25
4.6. Matriz de consistencia	26
4.7. Principios éticos	27
V. RESULTADOS	28
5.1. Resultados	28
5.2. Análisis de resultados	29
VI. CONCLUSIONES	31
ASPECTOS COMPLEMENTARIOS	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 01: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* 28

TABLA 02: Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* (hierba santa) a concentraciones del 25% y el 50% sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* 28

ÍNDICE DE GRÁFICOS

FIGURA 01: Diseño de la investigación	37
FIGURA 02: <i>Piper auritum</i> (hierba santa)	37
FIGURA 03: Concentración del aceite esencial de <i>Piper auritum</i> (Hierba santa)	38
FIGURA 04: Sembrado del <i>Staphylococcus aureus</i>	38
FIGURA 05: Incubación de las placas sembradas, conteniendo el disco impregnado del aceite esencial al 25% y 50%	39
FIGURA 06: Resultado del efecto antibacteriano	39
FIGURA 07: Certificado de <i>Piper auritum</i>	40
FIGURA 08: Prueba ANOVA	40
FIGURA 09: Prueba T-student	41

I. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales desde sus inicios, ha formado una de las principales fuentes de la medicina y esto a través de sus generaciones en la historia; en la actualidad, el uso de plantas medicinales ha sido considerada como parte del tratamiento o prevención de una variedad de enfermedades, incluidas las de origen infeccioso. Hoy en día forma parte de un gran desafío en la medicina y hace relevancia como alternativa en el tratamiento de diversas patologías, especialmente en aquellas patologías en las que no se mantiene o no existe un tratamiento adecuado. La OMS y la OPS ha reconocido a la medicina tradicional como una significativa alternativa en la respuesta en la atención de salud en diferentes países de américa latina ^(1,2).

El uso de plantas medicinales ha sido puesto en práctica hace muchas generaciones; la gran variedad de las mismas, ha sido considerada como un gran recurso y materia disponible en las actividades médicas, este concepto ha permitido profundizar los conocimientos en el manejo de vegetales con propiedades curativas. La ONU describe que el 80% de los países en desarrollo dependen del uso de plantas medicinales para cubrir sus necesidades de atención primaria ⁽³⁾.

Perú es el tercer país en el mundo considerado por ser el poseedor de una gran diversidad de plantas y el aportante de aproximadamente 2000 variedades de plantas medicinales representados por el 20% (50000) de las especies a nivel mundial. El uso de las plantas medicinales es considerado como el aportante de gran importancia en la solución de los

problemas de salud, sobre todo los de origen infeccioso, lo cual se vería representaría en la reducción de la morbilidad y mortalidad en la población ⁽⁴⁾.

Los metabolitos secundarios forman parte de los principios activos de una gran variedad de plantas y su particularidad, dentro de ello los aceites esenciales. Siendo el caso, un estudio microbiológico y químico del aceite esencial de *Piper auritum*, se logró identificar compuestos hidrocarburos tanto monoterpénicos como sesquiterpénicos, compuestos oxigenados representados en una mayor proporción, específicamente al monoterpene oxigenado safrol y como componentes minoritarios al g-terpineno, a-terpinoleno, b-pineno, a-terpineno, a-pineno y trans-cariofileno ⁽⁵⁾.

La familia de las *Piperaceas* son materia de estudios biológicos y fitoquímicos, basado en sus innumerables aplicaciones etnobotánicas, además de poseer una particularidad en el beneficio de tratamiento como antibacterianos, antimicóticas y antivirales. Existe evidencia asociado a la actividad antimicrobiana, en el control de agentes etiológicos como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona putida*, *Echericha coli* y hongos tales como *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* ⁽⁶⁾.

Piper auritum es una especie semileñosa que se desarrolla en suelo arenoso y húmedo, a 20 y 22 °C de temperatura, raramente se desarrolla fuera de las zonas de origen; aunque en la base de cada vástago presenta raíces, las mismas que al tener las mismas condiciones que en la que la semilla, puede desarrollarse y expandirse exitosamente ⁽⁷⁾.

Las hojas frescas suelen usarse en la cocina como ingrediente para aromatizar los platos y envolver carnes para su cocción. Las hojas presentan concentraciones elevadas de Safrol, el responsable de su típico aroma y el mismo compuesto toxico sospechoso ser canceroso, su empleo no es aconsejable o en lo posible evitar el exceso; por otra parte, desde hace mucho tiempo ha sido empleado en la medicina popular como una opción en el tratamiento de distintas patologías ⁽⁶⁾.

El género *Piper* tiene un amplio uso en la medicina tradicional, en tratamientos antimicrobianos, vaginitis, alteraciones en la digestión, los metabolitos secundarios extraídos de este género, ha mostrado actividad insecticida, anti-fúngica, estimulante, bactericida y citotóxica. El uso de sus aceites esenciales presenta actividad inhibitoria ante el crecimiento de agentes causantes de infecciones en el ser humano, plantas y animales; particularmente presentan actividades antimicóticas, antibacterianas, y antivirales ⁽⁵⁾.

En cuanto a sus aceites esenciales, existe evidencia asociada a sus propiedades antibacterianas de especies como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Neumann*. La acción del aceite esencial frente a bacterias fitopatógenas presenta menos estudios, pero se informó su efecto sobre la actividad de *Xanthomonas albilineans* (responsable de la escaldadura foliar) y *Acidovorax avenae*. El estudio de los aceites esenciales del genero *Piper* han demostrado su gran actividad sobre microorganismos que afectan a la salud humana y en el control de plagas ^(4,6).

Staphylococcus aureus es un microorganismo altamente patógeno; tiene la capacidad de colonizar piel y mucosas, dando origen a afecciones superficiales tales como los abscesos;

además se le reatribuye la responsabilidad de ser el causante de la endocarditis y osteomielitis. Se sabe que tiene la capacidad de colonizar en tracto urinario y vías respiratorias, por tanto, se considera que guarda una estrecha relación con la gran mayoría de infecciones nosocomiales ⁽⁸⁾.

Staphylococcus aureus presenta un gran potencial para producir toxinas y considerado como el precursor de las complicaciones patógenas. Puede invadir cualquier tejido u órgano, las cuales se ven traducidas en supuraciones, necrosis tisular, bacteriemia y trombosis vascular. *Staphylococcus aureus* puede evolucionar y crear mecanismos de resistencia a antibióticos usados en monoterapia ⁽⁹⁾.

La diversidad patógena que posee *Staphylococcus aureus*, posiblemente se debe al aporte genético que presenta, la cuales logran condicionar y dar resistencia frente a antimicrobianos, facilitando su colonización y adaptación, manteniéndose en distintos tejidos celulares durante la infección, además de otros factores que codifican su plasticidad genética y virulencia, lo cual brinda rápida una progresión bajo condiciones ambientales, permitiendo mejor adaptación al hospedero ^(8,9).

Los factores de virulencia de *Staphylococcus* contribuyen a su capacidad de adaptación y originar enfermedades; la mayoría de estas cepas son productoras de Cititoxinas y enzimas; entre ellas, las hemolisisnas (alfa, beta, gama y delta), proteasas, lipasas, nucleasas, hialurinidasa y colagenasa. La función esencial de estas proteínas estaría implicada en la degradación de los tejidos afectados en la única necesidad de convertirlas en sus propios nutrientes, permitiendo sus colonización y permanencia en el huésped ⁽¹⁰⁾.

Existe una gran proporción de *Staphylococcus aureus* que son productoras de betalactamasas, las mismas que inactivan a la acción de penicilinas. El uso de antibacterianos tales como los carbapenems en primer orden, continuados de la asociación de penicilinas e inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto Cefoncid), tercera generación (Ceftriaxona y Cefotaxima), en última instancia Cefixima, Cefoncid, Ceftibuteno, Cefrazidima y Cefoxitina, son empleados en el tratamiento farmacológico de infecciones originadas por *Staphylococcus aureus* ⁽⁹⁾.

Las recomendaciones de los expertos indican que el uso de Clindamicina puede ser útil en el tratamiento empírico en el caso de infecciones por *Staphylococcus aureus*, esto hasta poder tener un resultado del antibiograma para indicar el tratamiento más adecuado. En ciertos casos; los betalactámicos fueron los antibióticos más utilizados como parte de esquemas de tratamiento empírico, pero posteriormente en estudios clínicos se demostró la resistencia a este grupo farmacológico por acción de betalactamasas; de esta manera Clindamicina, vancomicina y rifampicina fueron los antimicrobianos comúnmente prescritos en pacientes con infección grave por *Staphylococcus aureus* ⁽⁸⁾.

El uso de plantas medicinales forman parte de un gran aliado y una gran opción en el afán de controlar ciertas infecciones y otros problemas relacionados a la salud, el empleo en muchas culturas ha permitido el perfeccionamiento en el uso de distintas plantas con propiedades medicinales, las cuales se vienen empleando para tratar enfermedades en las nuevas generaciones; esto incluye el uso de plantas como objeto de estudio que busca

determinar y comprobar la multifuncionalidad que poseen las plantas medicinales en el control del enfermedades que aquejan a gran parte de la población ^(2,5)

Staphylococcus aureus es uno de los principales microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales en la población, debido a su gran capacidad de poder colonizar en piel y mucosas, es responsable de infecciones en vías respiratorias, tracto urinario, además de ser el causante de endocarditis, osteomielitis, entre otros. Este microorganismo se encuentra en el ambiente, por lo que su exposición es prácticamente un hecho; la colonización en vías respiratorias, tracto urinario, piel y mucosas, originan posteriores infecciones que pueden conllevar hasta la muerte, ya que en muchos de los casos no se mantiene un control adecuado o simplemente pasan desapercibidos.

El presente trabajo de investigación tiene como justificación, contribuir con la población haciendo uso de una de las fuentes más extensas en nuestro ecosistema como lo son las plantas medicinales, puesto que, en muchos de los casos son usadas como una fuente alternativa al uso de medicamentos y una gran opción desde el punto de vista terapéutico y económico, ya que muchas personas de bajos recursos no cuentan con alternativas al momento de tratar el problema de salud que las aqueja o las reacciones adversas a los medicamentos presentados durante y/o después del tratamiento, es por ello que en la presente investigación, se pretende determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa). Es por ello que planteó lo siguiente:

¿Presentará efecto antibacteriano in vitro el aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*?

Objetivo general:

Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos:

1. Determinar la capacidad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* a concentraciones del 25% y 50%.
2. Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) de las concentraciones del 25% y 50% sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Valdivia et al. Cuba; 2018. El objetivo del estudio era evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de hojas y raíces de plantas de *Piper auritum*. La extracción resultante del vegetal, fue obtenido por el método de maceración hidro-alcohólica y la extracción a rotavapor; según la evaluación fitoquímica, se logró determinar terpenos, flavonoides, cumarinas, taninos, glucósidos cardiotónicos y una cantidad considerable de fenoles solubles en las hojas. Mediante el método de pocillos, se determinó la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Echericha coli* ATCC 25922 asociadas a mastitis; sin embargo, el extracto de las hojas mostro mejor efecto, lo que se deduce que presenta un gran potencial de actividad antibacteriana. Concluyéndose que los metabolitos encontrados son de gran interés farmacéutico y agropecuario, así mismo se atribuye actividad antiinflamatoria a compuestos polifenólicos solubles. En cuanto a su actividad antibacteriana, se le atribuye un gran potencial en la aplicación de tratamiento en enfermedades causadas por dichos agentes bacterianos ⁽¹¹⁾.

Chuquimango S. Trujillo – Perú; 2017. El objetivo de la investigación pretendía evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper angustifolium* (matico) en cepas de *Staphylococcus aureus*. La obtención del aceite esencia del Matico se obtuvo mediante el método por arrastre al vapor utilizándose 2500mg de hojas, del resultado obtenido, se logró separar tomando en cuenta las propiedades inmiscibilidad, para ello se empleó una pera de decantación y posteriormente se añadió sulfato de sodio anhidro, con el propósito de retirar impurezas de agua. Finalmente se filtró y almacenó a temperatura entre los 4 a

8°C; el rendimiento obtenido fue de 0,41ml por cada 100g de hoja seca (0,41%), con una densidad de 1,0746g/ml (concentraciones de 25,50, 75 y 100%). En la determinación de la concentración mínima inhibitoria se realizó mediante la técnica de difusión teniendo en cuenta las distintas concentraciones aplicada en cada placa. Los datos obtenidos en la CMI fueron al 100% frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, así como la CMB fue de 75% frente *Pseudomona aeruginosa*. Se concluyó que el aceite esencial de *Piper auritum* presenta efecto antibacteriano “in vitro” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomona aeruginosa* ⁽¹²⁾.

Arteaga F. Trujillo – Perú; 2016. El objetivo general fue estudiar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper angustifolium* (matico) sobre *Streptococcus pyogenes* aislado de hisopado faríngeo. La obtención de *Piper angustifolium* se obtuvo por el método de arrastre a vapor, usando 2.5kg de muestra del que se obtuvo un rendimiento de 0.41ml por 100g de muestra (0.41%) con densidad de 1,0746g/ml; de tal manera que de logro fraccionar a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% de aceite esencial. La determinación del efecto fue evaluada mediante la técnica de difusión de discos (Kirby Bauer). Los resultados obtenidos en los tres grupos, fueron significativamente distintas ($P < 0.05$) y según la escala de Duraffourd fue sensible en las cuatro concentraciones aplicadas, siendo el 75% (805.5mg/ml) la CMI. logrando concluir que el aceite esencial obtenido las hojas de *Piper angustifolium* tiene efecto antibacteriano en *Streptococcus pyogenes* del grupo A proveniente del hisopado faríngeo ⁽¹³⁾.

Azuero at al. Ecuador, 2016. En este estudio hace referente al análisis del efecto antimicrobiano de doce ejemplares de uso ancestral en Ecuador. El objetivo general se

basa en el análisis de especies ejemplares de uso ancestral en Ecuador, tales como *Piper carpunya* Ruiz, *Lippia citriodora* K (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* L (altamisa), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león) y *Pav* (guaviduca), *Coriandrum sativum* L (cilantro), *Melissa officinalis* L (toronjil) entre otros ejemplares; los cuales se recolectaron las hojas fueron disecadas, molidas y extraídas por maceración en metanol. La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos, mediante la técnica de difusión de disco se aprobó en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Echericha coli*, *Pseudomona aeruginosa* y en una cepa de *Candida albicans*. Obteniéndose como resultado *Piper carpunya* presenta un mayor efecto antimicrobiano contra *E. coli* ⁽¹⁴⁾.

Carrillo et al. Bolivia; 2015. Esta investigación realizada, se sustenta en la identificación de compuestos químicos de plantas que crecen en la Huasteca Potosina y establecer su concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus*, *Echericha coli* y *salmonela Typhimurium*. Las plantas consideradas fueron: *Piper auritum* (hoja santa), *Azadirachta indica* (neem), *Costus pulverulentos* (caña de puerco), *Psidium guajava* (guayaba), etc. La identificación de los componentes fue: alcaloides, esteroides, flavonoides, sesquiterpeno, lactonas, triterpenoides, cumarinas y óxidos fenólicos; para la evaluación de la actividad bacteriana, se realizó a través del método de Kirby Bauer, dando a conocer que *Staphylococcus aureus* fue más susceptible a los extractos etanólicos y *Echericha coli* con mayor resistencia a los extractos. Concluyeron que los ensayos tradicionales forman parte de obtener información acerca de la composición de los

extractos y que dichos extractos, el que mayor actividad antimicrobiana presenta son las hojas de *D. scandes* (hierba del burro) y *P. guajava* (guayaba) ⁽¹⁵⁾.

Sánchez et al. La Habana, 2013. El objetivo de investigación fue identificar los componentes que se encuentran en el aceite esencial de *Piper auritum*. A través del proceso de hidrodestilación, empleando un equipo clevenger y relacionarlos a su efecto antibacteriano sobre *Xanthomonas albilineans*. La determinación de concentración mínima y concentración máxima inhibitoria, se realizó mediante el método de difusión. La evaluación de la sensibilidad se hizo empleo del método de Kirby Bauer. Los resultados obtenidos en el estudio determinaron que la CMI (0,12mg/ml) y la CMB (0,25mg/ml), evidenciándose que la actividad frente a *Xanthomonas albilineans* fueron con la fracción 4 y 5, obteniéndose una máxima inhibición a una dosis máxima. Se concluyó que *Xanthomonas campestris pv.* fue levemente activa a la fracción 4 siendo el contenido mayoritario de safrol el responsable de su actividad antibacteriana ⁽⁶⁾.

Sánchez et al. la hablaba, 2009. El objetivo de éste estudio fue hacer un estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* a partir de las hojas y tallos. El estudio realizado se llevó a cabo mediante el equipo de hidrodestilación y un cromatógrafo de gases (Helio como gas portador) acoplado a un espectrofotómetro de masas; las bacterias fitopatógenas utilizadas fueron *Xanthomonas albilineans* y *Acidovorax avenae subsp.*, *Xanthomonas albilineans* sembrados en medio Wilbrink e incubados a 28°C por 48horas y *Acidovorax avenae subsp. avenae* sembrados en agar nutriente Biocen e incubados a 28°C por 48horas. Se evaluó la sensibilidad por el método de Kirby Bauer, utilizando las cantidades de 20, 10 y 5µL de aceite puro. Los resultados obtenidos fueron

fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides, relacionando al safrol como componente mayoritario (70 a 85% de la composición total). Concluyéndose que el empleo de plaguicidas basados en aceites esenciales sería una alternativa efectiva y ambientalmente estable para el manejo de enfermedades bacterianas a raíz de los cultivos de caña de azúcar ⁽⁵⁾.

Beltrán et al. México, 2006. del Depto. De Ingeniería Bioquímica, se realizó un estudio acerca de la Evaluación preliminar del efecto antimicrobiano del extracto de hoja santa (*Piper auritum*). Teniendo como objetivo obtener el extracto de hoja santa tierna y madura utilizando el etanol en la preparación del mismo y evaluar la actividad antimicrobiana en dos microorganismos de prueba (*Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*) para lo que se preparó extractos etanólico de hoja santa tierna y madura, con un tiempo de reflujo de 15 minutos. La evaluación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizó mediante la técnica de vaciado en placa; obteniéndose como resultado el 100% de inhibición de crecimiento en la hoja tierna y el 98% en la hoja madura. Concluyéndose que el extracto de la hoja de la hoja santa tierna presenta un efecto inhibitorio ligeramente mayor que el que el extracto de la hoja santa madura ⁽¹⁶⁾.

2.2. Bases teóricas

Antibacteriano

Son elementos sintetizados por una variedad de microorganismos vivos, ya sea de origen natural o sintético; cuya función será suprimir el crecimiento de distintos microorganismos y eventualmente llevar a su destrucción. El uso común de dicho término es usado para referirse a antibacterianos sintéticos, tales como las sulfonamidas, quinolonas, penicilinas, tetraciclinas, entre otros microorganismos capaces de destruir a otros microorganismos ⁽¹⁷⁾.

Planta medicinal:

a) Plantas medicinales

La Organización mundial de la salud, define a las plantas medicinales como toda especie vegetal en la que el todo, o una parte de la misma, está dotado de actividad farmacológica ⁽¹⁸⁾.

b) Principio activo ⁽¹⁹⁾

En plantas medicinales, se les llama principios activos a aquellas que son elaboradas durante el tiempo de vida de la planta y que estas cumplen con una acción farmacológica en el organismo con el que tiene contacto. Comúnmente suele ser usado como droga o medicamento y forman parte de las especies conocidas. Estas sustancias conocidas como principio activo logran alterar o variar la función de los órganos en el organismo vivo.

Gran cantidad de los principios activos se encuentran en la naturaleza. Un gran ejemplo es sin lugar a duda, el ácido salicílico, precursor de la aspirina que se separa de la corteza del árbol del sauce. Se menciona que en civilizaciones desde la antigüedad usaban ungüentos de sauce para aliviar el dolor, en la actualidad se comercializa el ácido acetilsalicílico como anti-agregante plaquetario, antiinflamatorio entre otros usos comunes que se le atribuye las propiedades farmacológicas.

c) Droga vegetal

Se define como plantas o partes de la planta del mismo o sus productos obtenidos a través de técnicas sencillas y que tiene una composición química a la que le confiere la acción farmacológica de importancia terapéutica y que no ha tenido algún tratamiento distinto más que para su limpieza y desecación, con el propósito de poder conservarla en buen estado ⁽¹⁸⁾.

Características botánicas:

a) Descripción botánica

Piper auritum comúnmente conocida en nuestro país como Hierba santa, hoja de estrella o hinojillo; perteneciente la familia de las *Piperaceae*, de origen nativo trópico. Es un arbusto pequeño con una altura aproximada a 2 metros, en ocasiones puede llegar a 6 metros. longitudinalmente estriadas, nudos abultados de las hojas, los tallos con nudos visibles glabrescentes. Sus hojas con alternas de 20 a 40 cm de largo y de 12 a 27cm de ancho, ovaladas o elípticas, ápice agudo o corto base profundamente cordada con lóbulos asimétricos, corto pubescentes en los nervios en el haz densamente blanco pubescentes en el envés, peciolo vaginadolados de 4 a 12cm de largo. Las hojas brillantes en la cara superior y opaca en la parte inferior; en cuanto a la inflorescencia son largas, delgadas de 10 a 27cm de largo, blancas y pendulosas, producidas en la base de las hojas, axiales, erectas en las antesis y péndulas en fruto ^(7, 20).

b) Propiedades terapéuticas

El uso del genero Piper son extensamente utilizadas tradicionalmente en el tratamiento múltiples enfermedades, incluidas en infecciones vaginales, además de corregir desordenes intestinales y como antimicrobiano se emplea en infecciones respiratorias, afecciones de piel y mucosas ya que en cuanto a sus metabolitos secundarios muestran actividad antifúngica, insecticida y bactericida; en cuando a sus aceites esenciales inhiben

el crecimiento de un amplio grupo de microorganismo causantes de las principales enfermedades nosocomiales ^(21, 22).

c) Aceite esencial

El aceite esencial es una mezcla de compuestos volátiles, provenientes de metabolitos secundarios, cuya composición intervienen grupos de hidrocarburos polietilénicos, pertenecientes al grupo de los terpenos asignados a la fórmula (C₅H₈) junto compuestos oxigenados (ésteres, aldehídos, alcoholes y fenoles). Los aceites esenciales caracterizan el aroma característico de algunas flores y semillas, son compuestos químicos aromáticos y volátiles; los aceites de la especie *Piper* inhibe un amplio grupo de microorganismos que originan infecciones en el ser humano ⁽²³⁾.

d) Función biológica

Las funciones biológicas de los aceites esenciales están basan en el poder antimicrobiano, antifúngico de las cuales pueden variar en las diminutas proporciones su efecto, dependiendo de las concentraciones administradas o requeridas para cumplir con la función requerida ⁽²³⁾.

Staphylococcus aureus:

a) Características microbiológicas

El género *Staphylococcus* inicialmente se clasificaron en un género común en la familia *Microcaceae* además de géneros *Micrococcus*, *Stomacoccus*, *Planococcus* y *Planococcus*. Sin embargo; en estudios recientes, los estudios genéticos de homología, secuenciación de ADN, hidratación de ADN – ARNr así mismo la secuenciación comparativa de ARNr16S, estos estudios permitieron demostrar que los géneros de *Staphylococcus* y *Micrococcus* tienen poca relación. Por otra parte, los *Staphylococcus* presentan ácidos teicoicos adheridos a las paredes de ésta bacteria, los mismos que no están presentes en los *Micrococcus*; además de ello, en el *Staphylococcus* se encuentra el citocromo y menaquinona de la cadena respiratoria ⁽²⁴⁾.

b) Medios de aislamientos

Los medios de cultivo o aislamiento de especies de microorganismos tienen características específicas ya que existen ciertos microorganismos que requieren de ciertos nutrientes para poderse desarrollar, ese acondicionamiento lo brinda el medio de cultivo; en los medios tradicionales, las especies de *Staphylococcus* suelen desarrollarse en entre las 18 y 24 horas posteriores al sembrado en el medio de cultivo. Las colonias de *Staphylococcus aureus* tienen características específicas en cuanto a su identificación cualitativa en medio de cultivo, presentando una superficies lisas y elevadas, de consistencia cremosa (debido a la producción de carotenoides) de apariencia brillante y de bordes enteros; gran mayoría de estas cepas producen beta-hemolisis o hemolisis total al entorno de las colonias si se cultivan en Agar sangre, en este caso la identificación de *Staphylococcus aureus* se evidencia por la pigmentación resaltante en el medio de cultivo ⁽²⁵⁾.

c) Caracterización

La tinción de Gram es el método común para la identificación de *Staphylococcus aureus*, además de la prueba de catalasa, fermentación de glucosa, la cual también permite diferenciar el género *Micrococcus* del género *Staphylococcus*; a esto se suma las técnicas moleculares como la reacción en la cadena de la polimerasa, empleando genes específicos de la especie. Además de estas técnicas, existen otras técnicas de identificación de cepas o grupos de cepas, para lo cual se puede emplear técnicas fenotípicas y técnicas genotípicas ⁽²⁶⁾.

III. HIPÓTESIS

Hipótesis Alterna (H₁):

El aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) presenta efecto antibacteriano in vitro sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis Nula (H₀):

El aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) no presenta efecto antibacteriano in vitro sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación ⁽²⁷⁾

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, de nivel explicativo, con enfoque cuantitativo de razón y de corte transversal y observacional.

Dimetilsulfoxido: se utilizó como solvente del aceite esencial y obtener las concentraciones del 25% y 50%.

Grupo blanco: Se utilizó 20 placas petri (Agar Muller Hinton) conteniendo el cultivo de *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó haciendo uso del tubo 0.5 en la escala de Mc Farlad. Empleando la técnica de Kirby Bauer, se colocó 1 disco del papel Whattman 41 con un diámetro de 6mm impregnado con la solución salina fisiológica y fue llevado a incubación a 36°C por un período de 24 horas, posterior a ello y haciendo uso de un Vernier, se realizó la toma de lectura de los halos de inhibición bacteriana.

Grupo experimental 1: Se utilizó de 20 placas petri (Agar Muller Hinton) conteniendo al cultivo de *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó haciendo uso del tubo 0.5 en la escala de Mc Farlad. Empleando la técnica de Kirby Bauer, se colocó 1 disco del papel Whattman 41 con un diámetro de 6mm impregnado con el aceite esencial al 25% fue llevado a incubación a 36°C por un período de 24 horas, posterior a ello y haciendo uso de un Vernier, se realizó la toma de lectura de los halos de inhibición bacteriana.

Grupo experimental 2: Se utilizó de 20 placas petri (Agar Muller Hinton) conteniendo al cultivo de *Staphylococcus aureus*, el cual se realizó haciendo uso del tubo 0.5 en la escala de Mc Farlad. Empleando la técnica de Kirby Bauer, se colocó 1 disco del papel Whattman 41 con un diámetro de 6mm impregnado con el aceite esencial al 50% fue llevado a incubación a 36°C por un período de 24 horas, posterior a ello y haciendo uso de un Vernier, se realizó la toma de lectura de los halos de inhibición bacteriana.

4.2. Población y muestra

Muestra vegetal:

Población

Se trabajó con hojas de *Piper auritum* (hierba santa) procedente del Distrito de Lucma, Provincia de Gran Chimú, Departamento de La Libertad.

Muestra

Se utilizó 4600mg de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) del Distrito de Lucma, Provincia de Gran Chimú, Departamento de La Libertad.

Criterios de inclusión

Se tuvo en cuenta que hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sean frescas y mantenían el color verde, obtenida de la misma zona de procedencia de la que se indicó.

Criterios de exclusión

No se tuvo en cuenta las plantas que fueron atacadas por plagas o maltratadas.

Material biológico:

Población:

Staphylococcus aureus.

Muestra:

Cultivos rejuvenecidos de *Staphylococcus aureus*.

Criterios de inclusión:

Cultivos sin apariencia de contaminantes.

Criterios de exclusión:

Cultivos evidentemente contaminados.

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.

Variab les	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
V. dependiente Actividad antibacteriana en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento en un cultivo bacteriano	Obtenido mediante la medición de los diámetros del halo de inhibición bacteriana.	Halos de inhibición bacteriana (mm)	Variable cuantitativa de razón
V. independiente Aceite esencial de <i>Piper auritum</i> (hierba santa)	Extracción del aceite esencial obtenido de alguna planta o una parte de ésta.	Obtenido mediante hidrodestilación de hojas de <i>Piper auritum</i>	Concentración del aceite al 25% y 50%	Variable cuantitativa nominal

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos ^(28, 29).

Material vegetal y obtención del extracto:

El material vegetal obtenido y tratado con agua e hipoclorito de sodio a 0.1%; posterior a ello se realizó el enjuague con agua destilada y llevado a secar a temperatura ambiente. Para la determinación taxonómica de la planta, se llevó una muestra de la planta de aproximadamente 65cm, al Herbarium Truxillense (HUT) para su debida certificación (anexo 07)

Obtención del aceite esencial:

La obtención del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa), se realizó por el método de la hidrodestilación, contando con el equipo Clevenger, empleándose 4600mg de las hojas de *Piper auritum* previamente trituradas. El proceso tuvo una duración de 4.5 horas, obteniéndose un total de 1.3 ml del aceite esencial, el mismo que fue recolectado en un frasco ámbar (con capacidad de 15ml) controlando una temperatura aproximada a 6°C.

Obtención de las concentraciones.

El rendimiento del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa), fue de 0.028 ml por cada 100g de hojas. Empleando el dimetilsulfóxido se realizó las diluciones, siendo así que para la concentración del 25%, se utilizó 0.75 ml de dimetilsulfóxido y 0.25 ml del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa). Para la concentración del 50% se utilizó 0.50ml de dimetilsulfóxido y 0.50 ml del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa).

Método de difusión de discos ⁽²⁷⁾

Para ello se hizo uso Agar Muller Hinton esterilizado y empleando la técnica de Kirby Bauer se realizó la respectiva evaluación de la actividad antibacteriana; los discos usados fueron impregnados con suero fisiológico el aceite esencial al 25% y 50% respectivamente. Posteriormente se fue llevado a incubación a 37°C. posterior a ello se realizó las observaciones en 24horas posteriores y poder determinar la capacidad de actividad antimicrobiana, haciendo uso de un vernier se midió el diámetro del halo de inhibición bacteriana.

4.4.1. Preparación de la droga vegetal.

Recolección de la muestra

Se recolectó 4600mg de hojas de la planta de *Piper auritum* (hierba santa) trasladadas del Distrito de Lucma, Provincia de Gran Chimú, Departamento de La Libertad. Usando una tijera de metal (previamente desinfectada con alcohol de 96°), se procedió a tomar la cantidad de hojas requeridas.

Identificación y determinación taxonómica de la especie

Un ejemplar completo de la planta de *Piper auritum* (hierba santa) de aproximadamente 65 cm, se llevó al *Herbarium Truxillense* para su identificación y verificación taxonómica.

Acondicionamiento de *Piper auritum* (hierba santa)

Se obtuvieron las hojas de hierba santa y se sometió a un lavado general con agua e hipoclorito de sodio al 1%, continuamente se realizó tres enjuagues con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Obtención del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa)

La obtención del aceite esencial, fue obtenido a través del equipo Clevenger, por el método de hidrodestilación. La droga fue trasladada a un balón de fondo plano y fue con agua destilada, aun nivel sobrepasado de la cantidad del contenido vegetal (aproximadamente a la mitad del balón). Todo se realizó bajo flujo constante de agua fría en el refrigerante del equipo y a temperatura constante, durante 4.5 horas. Finalmente, el producto obtenido, se recolectó en un frasco ámbar con capacidad de 15 ml bajo una temperatura de 6°C.

Proceso de extracción ⁽²⁸⁾

1. Se logró recolectar 4600mg de hojas frescas.
2. Se trató con agua e hipoclorito de sodio al 1%, seguidamente se enjuagó tres veces con agua destilada a chorro y posteriormente se procedió al fraccionamiento de la muestra.

3. Se colocó los 4600mg de la muestra en un balón de fondo plano perteneciente al equipo Clevenger (previamente instalado); dando así el inicio al proceso de hidrodestilación, en la que tuvo una duración de 4.5 horas aproximadamente.
4. El aceite esencial obtenido, fue de 1.3ml los mismo que fue almacenado bajo temperatura de 6°C.

Características del aceite esencial de *Piper auritum*.

Las características relacionadas a las propiedades físicas de sus aceites esenciales, son que a temperatura ambiente una forma líquida y volátiles cuando la temperatura aumenta, en sus inicios de su obtención presentan un ligero color amarillento o simplemente incoloro, con una densidad inferior al del agua, además de tener un índice de refracción elevado, solubles en alcoholes y solventes orgánicos. En cuanto a sus características químicas, puede decirse que estas se dividen en no terpenoides y terpenoides (derivadas de unidades de isopreno) ⁽²⁰⁾.

4.4.2. Técnica 2: siembra de la bacteria ⁽²⁵⁾

Material bacteriano

La muestra fue obtenida a partir de cultivos rejuvenecidos, previamente validados; posteriormente a ello y haciendo uso del Agar Muller Hinton, se preparó los veinte medios de cultivo y mediante la técnica de Kirby Bauer se procedió a realizar el sembrado del cultivo rejuvenecido de *Staphylococcus aureus* y posteriormente llevado a incubación por un periodo de 24 horas, a 36°C de temperatura, con el propósito de condicionar el desarrollo de la batería en estudio.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo, fue preparado con Agar Muller Hinton; para lo cual se pesó 500g del polvo y se agregó 500ml de agua destilada, se dejó reposar por 15 minutos. Se llevó a

calentar y manteniendo una agitación constante, llevando a ebullición por 1 minuto para finalmente lograr la disolución total; posteriormente se procedió a distribuir en las placas Petri previamente esterilizadas; calculando un espesor de 4mm sobre una superficie horizontal.

Rejuvenecimiento del cultivo

Se obtuvo partir de una placa de cultivo de *Staphylococcus aureus*, previa incubación y haciendo uso de un asa bacteriológica, se sembró en 10ml del medio de cultivo Tripticasa soya, contenidos un tubo de ensayo e inmediatamente fue llevado a incubación a 37°C durante 6 horas, hasta que se pudo visibilizar una turbidez uniforme.

Preparación del inóculo

Para dicha preparación y con la ayuda de una pipeta, se procedió a tomar una muestra del cultivo rejuvenecido y fue trasladado a una solución de salina estéril contenidos en un tubo de ensayo, logrando obtener una suspensión equivalente a una turbidez referente al tubo N°0,5 del estándar de Mc Farlad.

Siembra de la muestra

Teniendo las medidas necesarias de bioseguridad, se procedió a efectuar el sembrado.

1. Haciendo uso de un asa bacteriológica estéril, sumergimos en la solución preparada para tomar la muestra microbiológica preparada, se retiró el exceso del inóculo, rosando las paredes internas del tubo de ensayo.
2. En la superficie de la placa del medio de cultivo, se sembró el inóculo de manera uniforme por estría cruzada evitando el exceso.
3. Una vez sembrada, se dejó secar por un periodo de 5 minutos, para ello, la placa petri permaneció tapada para evitar posibles contaminaciones de la muestra.

Método de difusión de discos

La técnica empleada, es uno de los más frecuentes usados en la determinación de la actividad antibacteriana, hago referente a la técnica de Kirby-Bauer.

1. Para ello se preparó discos de papel filtro Whatman 41, embebidos en sueros fisiológico, aceite esencial al 25% y en el aceite esencial al 50% respectivamente, por un periodo de 2 horas.
2. Posterior a ello, se procedió a colocar los discos sobre la superficie del medio de cultivo en las placas petri de los distintos grupos y manteniendo una distancia aproximada a 3.5cm entre uno y otro.
3. Finalmente, con los cultivos y colocación de los discos finalizados; fueron llevados a incubación a una temperatura de 37°C por un periodo de 24 horas.
4. Las tomas de las muestras se realizaron a las 24 horas posteriores a la incubación; para ello, con la ayuda de un vernier, procediendo a tomar lectura de los halos de inhibición bacteriana.

Lectura de resultados.

La lectura fue obtenida a las 24 horas posteriores a la incubación de las muestras, teniendo en cuenta el halo de inhibición bacteriana y se comparó con la escala de Duraffourd (usada para la determinación cualitativa del efecto inhibitorio in vitro según el diámetro de inhibición, considerando la sensibilidad en un diámetro mayor a 8mm)

CONDICIÓN	DIAMETRO EN mm
Resistente o no sensible: (-)	<8
Sensibilidad límite (+)	8 – 14
Sensibilidad media (++)	14 – 20
Sumamente sensible (+++)	> 20

4.5. Plan de análisis.

Para el plan de análisis y tabulación de datos recolectados se utilizó el programa Excel 2016 los cuales serán procesados a través del paquete estadístico SPSS-22.0 Microsoft Excel; donde se realizarán las pruebas estadísticas de T-Student para diferenciar de manera significativa entre los grupos y Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación de grupos con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Los resultados que se obtuvieron, fueron presentados en tablas.

4.6. Matriz de consistencia.

Título de la investigación	Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Variables	Indicadores	Plan de análisis
Determinación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) sobre cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>	¿Presentará efecto antibacteriano in vitro el aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) sobre cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>Objetivo general: Determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) en <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>Objetivo específico: Determinar la capacidad antibacteriana del in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) sobre cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> a concentraciones al 25% y al 50%.</p> <p>Comparar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) de las concentraciones del 25% y 50% sobre cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Hipótesis Nula (H₀): El aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Hipótesis alterna (H₁): El aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Tipo: Experimental.</p> <p>Nivel: Explicativo</p> <p>Enfoque: Cuantitativo</p> <p>Corte: Transversal observacional</p>	<p>Independiente: Aceite esencial de hojas de <i>Piper auritum</i></p> <p>Dependiente: Efecto antibacteriano</p>	<p>Concentración del aceite esencial de <i>Piper auritum</i> (hierba santa) al 25 y 50%.</p> <p>Cuantitativa nominal.</p> <p>Halos de inhibición bacteriana.</p> <p>Cuantitativa de razón</p>	<p>Prueba estadística T-Student y ANOVA para el análisis de resultados</p>

4.7.Principios éticos.

La bioseguridad es importante para preservar la integridad del entorno, así mismo nos permite mantener un ambiente adecuado durante la ejecución de la investigación, siendo así que, se mantuvo las precauciones establecidas durante las operaciones, asegurando el equilibrio entre el entorno y el investigador al finalizar la investigación.

En el desarrollo del trabajo de esta investigación está basada en los principios éticos descritos en el código de ética para la investigación, versión 004 de la ULADECH ⁽³⁰⁾.

Cuidado del medio ambiente y la biodiversidad, es un principio en el cual involucra el cuidado y consideración del medio ambiente y plantas, aplicando medidas necesarias para evitar daños y maximizar los beneficios. Asegurar el bienestar de la colectividad involucrada en la investigación, respondiendo a las reglas generales: no originar daños, reducir posibles efectos adversos y maximizar el beneficio de la investigación ⁽²⁵⁾.

Justicia, la presente investigación se realizó dentro del juicio razonable, realizando prácticas justas dentro del procesos del trabajo realizado.

Integridad científica, el trabajo realizado en la presente investigación, se encuentra bajo los principios deontológicos; mostrando resultados obtenidos en aporte a la investigación científica y futuros estudios experimentales.

V. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1. Resultados

Tabla 01: Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Grupos	Halos de Inhibición Bacteriana en mm X±DS	Significancia P ANOVA
BLANCO (suero fisiológico)	6.0 ± 0.0	
A.E. <i>Piper auritum</i> al 25%	13.45 ± 0.60	0.000
A.E. <i>Piper auritum</i> al 50%	16.65 ± 0.74	

*(P < 0.05) Son estadísticamente significativos, se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula.

FUENTE: Paquete Estadístico SPSS 22.0, datos en la investigación.

Tabla 02: Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) a concentraciones del 25% y el 50% sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Grupos	Significancia Valor T Student*
BLANCO (suero fisiológico) vs A.E. <i>Piper auritum</i> 25%	0.000
A.E. <i>Piper auritum</i> al 25% vs A.E. <i>Piper auritum</i> al 50%	0.000

*(P < 0.05) Son estadísticamente significativos, se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula.

FUENTE: Paquete Estadístico SPSS 22.0, datos en la investigación.

5.2. Análisis de resultados

El presente trabajo de investigación, tuvo como finalidad; determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*; encontrándose que el aceite esencial de *Piper auritum* presenta efecto antibacteriano sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*, tanto a concentraciones del 25% y 50% respectivamente, los mismos que comparados en la escala de Duraffourd presentaron una sensibilidad media para la concentración del 50% y una sensibilidad límite para la concentración del 25%.

En la tabla 01, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), observándose una significancia estadística menor al 0.05, demostrando así, que los resultados obtenidos presentan varianza significativa entre los grupos de experimentación, en los que se dispuso que el aceite esencial de hojas de *Piper auritum* obtenido a las concentraciones del 25% y 50%, presentan efecto antibacteriano, obteniéndose un promedio de 16.65 ± 0.74 en la concentración del 50% y 13.45 ± 0.60 en la concentración al 25% y un promedio de 6.0 ± 0.0 en el grupo control (sin efecto microbiológico). De esta manera, aceptándose la hipótesis alternativa y negando la hipótesis nula.

Un estudio realizado por Sánchez Y, Correa T, Abreu T et al. En la Habana, 2013. Pretendía identificar las componentes presentes en el aceite esencial de *Piper auritum* y evaluar la CMI y CMB frente a *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas campestris pv*, obteniéndose como resultados en la CMI de 0.12mg/ml y 0.25mg/ml para la CMB; evidenciándose así la actividad antibacteriana frente a *Xanthomonas albilineans*, mostrando una mayor inhibición a una mayor concentración; esto difiere frente a *Xanthomonas campestris pv*, la cual presenta baja actividad antibacteriana. Concluye en que la responsabilidad de la actividad antibacteriana, recae en el fenilpropanoide safrol ⁽⁶⁾.

En la tabla 02: se empleó la prueba estadística de T-Student, donde se comparó el efecto in vitro de hojas de *Piper auritum* entre las concentraciones de 25% y 50%, la cual presento una significancia ($p < 0.05$) por tanto se asume que existe una diferencia estadísticamente significativa, aceptándose la hipótesis alternativa y negando la hipótesis nula.

El estudio realizado por Chuquimango S. de la Universidad Nacional de Trujillo – Perú 2017, evaluó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Piper angustifolium* (matico) a las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. En la determinación de la concentración mínima inhibitoria se obtuvo como resultados del 100% frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y un resultado del 75% frente a *Pseudomona aeruginosa*, concluyéndose que el aceite esencial de *Piper angustifolium* presenta actividad in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente y *Pseudomona aeruginosa* ⁽¹²⁾.

La actividad antibacteriana de *Piper auritum* posiblemente está relacionada con la presencia fenilpropanoides, su característica lipofílica afecta a la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares inhibiendo enzimas o procesos celulares específicos. El componente mayoritario encontrado en las hojas de *Piper auritum* es el fenilpropanoide safrol y a quien se le atribuye propiedades bactericidas y/o bacteriostáticos y aun que el mecanismo de acción no es dilucidado, el safrol presenta la actividad del aceite esencial de *Piper auritum* y de esta manera evita la proliferación de *Staphylococcus aureus*.

Bandoni, 2000. Determino la que la composición del aceite esencial de *Piper auritum*, teniendo como componente mayoritario a compuestos de tipo fenilpropanoide con contenidos superiores al 90% de safrol, mismo responsable de la actividad antibacteriana debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana lipídica del *Staphylococcus aureus*, provocando la muerte del microorganismo ⁽³²⁾.

VI. CONCLUSIONES

Se determinó que el aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba santa) presenta efecto antibacteriano in vitro sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Se logró determinar que el aceite esencial de hojas de *Piper auritum* al 50% presentan halos de inhibición bacteriana promedio de 16.65 ± 0.74 mm, con una sensibilidad media según la escala de Duraffourd y 13.45 ± 0.60 mm en las concentraciones del 25% con una sensibilidad límite según escala de Duraffourd.

La comparación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Piper auritum* permitió determinar que el aceite esencial al 50% presenta una mayor actividad antibacteriana en comparación del aceite esencial del 25% sobre los cultivos de *Staphylococcus aureus*.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

Se recomienda realizar estudios con concentraciones mayores al 50% (75% y 100%) de aceite esencial de *Piper auritum* y la comparación con Vancomicina, ya que este medicamento es de uso común intrahospitalario en el tratamiento por infecciones por *Staphylococcus Meticilinoresistentes*.

Se recomienda realizar estudios en bacterias Gram Positivas y Gram Negativas, con la finalidad de establecer nuevos posibles tratamientos y partir de esto poder desarrollar antibacterianos en el control de infecciones provocado por microorganismos que afectan la salud de la población.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Francisco J, Morón R, José B, Jardines M. La medicina tradicional en las universidades medicas. Rev Cubana de Plant Med [Internet]. Cuba; 1997 [citado 21 Oct 2018]; 2(1):35-41. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v2n1/pla08197.pdf>
2. Nigenda P, Mora F, López M, Nuñez B. La practica de medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia [Internet]. México; 2000 [citado 21 Oct 2018]; 1: 12-28. Disponible en : <https://www.scielosp.org/article/spm/2001.v43n1/41-51/es/>
3. Lemus L. Inmunomodulación de las vías clásica y alterna del sistema de complemento por seis plantas medicinales de Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala [Internet] Guatemala; 2007 [citado 22 Oct 2018]. Disponible en: chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbfmadadm/http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/879160/inmunomodulacion-de-las-vias-clasica-y-alterna-del-sistema-de-c_F9CWVar.pdf
4. Salamanca S, Galiano M. Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género Piper y elucidación estructural de sus aceites esenciales. Universidad Mayor de San Marcos [Internet] Lima; 2016 [citado 22 Oct 2018]. Disponible en: chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbfmadadm/http://200.62.146.130/bitstream/handle/cybertesis/5967/Salamanca_rs.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5. Sanchez Y, Pino O, Correa T, Naranjo E, Iglesia A. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunt (caisimón de anís). Rev. Protección Veg [Internet]. La Habana: Scielo; 2009 [actualizado Abr 2009; citado 22 Oct 2018]; Vol.24 1nd ed. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100006
6. Sanchez Y, Correa T, Abreu Y, Pino O, Naranjo E, Iglesia A. Efecto de aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson [Internet]. La Habana: Scielo; 2013 [actualizado 30 Oct 2013; citado 23 Oct 2018]; Vol.28. 3nd ed.

Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522013000300007

7. Puccio P. Piper auritum. Monaco Nature Encyclopedia. Monaco Nature Encyclopedia [Internet]. Monaco; 2006 [citado 23 Oct 2018]. Disponible en: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/piper-auritum/?lang=es>
8. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno. Rev Biomed [Internet]. México; 2006 [citado 21 Oct 2018]; 17(1): 287. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio064f.pdf>
9. Mensa J, Soriano A, Barberán J, Montejo M, Salavert, Alvares R, Et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por Staphylococcus aureus. Rev Esp Quimioter 26 [Internet]. Madrid; 2013 [citado 21 Oct 2018]; 1 – 84. Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>
10. Aties L, Moya G, de la Caridad M, Pascual M, del Carmen F, Acosta I, Brossard G. Staphylococcus aureus y estafilococo coagulasa negativa resistentes a la meticilina. Available from: Medic Latina [Internet]. Diciembre; 2009 [citado 21 Oct 2018]; 21(12): 6029-6034. Disponible en: <https://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=8&sid=247cef3d-9165-4a00-a01c-45f75b07fed7%40sessionmgr102>
11. Valdivia A, Rubio Y, Camacho C, Brea O, Matos M, Sosa M, et al. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de Piper auritum Kunth. Avances en Investigacion Agropecuaria [Internet] Cuba; 2018 [citado 28 Oct 2018]; vol. 22, N°1, 2018, p. 77+. Disponible en: <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/6.pdf>
12. Chuquimango S. Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Piper angustifolium (Matico) sobre cepas de Staphylococcus áureus meticilino resistente y Pseudomona aeruginosa [Internet]. Perú; 2017 [citado 28 Oct 2018]. Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/9502/ChuquimangoFuentes_S.pdf?sequence=1&isAllowed=y
13. Arteaga D. Efecto antibacteriano “in vitro” del aceite esencial del Piper angustifolium

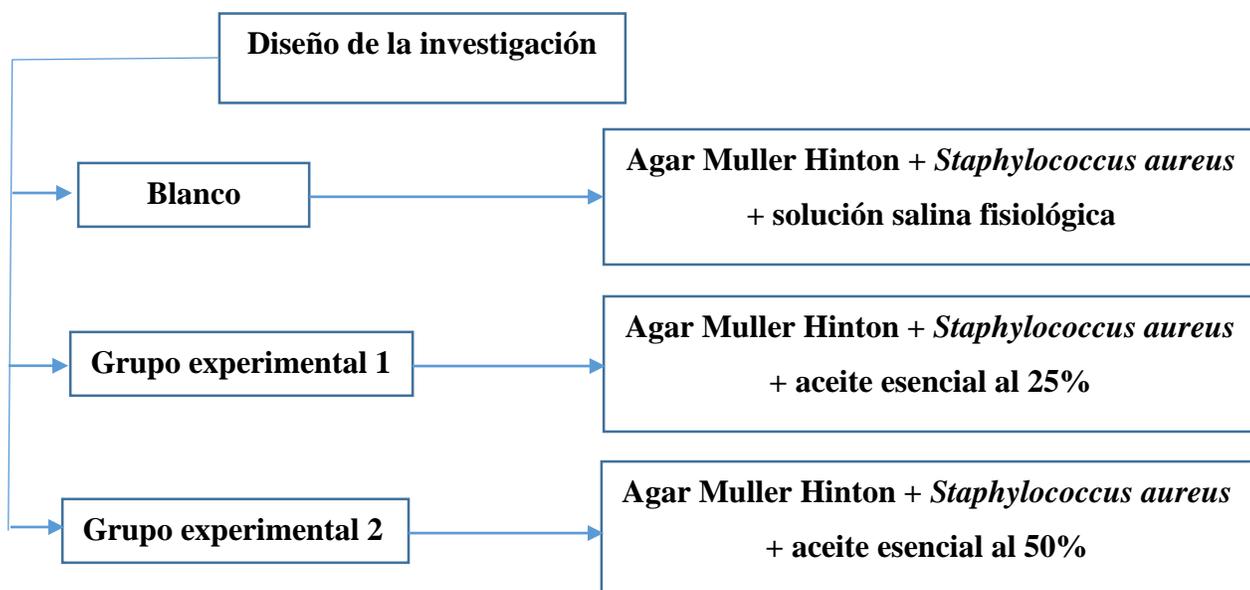
- (matico) sobre *Streptococcus pyogenes*. [Internet] Perú; 2016 [citado 28 Oct 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1167>
14. Azuero A, Jaramilio C, San Martín D, D'Armas H. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Rev Cien UNEMI* [Internet] Ecuador; 2016 [citado 4 Nov 2018]; 9: 1–5. Disponible en: [file:///C:/Users/Marceo/Downloads/Dialnet-AnalisisDelEfectoAntimicrobianoDeDocePlantasMedici-5774769%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Marceo/Downloads/Dialnet-AnalisisDelEfectoAntimicrobianoDeDocePlantasMedici-5774769%20(1).pdf)
 15. Carrillo M, Reyes A, Carranza C. Análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas que crecen en la Huasteca Potosina. *Rev ciencias naturales y agropecuarias* [Internet]. Bolivia; 2015 [citado 4 Nov 2018]; Vol.2 N°.3 387-391. Disponible en: https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/vol2num3/Ciencias%20Naturales%20y%20Agropecuarias%20Vol%202%20Num%203%20Final_6.pdf
 16. Beltrán D, Shizukawa G, Rosales M. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO DE HOJA SANTA (*Piper auritum*). *Prol de Carpio y Plan de Ayala* [Internet]. 2006 [citado 4 Nov 2018]; No.5: 1. Disponible en: <http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/morelia/MEMORIAS%202006/TRABAJOS%20LIBRES/MICROBIOLOGIA/384.pdf>
 17. Camacho A. Los antimicrobianos en la práctica médica. *Especialista de segundo grado en medicina interna* [internet] 2016 [citado 4 Nov 2018]. Vol.1 7-272. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/antibioticos.pdf>
 18. Alonso M. Mesa Redonda: el medicamento en la oficina de farmacia Plantas Medicinales. XIII Congreso Nacional Farmacéutico [Internet]. Granada; 2002 [citado 4 Nov 2018]. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/Profesionales/jornadasycongresos/informacion/Documents/plantas%20medicinales.pdf>
 19. Berdonces J. Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. *Natura Medica Trix* [Internet] 1995 [citado 4 Nov 2018]. N 37 – 38. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4989379.pdf>

20. Alanís G. Planta órgano de difusión del departamento y cuerpo académico de Botánica. FCB-UANL [Internet]. 2006 [citado 23 Oct 2018]; Vol.3: 14-15. Disponible en: http://www.uanl.mx/utilerias/publicaciones/planta/planta_no3.pdf
21. Naturalista. Hierba santa (*Piper auritum*) [Página de internet] 2016 [citado 23 Oct 2018]. Disponible en: <https://colombia.inaturalist.org/taxa/154826-Piper-auritum>
22. Domingo D, López B. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap [Internet]. España; 2003 [citado 21 Oct 2018]; Vol. 16 (Nº4): 385-393. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Diego_Domingo/publication/28066457_Plantas_c_on_accion_antimicrobiana/links/0c9605256d677b1d8f000000.pdf
23. Guerra D, Panduro D. Aceites esenciales; Universidad de la Amazonia Peruana [Internet] Perú: Iquitos; 2012 [actualizado 13 Dic 2012; citado 26 Oct 2018]. Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos97/aceites-esenciales/aceites-esenciales.shtml>
24. Ves E, Graziano A, Blancoc M, Frutosd L, Tulae L, Montalia C, Et al. Infecciones graves por *Staphylococcus aureus*: características clínicas, sensibilidad antibiótica y uso de antimicrobianos. Arch Argent Pediatr [Internet] Argentina; 2014 [citado 21 Oct 2018] 2014;112(4): e152-e155. Disponible en: <https://repositorio.hospitalelcruce.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/201/ArchArgentPediatr2014%2c112%284%29e152-e155.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
25. García J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos [Internet]. 2000 [citado 31 Oct 2018]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
26. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. México; 2014 [citado 26 Oct 2018]; 61 (1): 28-40. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
27. Recalde M, Vayas L, Esquivel D, Pazmiño P, Gutierrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de

- Staphylococcus aureus subsp. Aureus. Rev Inv Vet Perú [Internet]. Perú; 2018 [citado 26 Oct 2018]; 29(4): 1543-1547. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>
28. Cerpa M. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización [Internet]. Universidad de Valladolid; 2007 [citado 21 Oct 2018]. Disponible en: <http://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf>
29. Britanialab.com [Internet]. Argentina: Britania; 2015 [citado 31 Oct 2018]. Disponible en: http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2843836ddd8.pdf
30. Comité institucional de ética de investigación. Código de ética para la investigación versión 004. [Internet]. Chimbote: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote; 2021 [citado 08 Dic 2021]. Disponible en: <https://web2020.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2020/codigo-de-etica-para-la-investigacion-004.pdf>.
31. Domingo D, López B. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap [Internet]. España; 2003 [citado 21 Oct 2018]; Vol. 16 (N°4): 385-393. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Diego_Domingo/publication/28066457_Plantas_con_accion_antimicrobiana/links/0c9605256d677b1d8f000000.pdf
32. Universidad de Cundinamarca. Plantas de la Familia Piperaceae del Sumapaz Medio y Bajo Occidental. Dirección de investigación universitaria [Internet] Colombia; 2018 [citado 21 Oct 2018]; 1: 160 -165. Disponible en: <http://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/1485/Libro%20PIPERACEAS%20version%20pares.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

ANEXO 01: Diseño de la investigación



Anexo 02: Piper auritum (hierba santa)



Anexo 03: Concentraciones del aceite esencial de *Piper auritum* (hierba santa)



Anexo 04: sembrado del *Staphylococcus aureus*.



Anexo 05: incubación de las placas sembradas, conteniendo el disco impregnado del aceite esencial al 25% y 50% respectivamente.



Anexo 06: Resultado del efecto antibacteriano.



Anexo 07: certificado de *Piper auritum*



Anexo 08: Prueba ANOVA

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1194.433333	2	597.2166667	1945.22	0.0000	3.158842719
Dentro de los grupos	17.5	57	0.307017544			
Total	1211.933333	59				

Anexo 09: Prueba T-student

Prueba t-student para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Aceite esencial 25%</i>	<i>Aceite esencial 50%</i>
Media	13.45	16.65
Varianza	0.365789474	0.555263158
Observaciones	20	20
Coeficiente de correlación de Pearson	0.134300988	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	19	
Estadístico t	-16	
P(T<=t) una cola	0.0000	
Valor crítico de t (una cola)	1.729132812	
P(T<=t) dos colas	0.0000	
Valor crítico de t (dos colas)	2.093024054	