



**VICERRECTORADO ACADÉMICO
ESCUELA DE POST GRADO**

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO) FRENTE
A BACTERIAS PATÓGENAS, EN LA CIUDAD DE ICA 2013-2014.**

PRESENTADO POR:

MAG. JESSICA YOLANDA HUARCAYA ROJAS.

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

ICA-PERU

2014

DEDICATORIA:

A DIOS TODOPODEROSO A MIS PADRES,
HERMANOS, A MI QUERIDO HIJO PATRICK Y A
MI ESPOSO.

POR MOTIVARME A CONCLUIR LA
ELABORACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL.

AGRADECIMIENTOS :

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, la Facultad de Ciencias Biológicas, de la “Universidad Nacional San Luis Gonzaga” de Ica, por haberme permitido utilizar sus Laboratorios de Farmacognosia. Y Microbiología.

A mi Asesora: Dra. Ysabel Ramos Lalupú, por sus valiosos consejos y entusiasmo para la ejecución de la tesis.

A mis colegas Teresa y Luis por su ayuda desinteresada en todo momento que la solicite. A mis alumnos Edwin y Cyntia, por su apoyo en la parte experimental de la tesis.

RECONOCIMIENTOS :

A la Universidad Privada “Alas Peruanas”, por brindarme la oportunidad de desarrollar capacidades, competencias y optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica.

A los Maestros por sus enseñanzas brindadas a mis compañeros de estudio del Doctorado de Farmacia y Bioquímica, por los gratos momentos que pasamos juntos durante nuestros estudios.

ÍNDICE

	Pág
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RECONOCIMIENTO	iv
RESUMEN	08
ABSTRACT	09
RESUMO	10
INTRODUCCIÓN	11

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	14
1.2. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	16
1.2.1. DELIMITACIÓN ESPACIAL	16
1.2.2. DELIMITACIÓN SOCIAL	16
1.2.3. DELIMITACIÓN TEMPORAL	16
1.2.4. DELIMITACIÓN CONCEPTUAL	17
1.3. PROBLEMAS DE INVESTIGACIÓN	17
1.3.1. PROBLEMA PRINCIPAL	17
1.3.2. PROBLEMAS SECUNDARIOS	17

1.4.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	18
1.4.1.	OBJETIVO GENERAL	18
1.4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
1.5.	HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN	18
1.5.1.	HIPÓTESIS GENERAL	18
1.5.2.	HIPÓTESIS SECUNDARIAS	18
1.5.3.	VARIABLES (DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL)	19
1.6.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	20
1.6.1.	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	20
a)	TIPO DE INVESTIGACIÓN	20
b)	NIVEL DE INVESTIGACIÓN	21
1.6.2.	METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN	21
a)	MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	21
b)	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	21
1.6.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN	22
a)	POBLACIÓN	22
b)	MUESTRA	22
1.6.4.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	23
a)	TÉCNICAS	23
b)	INSTRUMENTOS	39
1.6.5.	JUSTIFICACIÓN, IMPORTANCIA Y LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	40
A)	JUSTIFICACIÓN	40
B)	IMPORTANCIA	41

C) LIMITACIONES	42
-----------------	----

CAPÍTULO II

MARCO FILOSÓFICO

• FUNDAMENTACIÓN ONTOLÓGICA	43
-----------------------------	----

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	46
3.2. BASES TEÓRICAS	52
3.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	66

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE TABLAS Y GRÁFICOS	69
4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
4.3. CONCLUSIONES	84
4.4. RECOMENDACIONES	85
4.5. FUENTES DE INFORMACIÓN	86
ANEXOS	94
1. MATRIZ DE CONSISTENCIA	95
2. FICHA DE REGISTRO DE DATOS	96
3. INFORME DE EXPERTOS DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS	104
4. DECLARACION JURADA	107
5. CARTA DE ACEPTACION	108
6. INFORME DE LA ASESORIA DE TESIS	109
7. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DE PARTE EXPERIMENTAL	111
8. CERTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE	119

RESUMEN

Un grave problema de salud pública a nivel mundial son las enfermedades infecciosas producidas por bacterias patógenas. La resistencia a los antibióticos de origen sintético es más frecuente. Por ello se buscan sustancias antimicrobianas de origen vegetal, que no produzcan tantos efectos adversos, como si lo producen los antibióticos sintéticos. El objetivo del trabajo fue determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (matico) frente a bacterias patógenas, en la ciudad de Ica 2013-2014. El material vegetal se obtuvo de una tienda naturista del mercado de Ica. Se preparó el extracto acuoso por decocción y el extracto etanólico por maceración con alcohol de 96°. Se realizó el screening fitoquímico de los extractos. Los metabolitos secundarios encontrados fueron : Taninos, compuestos fenólicos libres, flavonoides, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas y saponinas.

La actividad antibacteriana se realizó por el método difusión de disco en agar, a concentraciones de 100%, 50% y 25% del extracto. A una concentración de 25% frente a *Staphylococcus aureus*, mostró un halo de inhibición de 11.5 mm. (Resistente) y el extracto etanólico al 25% frente a *Escherichia coli*, presentó un halo de inhibición de 16.1mm.(Intermedio) y la bacteria *Bacillus subtilis* obtuvo un halo de inhibición de 11.1mm.(Resistente). En cuanto a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, no presento halos de inhibición en ninguno de los dos extractos (Resistente). El porcentaje de inhibición relativa (PIR), para el extracto acuoso frente a *Staphylococcus aureus* fue de 71.87%; el PIR del extracto etanólico frente a *Escherichia coli*, fue de 89.44%, frente a *Bacillus subtilis*, fue de 58.42%. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL. para el extracto etanólico de las hojas del *Piper aduncum* L. frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) a una concentración 250 mg/mL para el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL.

Palabras claves : *Piper aduncum* L., antibacteriana, extractos, bacterias patógenas, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

A serious public health problem worldwide are infectious diseases caused by pathogenic bacteria. Resistance to antibiotics is more common synthetic origin. Therefore antimicrobial substances of plant origin, which do not produce many adverse effects, if they occur as synthetic antibiotics are sought. The objective was to determine the antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Piper aduncum* L.(matico) against pathogenic bacteria, in the city of Ica 2013-2014. The plant material was obtained from a health food store Ica Croft. The aqueous extract by decoction and ethanol extract by maceration with ethanol at 96° was prepared. Phytochemical screening of the extracts was performed. The secondary metabolites were found: tannins, free phenolic compounds, flavonoids, alkaloids, triterpenes and / or steroids, quinones and saponins.

The antibacterial activity was performed by disk diffusion method on agar at concentrations of 100%, 50% and 25% of the extract. At a concentration of 25% against *Staphylococcus aureus*, he showed an inhibition of 11.5mm. (Resistant) and 25% ethanol extract against *Escherichia coli*, he presented an inhibition of 16.1mm. (Intermediate) and *Bacillus subtilis* obtained a halo of inhibition of 11.1mm. (Resistant). As to *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, do not show inhibition halos in either extracts (resistant). The percent inhibition relative (PIR) to the aqueous extract against *Staphylococcus aureus* was 71.87%; PIR ethanolic extract against *Escherichia coli*, was 89.44%, against *Bacillus subtilis*, was 58.42%. The minimum inhibitory concentration (MIC) at a concentration of 250 mg / mL. for ethanolic extract from the leaves of *Piper aduncum* L. versus *Escherichia coli* it was of 31.25 mg/mL. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) at a concentration 250 mg/ mL for the ethanol extract against *Escherichia coli* was 31.25 mg/mL.

Keywords: *Piper aduncum* L., antibacterial, extracts, pathogenic bacteria, minimum inhibitory, minimum bactericidal concentration.

RESUMO

Um grave problema de saúde pública em todo o mundo são doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas. A resistência aos antibióticos é de origem sintética mais comum. Portanto substâncias antimicrobianas de origem vegetal, que não produzem muitos efeitos adversos, caso venham a ocorrer como antibióticos sintéticos são procurados. O objetivo foi determinar a atividade antibacteriana de extratos aquosos e etanol das folhas de *Piper aduncum* L. (matico) contra bactérias patogênicas, na cidade de Ica 2013-2014. O material vegetal foi obtido a partir de uma loja de alimentos saudáveis Ica Croft. O extracto aquoso extracto de decocção e etanol por maceração com 96° o álcool foi preparado e rastreio fitoquímicos dos extractos foi realizada. Os metabólitos secundários foram encontrados: Taninos, compostos fenólicos livres, flavonóides, alcalóides, triterpenos e / ou esteróides, quinonas e saponinas.

A actividade antibacteriana foi realizado pelo método de difusão em agar em disco, em concentrações de 100%, 50% e 25% do extracto. A uma concentração de 25% contra o *Staphylococcus aureus*, que mostrou uma inibição de 11.5mm. (Resistente) e 25% de extracto de etanol contra *Escherichia coli*, ele apresentou uma inibição de 16,1 milímetros. (Intermediário) e *Bacillus subtilis* obtido um halo de inibição de 11,1 milímetros. (Resistente). Como a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, não mostram halos de inibição em ambos extratos (resistentes). A percentagem de inibição relativa (PIR), ao extracto aquoso contra *Staphylococcus aureus* era 71,87%; extrato etanólico PIR contra *Escherichia coli*, foi 89,44%, contra *Bacillus subtilis*, foi 58,42%. A concentração inibitória mínima (MIC) a uma concentração de 250 mg/mL. para extrato etanólico das folhas de *Piper aduncum* L. contra *Escherichia coli* foi de 31.25 mg/mL. A concentração bactericida mínima (MBC), a uma concentração de 250 mg/mL para o extracto de etanol contra *Escherichia coli* foi de 31.25 mg/mL.

Palavras-chave: *Piper aduncum* L., antibacterianos, extratos, bactérias patogênicas, Concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas resistentes es un serio problema de salud pública a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son la prescripción de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, el movimiento de pacientes dentro y entre instituciones médicas, los viajes y otros factores socioeconómicos.

Los cambios y adaptaciones microbianas han generado el fenómeno de la resistencia a los antibióticos en cepas patógenas bacterianas, que es un problema de salud. Existen otros dos elementos que favorecen el surgimiento de este fenómeno: el primero el uso inadecuado de los antibióticos y el segundo la adaptabilidad bacteriana a los diferentes ambientes.⁽¹⁾

Muchos de los nuevos antibióticos sintéticos de uso clínico descubiertos en los últimos años presentan reducida efectividad en muchas bacterias y hongos, además de serios efectos colaterales.

Es por ello que la utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la biotecnología y se ofrece como una alternativa, especialmente para las que no existe un tratamiento adecuado. Pero sin duda

el reino vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos. Actualmente existe un gran interés en la búsqueda de sustancias antimicrobianas de origen vegetal y prueba de ello es que diferentes Institutos a nivel mundial centran sus esfuerzos en este campo.

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas medicinales. A su vez, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud; los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población. Esto abarca la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante el uso de medicamentos alternativos obtenidos de plantas, los cuales son de bajo costo con alta disponibilidad.⁽²⁾

El Perú es un país poseedor de una gran biodiversidad y experiencia en el uso tradicional de plantas medicinales, fuente de recursos naturales para la investigación y desarrollo de fitofármacos.

Piper aduncum L. llamado popularmente matico, hierba del soldado, achotlín o cordoncillo, es un árbol perenne de la familia de la pimienta (piperácea). Crece silvestre en costas y selvas de Centroamérica y Suramérica y en los valles interandinos hasta los 3.000 msnm.

Esta planta contiene numerosos compuestos químicos, como flavonoides, alcaloides, monoterpenos, triterpenos, saponinas, safrol y fenoles.

La medicina tradicional le atribuye propiedades variadas. Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias, en lavados antisépticos sobre heridas y en infusión para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno), en dolencias gastrointestinales ("empacho",

diarreas agudas o crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para hacer gárgaras.

Es usada como emoliente y protector de la piel comercializado en forma de jabón antiséptico. Algunos estudios de laboratorio han confirmado sus propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y antisépticas e inhibidor de bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y los hongos *Cryptococcus neoformans* y *Trichophyton mentagrophyte*.⁽³⁾

Esta investigación tuvo como objetivo: determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico), frente a bacterias patógenas, en la Ciudad de Ica-2013-2014.

La autora.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Uno de los temas más preocupantes para la comunidad científica es la resistencia de las cepas bacterianas, a uno o más antibacterianos lo que constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Según informe de la OMS en año 2014 sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los antimicrobianos se puso de manifiesto que, en el caso de los antibióticos, esta cuestión ha dejado de ser una posible preocupación futura para convertirse en un problema real que afecta al ámbito extrahospitalario y a hospitales de todo el mundo y complica en gran medida nuestra capacidad para tratar infecciones comunes. Sin una acción urgente y coordinada, el mundo se dirige hacia una era postantibióticos en la que infecciones corrientes y lesiones menores que hemos tratado satisfactoriamente durante décadas pueden volver a resultar mortales. ⁽⁴⁾

Con frecuencia, las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden al tratamiento ordinario, lo que da lugar a una enfermedad prolongada y a mayor riesgo de defunción. La tasa de mortalidad de pacientes con infecciones graves tratados en hospitales duplica, aproximadamente, la tasa de pacientes con infecciones provocadas por bacterias no resistentes.

No obstante, las medidas preventivas como el mejoramiento en la prescripción y uso de los antibióticos, el manejo de los mismos en ambientes hospitalarios, entre otras; las bacterias cada vez se hacen más resistentes a estos, creando así, la urgente necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos.

En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la utilización de plantas medicinales, que continúan siendo una valiosa fuente de sustancias bioactivas con propiedades antibacterianas.

La especie *Piper aduncum* L, cuyo nombre común es matico, es conocida desde la época preincaica y aplicada medicinalmente como hemostático y antiinflamatorio. Descrita como una planta “de hojas grandes, tamaño regular y olor aromático”.

Sus principales propiedades terapéuticas atribuidas por la medicina tradicional son: hemostático, antiinflamatorio, antiséptico, vulnerario, antiséptico genitourinario, también como expectorante y antidisentérico.⁽⁵⁾

En nuestro país, no se reportan estudios sobre actividad antibacteriana del *Piper aduncum* L. la presente investigación tiene por finalidad determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas frente a bacterias patógenas.

Se han realizado estudios farmacológicos y microbiológicos de la especie. Investigaciones de la UNMSM probaron el tratamiento micronizado utilizando de hojas de matico administradas en forma de cápsulas (300mg) durante 15 días para úlcera duodenal y 28 días para úlcera

gástrica. Los resultados indican que en dosis de 900mg c/8 horas cicatrizaron con 2 y 4 semanas de tratamiento respectivamente.

En un ensayo farmacológico “in vivo”, con grupo problema y control, en conejos se determinó que los extractos acuoso y crudo a dosis de 250mg/kg pueden ser utilizados para detener la sangría normal.

Estudios realizados han demostrado la eficiencia como fungicida frente al hongo *Crinipellis pernicioso*, responsable por el ataque, conocido como “vassoura-de-bruxa”, cuando se utiliza en concentración de 50 a 100 ppm inhibe el 100% del crecimiento.

La actividad insecticida y larvicida contra insectos fitófagos de mosquitos transmisores del dengue y malaria, fue demostrada en los ensayos con el aceite esencial cuyos resultados indican que en bajas concentraciones es capaz de eliminarlos totalmente.⁽⁶⁾

1.2. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

1.2.1. DELIMITACIÓN ESPACIAL:

Las hojas *Piper aduncum* L. (matico) proveniente del distrito de Mazamari, provincia de Satipo, departamento de Junín y es comercializada en tiendas naturistas del cercado de Ica, se analizaron en el Laboratorio de Farmacobotánica - Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, mientras que los ensayos microbiológicos se desarrollaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional “San Luis Gonzaga de Ica”.

1.2.2. DELIMITACIÓN SOCIAL:

Los usos tradicionales de la especie *Piper aduncum* L.(matico), por parte de la población es bajo la forma de infusión o cocimiento de las hojas, el objetivo de este estudio y corroborar sus usos tradicionales sobre todo para enfermedades causadas por bacterias patógenas.

Esto Beneficiaría a personas de situación económica mediana y baja, que no cuentan con recursos económicos; teniendo en cuenta que los

antibióticos son costosos y muchos de ellos producen reacciones adversas indeseables.

1.2.3. **DELIMITACION TEMPORAL:**

La investigación se realizó en el mes Mayo del 2013 hasta Noviembre del 2014.

1.2.4. **DELIMITACION CONCEPTUAL:**

El marco teórico está referido a *Piper aduncum* L. (matico), especie que tiene muchas propiedades terapéuticas, entre las más resaltante es la actividad cicatrizante y como vulnerario . La parte utilizada son las hojas de las cuales se obtuvo los extractos acuoso y etanólico y se determinó la actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas causantes de enfermedades comunes.

1.3. **PROBLEMAS DE INVESTIGACION:**

1.3.1. **PROBLEMA PRINCIPAL:**

¿Tendrán actividad antibacteriana los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico) frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica 2013-2014?

1.3.2. **PROBLEMAS SECUNDARIOS:**

- ¿Cuál de los extractos presentará una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica 2013-2014 ?
- ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínimabactericida (CMB) de los extractos en estudio?
- ¿Qué porcentaje de inhibición relativa (PIR) presentarán las concentraciones significativas?
- ¿Cuáles son los metabolitos secundarios que estarán presentes en los extractos?

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:

1.4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico) frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar que extracto presentará una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos del estudio.
- Determinar el porcentaje de Inhibición relativa (PIR) de las concentraciones significativas.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

1.5. HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN:

1.5.1 HIPOTÉISIS GENERAL :

- Los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L.(matico) presentarían actividad antibacteriana significativa frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.

1.5.2. HIPOTÉISIS SECUNDARIAS :

- a) El extracto acuoso o etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. presentarían una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas.
- b) Presentarían concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), los extractos en estudio.

- c) Presentarían porcentaje de inhibición relativa (PIR), las concentraciones significativas.
- d) Serían los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico), los que le confieren la actividad antibacteriana.

1.5.3. **VARIABLES** (DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL)

Variable Independiente “X”: Extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico).

Variable Dependiente “Y”: Actividad antibacteriana frente a Bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.

DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL

Variables	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
			Definición operacional
Variable Independiente "X" Extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i> L.	Extractos que se emplean en la medicina tradicional para curar afecciones.	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación botánica. • Obtención de extractos: acuoso y etanólico. • Screening fitoquímico 	Caracteres organolépticos (forma, color, tamaño). g/mL extracto Reacciones de coloración y/o precipitación.
Variable Dependiente "Y": Actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.	Capacidad de matar o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, causantes de infecciones.	<ul style="list-style-type: none"> • Método de Difusión en Agar. • Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR). • Método de Dilución en Caldo. : CMI y CMB. 	Unidad de medición : mm. Unidad de medida:% Unidad de medición : mg /mL:

1.6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

1.6.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN:

A) TIPO DE INVESTIGACIÓN

Experimental

Experimental.- En este tipo de investigación los tratamientos de la variable independiente han sido manipulada por el investigador, por lo que se tiene el mayor control y evidencia de la causa efecto.

Es experimental porque se realizó comparaciones de la variable dependiente entre los grupos experimentales y de control.⁽³⁸⁾

B) NIVEL DE INVESTIGACIÓN:

Experimental

Experimental.- es experimental, porque consiste en la manipulación de una (o más) variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o porqué causa se produce una situación o acontecimiento particular. El experimento provocado por el investigador , le permite introducir determinadas variables de estudio manipuladas por él, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas.⁽³⁸⁾

1.6.2. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN :

a) MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

Método Científico

Método Científico.- es científico porque desea entender uno fenómeno aun no explicado, o bien para desarrollar , más de un determinado proceso, realiza experiencias con el fenómeno estudiado, variando de una en una las variables que intervienen hasta inducir una Ley que las relaciona.

Este método nos induce al descubrimiento de una teoría por medio de las experiencias.

b) DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Experimental

Experimental.- Porque se va intervenir en la unidad de estudio que son las cepas bacterianas patógenas por el grado de inhibición a diversas concentraciones del extracto acuoso y etanólico de *Piper aduncum* L. (Matico). ⁽³⁸⁾

GE = O1 X O2

Donde :

GE : Grupo experimental.

O1 : Preprueba o medición previa al tratamiento experimental.

O2 : Posprueba o medición posterior al tratamiento experimental.

X : Manipulación variable independiente.

1.6.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN :

A) POBLACIÓN:

Constituida por la especie vegetal *Piper aduncum* L.(matico), proveniente del distrito de Mazamari, provincia de Satipo, departamento de Junín, y comercializada en tiendas naturistas del cercado de la Ciudad de Ica.

La población bacteriana utilizada fueron las cepas patógenas : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

B) MUESTRA:

La muestra fue constituida por las hojas de la especie vegetal *Piper aduncum* L. (matico) porcedente del distrito de Mazamari, provincia de Satipo, departamento de Junín. Las hojas fueron adquiridas en una sola tienda naturista de la Ciudad de Ica, escogida al azahar. La muestra fue obtenida en el mes de Noviembre del 2013.

1.6.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

a) TÉCNICA DE LABORATORIO :

Técnica : Observación laboratorial

Materiales y equipos de Laboratorio :

Material biológico :

- Hojas de *Piper aduncum* L. (Matico).
- Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

Equipos y materiales de laboratorio:

- Incubadora 36°C
- Campana bacteriológica de flujo laminar
- Campana extractora
- Refrigerador 4°C
- Autoclave
- Horno
- Estufa
- Rotavapor
- Balanza analítica
- Matraz Erlenmeyer, 500 y 1000 mL.
- Embudos de vidrio
- Baguetas
- Tubos de ensayo 15 x20mm
- Gradillas para tubos de ensayo

- Pipetas de 1.5 mL.
- Placas Petri
- Probeta de 100 mL.
- Vaso de precipitación, 250 y 500 mL.
- Balones de 1000 mL.
- Luna de reloj
- Viales con tapa
- Frascos estériles de color ámbar
- Espátula
- Propipetas
- Pinzas de metal sin dientes
- Mecheros
- Asa de Kolke
- Espátula de Drigasky

Reactivos y medios de cultivo :

- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Liebermann-burchard
- Ácido clorhídrico Q.P.
- Ácido sulfúrico Q.P.
- Diclorometano
- Hidróxido de sodio 5%

- Cloruro férrico 5%
- Gelatina 1%
- Etanol de 96°
- Agua destilada
- Limaduras de magnesio
- Anhídrido acético
- Solución salada estéril
- Agar Mac Conkey
- Agar Müeller-Hinton
- Agar nutritivo
- Agar TSA
- Agar Cetrimide
- Caldo nutritivo.

Otros materiales :

- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Discos de cloranfenicol 30 µg
- Papel kraft
- Guantes
- Mascarillas
- Hisopos estériles
- Algodón
- Pabilo

❖ **Tratamiento del material vegetal:**

Obtención .- Se adquirió 1 kg. de hojas de matico, en una tienda naturista de la ciudad de Ica, que fue escogida al azar.

Selección.- Se procedió a seleccionar las hojas y se separaron las que no presentaban buen aspecto y las que se encontraban en mal estado se desecharon.

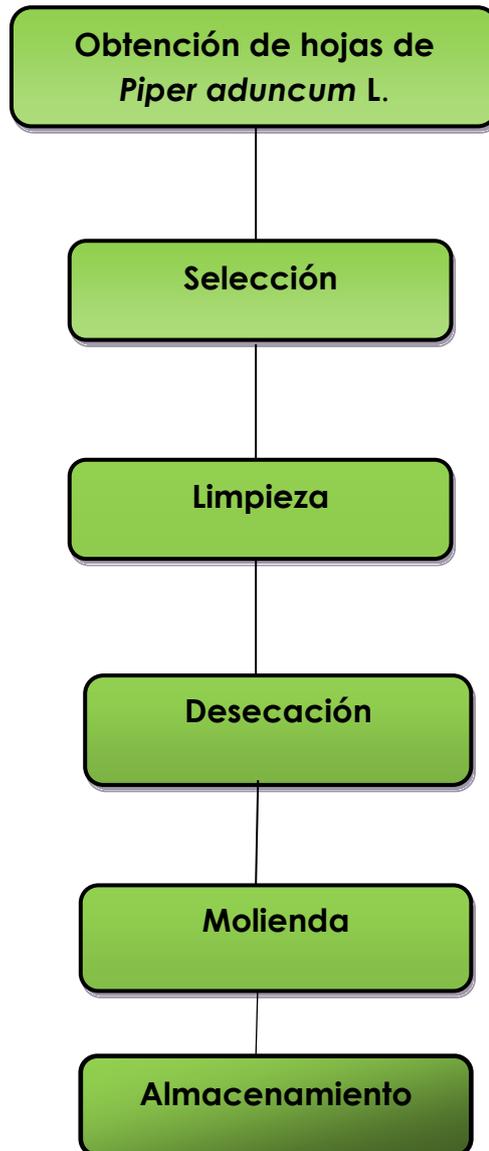
Limpieza.- Se realizó la limpieza con ayuda de agua potable y después con agua destilada.

Desecación.- El desecado, se realizó bajo sombra por una semana y después se llevó a la estufa a 40°C, por una hora.

Molienda.- Posteriormente se llevó a la molienda, con la ayuda de un mortero.

Almacenamiento.- La muestra vegetal una vez molida se almacenó en un frasco de color ámbar con tapa debidamente rotulado, indicando la fecha de almacenamiento⁽⁷⁾ . Según fluxograma N°1.

Flujograma N°1 : Tratamiento del material vegetal



Fuente: La autora

- ❖ **Clasificación taxonómica.**- La muestra vegetal una vez adquirida fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad de Nacional de “San Marcos”, Lima-Perú, para realizarle su clasificación taxonómica.(ver anexo Nro.19).

❖ **Screening fitoquímico:** Se realizó al extracto acuoso y etanólico para poder identificar los metabolitos secundarios presentes, para ello se emplearon reacciones de coloración y/o precipitación ^(7,8)

Extracto acuoso.- Se pesó 10 g. de hojas secas y se colocó en un matraz erlenmeyer, se le añadió 90 mL., de agua destilada, se agita y se lleva a ebullición a baño maría por 30 minutos. Luego se filtra y lleva a concentrar unos 30 minutos, se procedió a realizar el screening fitoquímico:

Determinación de Alcaloides.- Para determinar la presencia de alcaloides, se utilizaron tres reactivos diferentes : Dragendorff, Mayer, y Wagner.

Dragendorff.- A 1 mL. de extracto acuoso se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas de reactivo de Dragendorff. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color anaranjado.

Mayer .- A 1 mL. de extracto acuoso se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas del reactivo. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color blanco.

Wagner.- A 1 mL. de extracto acuoso se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas de reactivo de Wagner. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color marrón.

Determinación de Saponinas.- Para esta identificación se empleó la Prueba de espuma. Se mide 1 mL. del extracto acuoso y se le añadió 2 mL. de agua destilada, se agita vigorosamente por 1 minuto. Dejar en reposo por 15 minutos, si persiste la espuma la prueba es positiva.

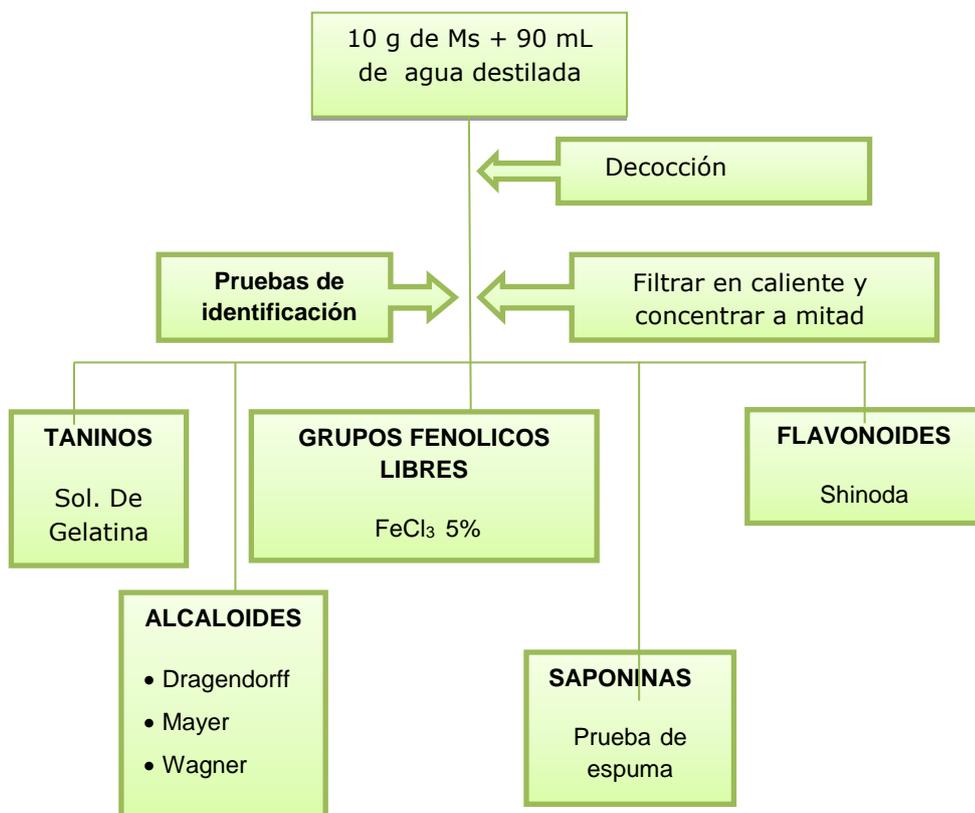
Determinación de Flavonoides.- Para la identificación de flavonoides se empleó la reacción de Shinoda. Se midió 1 mL. de extracto acuoso y se le añadió 1 mL. de HCl Q.P. y 03 limaduras de magnesio La reacción es positiva si después de 15 minutos se observa un color rojo o anaranjado.

Determinación de Compuestos fenólicos .-Para identificar a los compuestos fenólicos se usa la prueba de Cloruro férrico, se empleó 1

mL. de extracto acuoso y se le añadió 3 gotas de FeCl₃ al 5%. La reacción es positiva si se observa una coloración azul o verde oscuro.

Determinación de Taninos.- Para identificar a los taninos, se empleó la reacción de la Gelatina, se midió 1 mL. de extracto acuoso y se le añadió 1 mL. de gelatina al 1%. La reacción es positiva si observa turbidez u opalescencia.

Flujograma N° 2: Screening fitoquímico del extracto acuoso de *Piper aduncum* L.



Fuente: La autora.

Extracto etanólico.- Se pesó 10 g. de hojas secas y se humectó con etanol, luego se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se añadió 90 mL. de etanol de 96°, se dejó macerar por 7 días, se tapó herméticamente y se agitó tres veces al día. Luego se filtró y se llevó a concentrar por 30 minutos, y se realizó el screening fitoquímico.⁽⁷⁾

Determinación de Taninos.- Para identificar a los taninos, se empleó la reacción de la Gelatina, se tomó 1 mL de extracto etanólico y se agregó 1 mL. de solución de gelatina al 1%. La reacción es positiva si aparece turbidez u opalescencia.

Determinación de Compuestos fenólicos.- Para identificar a los compuestos fenólicos, se empleó la prueba de Cloruro férrico, se tomó 1 mL del extracto acuoso y se añadió 3 gotas de cloruro férrico al 5%. Para la determinación de grupos fenólicos libres, la reacción es positiva si aparece un color intenso azul, negro o verde.

Determinación de Triterpenos y/o esteroides.- Para identificar a los triterpenos y/o esteroides, se emplea la Reacción de Lieberman-Burchard. Se Tomó 1 mL. del extracto etanólico y se llevó a sequedad, se redisuelve con 1 mL. de diclorometano y se le añadió 1 mL. de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo.

Para la determinación de triterpenoides y/o esteroides, la reacción es positiva si aparece un color azul, verde o naranja.

Determinación de Quinonas .- Para identificar a las quinonas se emplea la Reacción de Bornträger. Se tomó 1 mL. del extracto etanólico se lleva a sequedad en Baño maría y después se redisolvió con diclorometano y se agitó suavemente con 5 mL de NaOH al 5% y se observa el color de la fase acuosa.

Para la determinación de quinonas, la reacción es positiva si se observa una coloración roja.

Determinación de Alcaloides .- Para determinar la presencia de alcaloides, se emplearon tres reactivos diferentes : Dragendorff, Mayer y Wagner.

Dragendorff.- A 1 mL. de extracto etanólico se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas de reactivo de Dragendorff. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color anaranjado.

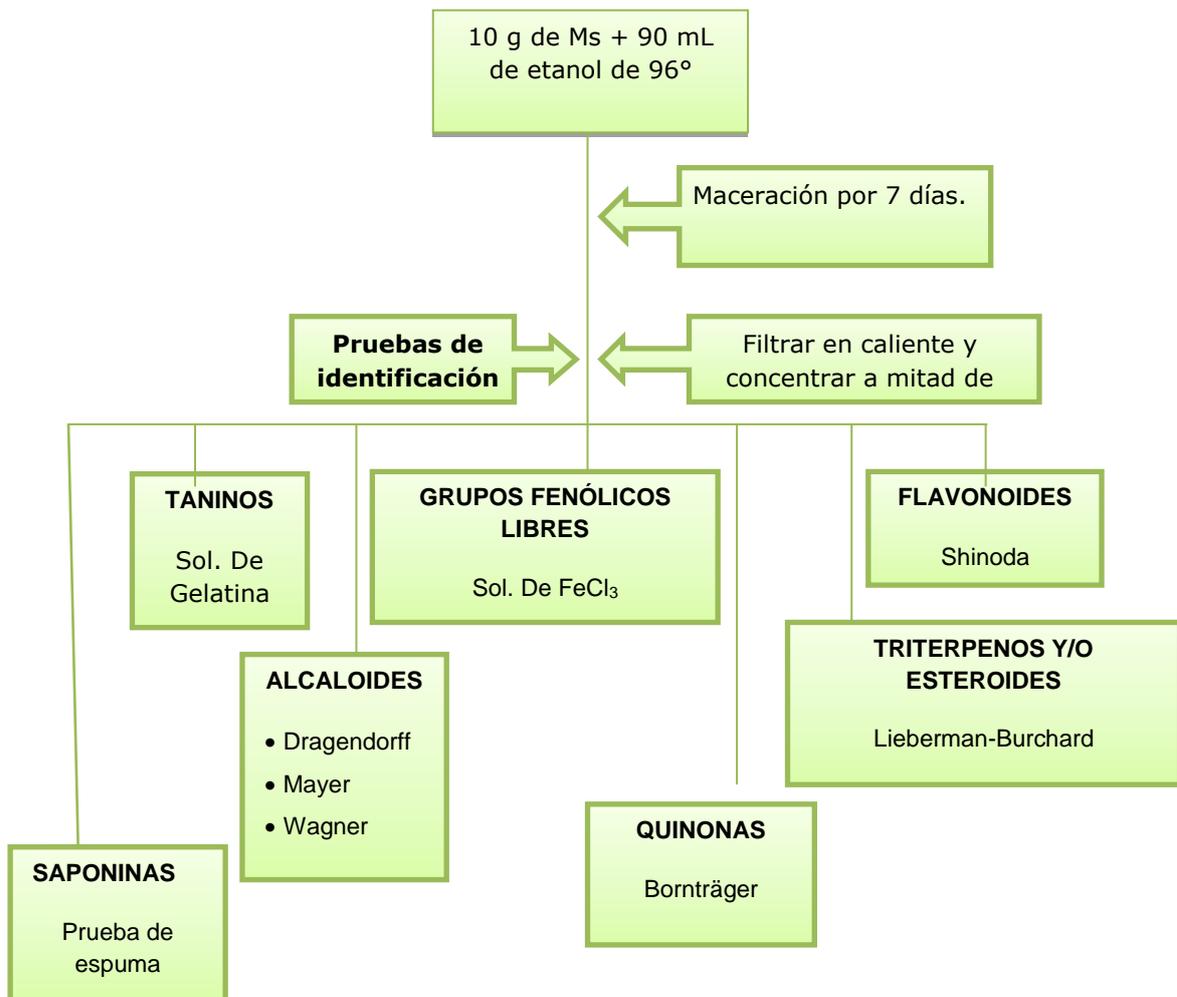
Mayer .- A 1 mL. de extracto etanólico se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas del reactivo. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color blanco.

Wagner.- A 1 mL. de extracto etanólico se le añadió 1 mL. de HCl al 1% y 3 gotas de reactivo de Wagner. La reacción es positiva si se observa un precipitado de color marrón.

Determinación de Flavonoides.- Para la identificación de flavonoides se empleó la reacción de Shinoda. Se mide 1 mL. de extracto etanólico, se añadió 1 mL. de HCl Q.P. y 03 limaduras de magnesio La reacción es positiva si después de 15 minutos se observa un color rojo, rosado o anaranjado.

Determinación de Saponinas .- Para esta identificación se empleó la Prueba de espuma. Se mide 1 mL. del extracto etanólico y se le añadió 2 mL. de agua destilada, se agita vigorosamente por 1 minuto, Dejar en reposo por 15 minutos, si persiste la espuma la prueba es positiva.

**Flujograma N° 3: Screening Fitoquímico del Extracto Etanólico de
Piper aduncum L.**



Fuente: La autora.

❖ OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS PARA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA :

Extracto acuoso.- Para obtener el extracto acuoso de matico, se empleó la técnica de decocción o cocimiento para ello se pesó 20 g de hojas secas y molidas de matico y se le añade 100 mL. de agua destilada, se agita y se lleva a ebullición a baño maría por 30 minutos. Luego se filtra y lleva a concentrar a sequedad en rotavapor.⁽⁷⁾

Extracto etanólico.- Para obtener el extracto etanólico se empleó la técnica de la maceración, Se pesó 20 g de hojas secas y se humectó con etanol, luego se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se añadió 90 mL. de etanol de 96°, se dejó macerar por 7 días, se tapó herméticamente y se agitó tres veces al día. Luego se filtró y se llevó a concentrar a sequedad en el rotavapor.⁽⁸⁾

❖ PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y CEPAS :

• **Preparación del medio de cultivo Sólido.**

Todos los materiales de laboratorio (material de vidrio, fierro, torundas, discos de papel Whatman, etc), fueron previamente esterilizados en el horno eléctrico a 180°C por 1 hora.

Para preparar el medio de cultivo Müller–Hinton, se suspende 39 g de éste en 1000 mL. de agua destilada, y se calienta a ebullición hasta disolución completa. Se distribuye en frascos y se esteriliza en autoclave por 15 minutos y 15 lb de presión (121°C).⁽⁹⁾

Se vertió el medio derretido en placas Petri estériles cubriendo la superficie con una capa de 4 mm de grosor (15-20 mL.) y dejar que el medio se endurezca.

• **Preparación del medio de cultivo Líquido.**

Se suspendió la cantidad requerida de cultivo (polvo en gramos por litro de agua destilada). Luego se mezcló hasta uniformizar. Se calentó agitando frecuentemente unos minutos hasta que se disolvió y se llevó a autoclave entre 15 a 20 minutos a 121°C 0 15 lb de presión. Luego se distribuyó en placas o en tubos.

- **Preparación del Inóculo.-**

De un cultivo puro se tomó una asada de 4 a 5 colonias que presentaron las mismas características morfológicas. Luego fueron sembradas en caldo nutritivo para bacterias. Seguidamente fueron incubados a 37 °C por 24 horas, para determinar aproximadamente la concentración microbiana estos caldos fueron ajustados con solución salina estéril a la turbidez del estándar N° 0.5 de Mac Farland.⁽¹⁰⁾

- ❖ **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:**

- **Método de Difusión de Disco en Agar.-**

Fue empleado el método de Kirby Bauer (Difusión de Disco en Agar Müller-Hinton).

Las placas petri con agar Müller-Hinton, previamente rotuladas, fueron sembradas con la ayuda de una torunda empapada de bacteria tratando que la siembra sea uniforme, luego se dejó secar por un tiempo de 10 minutos.

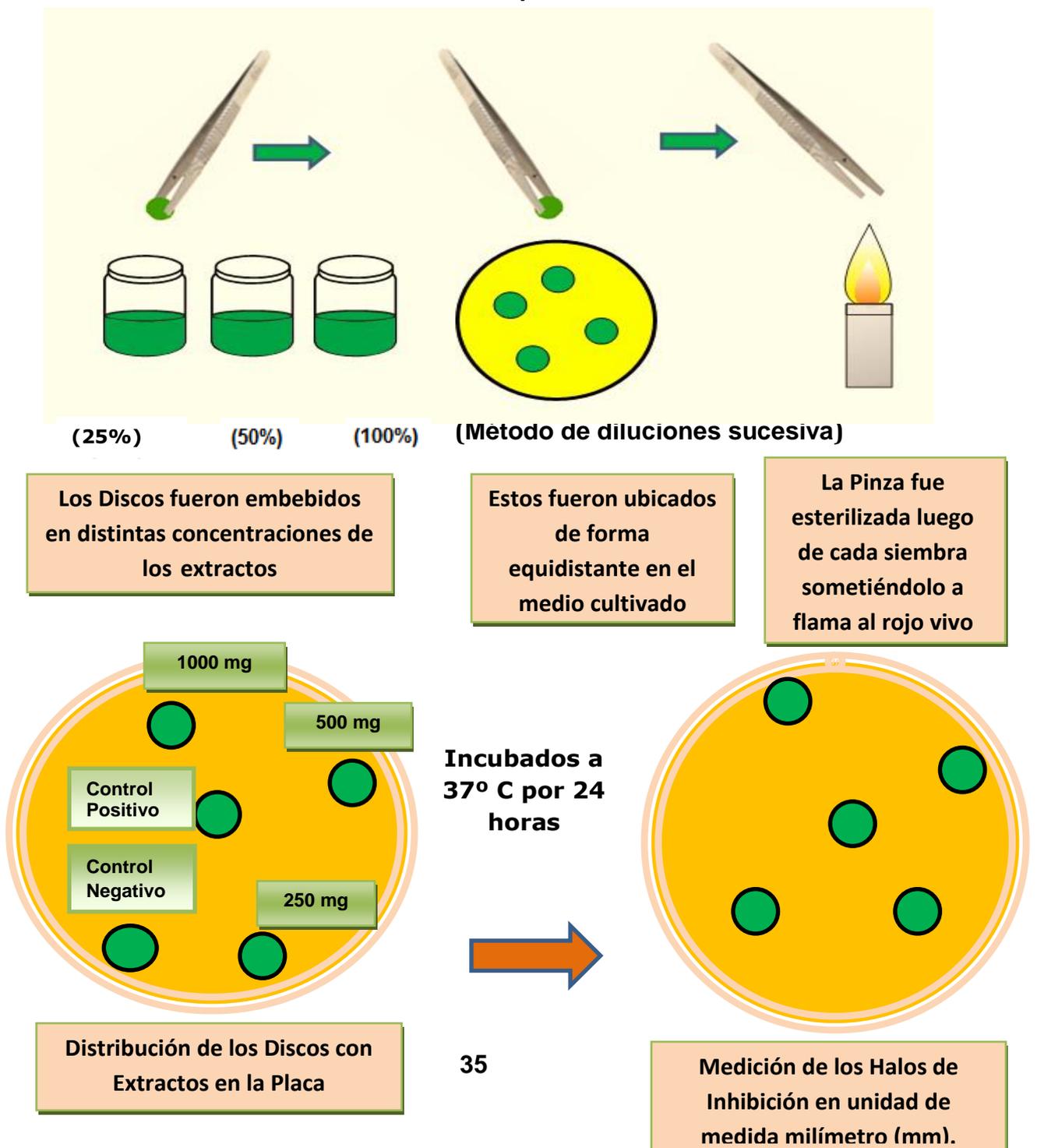
Seguidamente se prepararon extractos acuosos y etanólicos a concentraciones de 25%(250 mg/mL), 50%(500 mg/mL) y 100%(1000 mg/mL). Se colocaron 3 discos de papel de filtro embebidos con las diferentes concentraciones del extracto acuoso y etanólico, el Cloranfenicol (Control positivo) y 1 disco embebido con el control negativo en cada placa petri, con la ayuda de una pinza la cual fue previamente esterilizada al mechero antes de coger el siguiente disco, los mismos que fueron ubicados de tal manera que las zonas de inhibición no se entrecrucen.

Seguidamente las placas fueron incubadas en posición invertidas a temperatura de 37°C por 24 horas .⁽³⁰⁾

Lectura:

Se verificó los halos de inhibición formados procediéndose a tomar las medidas teniendo en cuenta el diámetro de estos.⁽³⁾

Figura N° 1 : Método de Difusión en Agar del extracto etanólico de *Piper aduncum* L.



• **Método de Dilución:**

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).- A partir del cultivo puro se toma una asada cargada con el inóculo, se toca y limpia el aro del asa bacteriológica en un ángulo que forme entre el caldo y el vidrio del tubo de ensayo. Se flameó la boca del tubo y se vuelve a tapar dejándolo en la gradilla previamente rotulada según la bacteria replicada. Se procedió a incubar a 37°C por 24 horas, cumplido el tiempo se ajustó al estándar 0.5 de Mac Farland.

Se rotuló 10 tubos de ensayo estériles por cada tipo de extracto. A partir del tubo N°2 hasta el tubo N°10 se le agrega 0.5 mL de Caldo Nutritivo para bacterias.

Seguidamente se coloca 0.5 mL del extracto al 25% al tubo N° 1 y tubo N° 2, a partir del tubo N° 2 se traspasó 0.5 mL al tubo N° 3 mezclando, y así sucesivamente hasta el tubo N° 9; del tubo N° 9 se coge 0.5 mL y se desechó. El tubo de ensayo N° 10 no recibió extracto. Luego se agrega 0.5 mL. del inóculo microbiano a todos los tubos y se incuba a 37°C por 24 horas.

Lectura.-

Para determinar si hubo o no crecimiento microbiano, se analizó principalmente la turbidez, se elige el tubo con la menor concentración donde no se observó crecimiento bacteriano, los tubos que presentaron turbidez, nos indican crecimiento bacteriano, mientras en los tubos que no se observó turbidez, indicaron ausencia de crecimiento bacteriano, por lo tanto susceptibilidad de los microorganismos usados frente al extracto, la prueba se realizó por triplicado.

Concentración Mínima Bactericida (CMB).-

Para determinar la concentración mínima bactericida se procedió a partir de la concentración mínima inhibitoria. En una placa petri

previamente rotulada se dividió en diez porciones en forma equitativa y enumerada del N°1 al N°10.

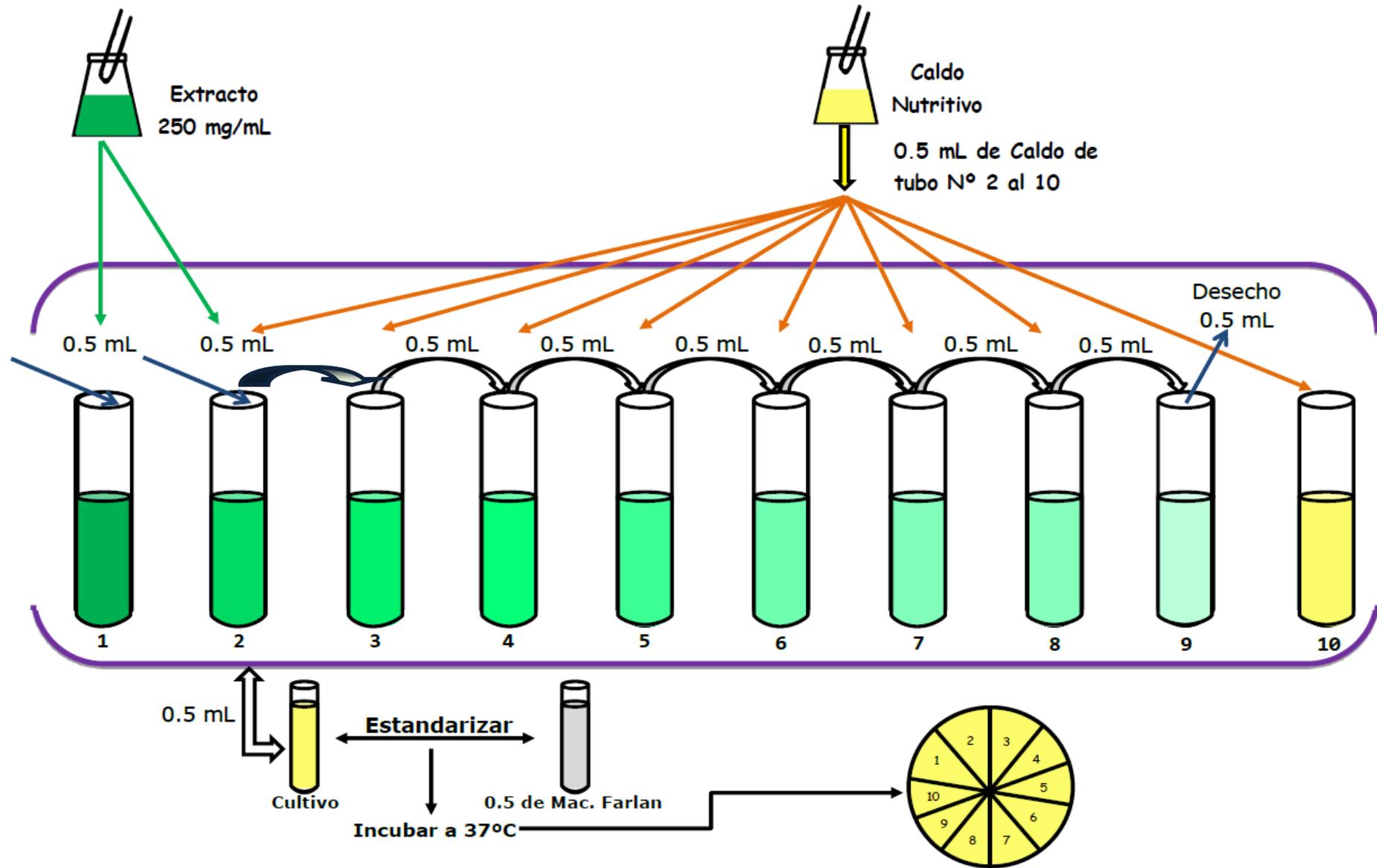
Se preparó agar Müeller-Hinton para las bacterias. Con la ayuda del asa bacteriológica se cogió una muestra del caldo del tubo N°1 y se sembró por estrías en la placa en la división N°1, el asa se flamea al rojo vivo; de la misma manera se coge una asada del tubo N° 2 y se siembra en la división N°2 de la placa petri, se sigue así sucesivamente hasta la división N°10.

Concluida la siembra en la placa petri se incuba a 37°C por 24 horas.

Lectura .-

Se observa en cada una de las 10 divisiones de la placa petri si hubo crecimiento microbiano, la fracción con la menor concentración del extracto que no mostró ningún crecimiento es la concentración mínima bactericida.^(10,12) .

Figura N° 2 : CMI del extracto etanólico de *Piper aduncum* L. frente a *Escherichia coli*



b) INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .-

Instrumento : Ficha de registro

El trabajo de investigación utilizó un instrumento de recolección de datos (ficha de registro) que fue llenado por la investigadora. El instrumento tuvo la siguiente característica: Cumplió la función de recolectar y registrar los datos sobre la presencia o ausencia de metabolitos secundarios, utilizando la técnica de Screening fitoquímico de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (matico). También permitió registrar los datos sobre la medida individual en mm. de los halos de inhibición formados alrededor de los discos de difusión presentes en las placas del Agar Müller-Hinton, en cada una de las concentraciones de los extractos, a las 24 horas de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas, se registra además la turbidez en los tubos para el caso de la concentración mínima inhibitoria y en las placas si hubo presencia de bacterias en caso de la concentración mínima bactericida y se procedió al llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta :

- Presencia o ausencia de metabolitos secundarios.
- Identificación de la muestra
- Identificación de la concentración utilizada.
- Medida en milímetros del halo de inhibición formado.
- Crecimiento o ausencia de bacterias.

TÉCNICA	INSTRUMENTO
Observación laboratorial	Ficha de observación
	Ficha de recolección de datos.
	<ul style="list-style-type: none">• Presencia o ausencia de metabolitos secundarios.• Medición del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.• Crecimiento o ausencia de bacterias.

Para la producción de datos se siguió la metodología según los objetivos planteados.

Sustancia en estudio :

La droga que se experimentó en el presente estudio fue el *Piper aduncum* L.(Matico), en la forma de extracto acuoso y etanólico para obtener principios activos totales en las concentraciones mencionadas.

Para la recolección de los datos se empleó la ficha de registro (ver anexos Nro. 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.6.5 JUSTIFICACIÓN, IMPORTANCIA Y LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN:

A) JUSTIFICACIÓN:

Habiendo poca información de estudios acerca de actividad antibacteriana frente a cepas patógenas de la especie *Piper aduncum* L, se hace necesario realizar el mencionado estudio para contribuir de alguna manera, a constatar si se justifica lo usos de medicina tradicional. En Latinoamérica se reconoce el matico por sus propiedades astringentes y se utiliza para detener las hemorragias. Su aplicación en esos casos es local. También se le utiliza para eliminar los forúnculos en la piel, aliviar heridas leves y picaduras de sanguijuelas. Además se le utiliza para el alivio de la gastritis y contrarrestar las diarreas. Cuando se tienen problemas digestivos es muy efectiva aliviando las náuseas, el dolor de estómago, la dispepsia y el vómito. Incluso se recomienda su ingesta cuando se tienen gases intestinales, el efecto será rápido. El uso medicinal del matico también pone su grano de arena en el alivio de resfríos, tos, bronquitis, neumonía y otros problemas respiratorios.

Entre otras cosas la cultura peruana tiene como referente que el matico es un afrodisíaco. Además cuando a una persona se le extrae una muela se le recomienda un poco de matico para aliviar la lesión en la encía.^(3, 5,6)

B) **IMPORTANCIA:**

Durante miles de millones de años algunas bacterias y hongos vienen produciendo sustancias químicas que las protegen frente a los ataques de otros microorganismos. Las que se utilizan en la medicina clínica actual se denominan antibióticos o antimicrobianos. Como mecanismo de supervivencia, otros microorganismos han desarrollado mecanismos para resistir al efecto tóxico de los antimicrobianos. Así pues, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno antiguo codificado por genes de resistencia que se transmiten de una generación de microorganismos a otra.

Las cepas sensibles pueden volverse resistentes por mutación de genes ya existentes o por adquisición de genes de resistencia a partir de otro microorganismo que ya sea resistente. Este es el primer paso para la aparición de una resistencia nueva. Afortunadamente, la mayoría de los microorganismos sensibles no se vuelven resistentes fácilmente. La resistencia que observamos hoy en la práctica clínica suele haberse desarrollado en otra persona, animal o reservorio medioambiental en alguna otra parte del mundo muchos años antes.⁽¹⁾ Aunque en la mayoría de los microorganismos es rara la aparición súbita de una resistencia nueva, no es así con todos los patógenos. Por ejemplo, en pacientes con tuberculosis o infección por el VIH las cepas sensibles pueden sufrir nuevas mutaciones en un paciente, especialmente cuando su tratamiento no es óptimo. La aparición de cepas resistentes durante el tratamiento aumenta mucho el riesgo de malos resultados clínicos, e incluso de muerte. Por consiguiente, el tratamiento eficaz es absolutamente fundamental para evitar el desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

Uno de los temas que más preocupa a la comunidad científica en medicina humana es la constante emergencia de cepas bacterianas

refractarias a uno o más antibacterianos, lo que constituye, actualmente, un problema creciente de salud pública a nivel mundial. La resistencia a los antibacterianos, se traduce en ineficacia de los tratamientos, generando un importante impacto en la salud. Entre los usos tradicionales de la especie *Piper aduncum* L. Es conocido que se utiliza para curar heridas, como antiinflamatorio, e incluso como antiséptico Genitourinario y expectorante. Es por ello que esta investigación tiene como objetivo determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas frente bacterias patógenas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. De esta manera se daría una alternativa de solución para el tratamiento de enfermedades infecciosas más comunes y muchas veces resistentes frente a los antibióticos, que causan reacciones adversas.⁽⁶⁾

C) LIMITACIONES:

Las limitaciones de la investigación es precisamente el financiamiento. Los reactivos, medios de cultivo y sobre todos las cepas son costosos y también el tiempo para el desarrollo de la práctica, pues se debe contar con la Infraestructura adecuada para tener la mejor bioseguridad, puesto que se trabaja con bacterias patógenas.

El tiempo que se dedica al desarrollo de la investigación, hay otras labores docentes que se deben cumplir y eso hace que se demore el avance de la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO FILOSÓFICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN ONTOLÓGICA.-

La teoría del poder curativo de la naturaleza comenzó alrededor del siglo IV y V antes del Cristo y fue descrito por seguidores de Hipócrates y Galeno entre los años 460 y 200 A.C.⁽¹³⁾. La doctrina sostiene que la naturaleza dota al organismo humano con poderes internos para restaurarse a si mismo su salud. Esta teoría explica la diarrea, la inflamación y la fiebre (entre otros síntomas y signos fisiológicos) como intentos del organismo para alcanzar la homeostasis.

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en la naturaleza, en muchos casos, asociado con aspectos mágico-religiosos. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos ha sido sin duda tan antiguo como la astronomía, la física y la medicina. Actualmente, el estudio sistemático de las drogas naturales es abordado por la

farmacognosia. Esta ciencia se enfoca particularmente al estudio de los principios activos de origen vegetal, animal y mineral, así como de los derivados que pudieran tener una aplicación terapéutica, comercial o industrial. En un sentido más amplio la farmacognosia abarca el estudio de la historia, el cultivo, la recolección, preparación, preservación, comercialización, distribución, identificación y evaluación de los componentes químicos de origen natural, la farmacología y el uso tradicional de esos compuestos o sus derivados para mejorar la salud y el bienestar del ser humano.

Uno de los temas más preocupantes para la comunidad científica internacional es la constante emergencia de cepas bacterianas refractarias a uno o más antibacterianos, lo que constituye, en la actualidad, un problema de salud pública de alcance mundial (OMS, 2001).

En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología, que a partir de fuentes naturales, han logrado ampliar el arsenal terapéutico encontrando nuevas moléculas (Ávila et al, 2006) ⁽⁴¹⁾

Así, a pesar del gran avance logrado por la síntesis química, las plantas continúan siendo una valiosa fuente de sustancias bioactivas con propiedades antibacterianas (Nascimento et al, 2000) ⁽⁴¹⁾, esto es debido a que éstas producen más de 100 000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden ser agentes antibacterianos (Domingo y López, 2003).⁽⁴¹⁾

Nuestro Perú es poseedor de una diversidad de especies vegetales, que presentan propiedades terapéuticas interesantes, que nos invita a realizar investigaciones científicas y corroborar sus efectos, sobre la salud de la población; pues desde tiempos muy remotos el hombre hizo uso de la naturaleza. Es sabido que los productos naturales causan pocos o escasos efectos adversos, pero eso no quiere decir que son inocuos, todo va depender de la dosis y forma de administración.

El matico (*Piper aduncum* o *Piper angustifolium*), comúnmente conocido como hierba del soldado, cordoncillo, entre otras, es una planta medicinal originaria de América meridional, crece particularmente en Perú, Bolivia, Paraguay, Brasil, Ecuador y en el norte de la Argentina.^(3,6)

Se caracteriza por las propiedades hemostáticas, astringentes, desinfectantes, desinflamantes, bactericidas de amplio espectro.

Se dice que el nombre Matico fue asignado debido a que esta planta fue descubierta por un soldado español herido llamado Matico, seguramente él aprendió de las tribus locales, las cuales aplicaban las hojas en las heridas para detener las hemorragias, de ahí el nombre de Matico o hierba del soldado, que posteriormente fue incluida en la Farmacopea de los Estados Unidos a principios del siglo XIX.^(5,6)

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN:

3.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.

Abreú O, Rodríguez A, Morgado M, Cao L., 2012.Cuba.

Investigadores de la Universidad de Camagüey y del Centro de Producción de Medicamentos. Ciego de Ávila; realizaron el trabajo de investigación titulado: “Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoetimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*.). Llegaron a la conclusión que las investigaciones farmacognósticas, los estudios botánicos, geográficos y etimológicos pueden ser de gran significación para el estudio de esta planta. Para cualquier investigación con esta especie resulta imprescindible abordar su tratamiento taxonómico en el país, porque incluye 2 categorías infra específicas en las cuales la ubicación geográfica es fundamental. ⁽¹⁴⁾.

Alonso J. 2010- Quito-Ecuador.

Docente de Maestría de la Universidad Politécnica Salesiana en la Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas, realizó una monografía sobre *Piper aduncum* L. (Matico); llegando a la conclusión que se emplea en el tratamiento de hemorragias internas y externas. Además, se utiliza en caso de heridas, caídas, golpes, contusiones, picaduras venenosas, diarrea, blenorragia, tumores de la matriz, inflamación de garganta, sarpullidos, etc.⁽²⁾.

De Lima A, Salem J, de Souza J, Cortez A, Carvalho C, da Veíga Junior V, et al. 2011-Brasil.

Realizaron la investigación titulada: “Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*”. Según sus resultados concluyeron que los hongos endófitos aislados de *P. aduncum* L. (Piperaceae), produjeron extracelular metabolitos (presentes en el filtrado de cultivo) que afectan el crecimiento de *M. tuberculosis*. Estos compuestos tienen el potencial para ser utilizado como antimicrobianos o en el diagnóstico de las tuberculosis.⁽¹⁶⁾

Santos Maximillan Leite et al., 2013-Brasil.

Investigadores de la Universidad Federal de Santa María, realizaron el trabajo titulado: “Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*.”

Concluyeron que el extracto hecho por maceración con el etanol tiene mayor contenido de sesquiterpenos y actividad antifúngica. Este extracto puede ser útil como alternativa de tratamiento de dermatofitosis.⁽¹⁷⁾

Lina E, Dadang, Manuwoto S, Syahbirin G, Prijono D. 2013-Indonesia.

Investigadores de la Universidad Bogor de Indonesia, realizaron el trabajo titulado: “Synergisticaction of mixedextracts of *Brucea javanica* (Simaroubaceae), *Piper aduncum* (Piperaceae), and *Tephrosia vogelii*

(Leguminosae) against cabbage head caterpillar, *Crociodolomia pavonana*.”

Llegaron a concluir en *Tephrosia vogelei* hoja, semilla *Javanica brucea*, y *Piper* extractos de frutas *aduncum*, probados por separado, tuvieron buena actividad insecticida contra larvas *pavonana* *Crociodolomia*. (LC₅₀ < 0,5%). Nivel AtL C₅₀ y LC₉₅, una mezcla de *T. vogelei*, *B. javanica* y *P. aduncum* (1:3:2.5) estaban fuertemente sinérgica contra larvas de *C. pavonana*.⁽¹⁸⁾

Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa T.M, Demedio J.2011- Cuba.

Realizaron la investigación titulada: “Caracterización química y actividad Acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* L. subespecie *ossanum* frente a *Varroa destructor*”. Según sus resultados concluyen que el aceite de *P. aduncum* L. subespecie *ossanum* demostró que posee un efecto acaricida frente a *V. destructor*. Los componentes mayoritarios son: el canfeno, alcanfor, piperitona y viridiflorol⁽¹⁹⁾.

Ruiz S, Anjos M, Carrara V, de Lima J, Cortez D, Abreu Filho B, et al 2013 - Brasil.

Investigadores de la Escuela de Post grado de Ciencias de Alimentos y Ciencias farmacéuticas de la Universidad de Brasil, realizaron el trabajo titulado: “Evaluation of the Antibacterial Activity of Piperaceae Extracts and Nisinon *Alicyclobacillus acidoterrestris*” Según resultados concluyeron que los extractos del género *Piper* pueden proporcionar una alternativa a la utilización de tratamiento térmico para el control de *Alicyclobacillus acidoterrestris*⁽²⁰⁾.

Silva G, de Oliveira C, Teles H, Pauletti P, Castro-Gamboa I, Silva D, et al. 2010 - Brasil.

Investigaron : “Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae).

Según sus resultados hallaron dos nuevos sesquiterpenos presilhiperfolane 1 y 2, fueron aislados del extracto acetato de etilo de *Xylaria sp.*, Que se obtiene de las hojas de *Piper aduncum*, junto con dos eremophilane conocido como sesquiterpenos, phaseolinone (3) y phomenone (4). Las estructuras químicas 1 y 2 fueron establecidos por los análisis de los datos espectroscópicos. Los cuatro compuestos se ensayaron in vitro para determinar la actividad antifúngica y la citotoxicidad con CHO (ovario de hámster chino). Los compuestos 1 y 2 no mostraron ninguna citotóxica ni antifúngica. Los compuestos 3 y 4 muestran actividades citotóxicas moderadas, así como 4 actividad antifúngica ⁽²¹⁾.

Silva W, de Souza Martins J, de Souza H, Heinzen H, Cesio M, de Barros N, et al.2009- Brasil.

Investigaron “Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattletick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae).Concluyeron en que los extractos de *P.aduncum* L., y en particular su aceite esencial, son potenciales agentes de control alternativa para *R.microplus* ⁽²²⁾.

3.1.2.ANTECEDENTES NACIONALES.

Existe científica en el ámbito nacional en las Universidades Nacionales y Privadas.

Arroyo J, Bonilla P, Tomas G, Huamán J. Lima- Perú, 2011.

Docentes investigadores de las Facultades de Medicina Humana y de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de “San Marcos”, realizaron la investigación titulada: “Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* “Matico”. Los resultados obtenidos determinaron que el análisis fitoquímico determinó presencia de: saponinas, taninos, quinonas, flavonoides y alcaloides. Por análisis cromatográfico se observa que hay mayor cantidad de metabolitos polares. Los marcadores químicos del

extracto etanólico total y metanólico son los flavonoides y alcaloides. Se determinó la cantidad de polifenoles totales ⁽²³⁾.

Arroyo J, Almora Y, Quino M, Raez E, Martínez J, Buendía J. Lima-Perú, 2012. Investigadores de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de “San Marcos”, realizaron la investigación titulada: “Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina”. Concluyeron que el extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* (matico) y su fitomedicamento ejercieron efecto protector de la cirrosis inducida en ratas, comparativamente con la silimarina ⁽²⁴⁾.

Arroyo J, Hañari R, Baca D, Domínguez L, Buendía J. Lima-Perú, 2012.

Realizaron una investigación en la Facultad de Medicina Humana de Universidad Nacional Mayor de San Marcos, titulada: “Efecto Antihipertensivo del Extracto de *Piper aduncum* “matico” sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones”. Concluyeron que en condiciones experimentales, se demostró la actividad antihipertensiva del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* “matico”⁽²⁵⁾.

Zaa C, Valdivia M, Marcelo A. Lima- Perú, 2012.

Docentes investigadores de la Facultad de Ciencias biológicas de la UNMSM, realizaron la investigación titulada “Efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* “matico” en un modelo in vitro de neurodegeneración. Llegaron a la conclusión que el *Piper aduncum* evidencia efecto neuroprotector para el modelo estudiado.⁽²⁶⁾.

Arroyo J, Bonilla P, Moreno L, Ronceros G, Tomas G, Huán J., et al, Lima- Perú, 2013.

Realizaron la investigación titulada: “Efecto gastroprotector y antisecretor de un fitofármaco de hojas de matico (*Piper aduncum*). Sus resultados de su investigación concluyeron que en condiciones experimentales los

extractos etanólicos sus fracciones y su fitofármaco son gastroprotectores en ratones y antiseoretos en ratas ⁽²⁷⁾.

Arroyo J, Herrera O, Chávez R, Ventura E, Buendía J, et al Lima-Perú, 2014.

Investigadores de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de “San Marcos”, realizaron la investigación titulada: “Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) y su toxicidad oral en ratones”. Concluyeron que el aceite de *Piper aduncum*, no presentó efecto antitumoral in vitro para las siete líneas celulares tumorales humanas y no fue tóxico ⁽²⁸⁾.

Matute M. Lima- Perú, 2009. Realizó una investigación titulada: Evaluación In Vitro del Extracto de *Piper angustifolium* (Matico) y la Clorhexidina como Antisépticos Bucales. Para Optar el Título Profesional de Cirujano-Dentista en la Universidad Nacional Federico Villareal. Según los resultados concluye que el extracto etanólico de Matico presentó un halo de inhibición mayor comparado con el de Clorhexidina al 0.12% frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* ⁽²⁹⁾.

Méndez C. Arequipa –Perú, 2010. Realizó el trabajo titulado: “Efectividad del Gel de Matico (*Piper angustifolium*). En la evolución de la cicatrización de heridas de la Mucosa bucal post exodoncia del tercer molar inferior incluido en el Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo Arequipa 2010. Tesis para Optar el Título de Cirujano Dentista en la Universidad Privada “Alas Peruanas”. Según sus resultados concluye que el Gel de Matico, se constituye una herramienta útil para conseguir mejores resultados en el post operatorio de endodoncias de piezas incluidas ⁽³⁰⁾.

3.1.3 ANTECEDENTES A NIVEL LOCAL – REGIONAL.

En nuestra Región no hay reportes sobre la Actividad Antibacteriana del *Piper aduncum* L.(Matico).

3.2. BASES TEÓRICAS:

3.2.1. *PIPER ADUNCUM* L. (Matico)

3.2.1.1. Descripción Botánica:

Se trata de un arbusto perteneciente a la familia de las Piperáceas que alcanza una altura entre 2 a 2.5 metros de alto. Su tallo es herbáceo, dicotómico, con numerosas ramas delgadas con nudos salientes y vellosidades, longitudinalmente estriado. Sus hojas son simples, grandes con peciolo corto, limbo entero aovado lanceolado, coriáceo, de superficie áspera, muy reticulado de color verde intenso, olor aromático característico, ápice agudo atenuado en la base, de disposición opuesta. Las flores son pequeñas numerosas, hermafroditas, cáliz persistente, corola blanca, gamopétala, de limbo extendido. Androceo formado por dos a cuatro estambres, gineceo superovário, sésil, tricarpelar, rodeado de un involucreo verdoso. El fruto es una drupa de color negro y contiene una semilla pequeña oscura en su interior ^(3,5).



Figura N°3 Hojas de *Piper aduncum* L.(Matico).

Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: Piper

Especie: *Piper aduncum* L.

Nombre Común: Matico, yerba del soldado, cordoncillo, anisillo, piper, pimienta, hierba de jaboti, jaborandi falso, moco-moco, gusanillo, etc.

Sinonimia botánica: *Piper elongatum*, *Piper expositum*, *Piper granulosum*, *piper angustifolium*, *Piper*, *celtidifolium*, etc.

3.2.1.3. Hábitat: Habita en sierra baja abrigada, valles interandinos entre los 2600 y 2700 msnm. Cajamarca, Cusco, Junín, Lima, se extiende a Bolivia, Chile, Ecuador y Argentina ^(1,2).

3.2.1.4. Usos en la Medicina tradicional:

Su principal propiedad medicinal es la de ayudar en la cicatrización de todo tipo de heridas, ya sea externas o internas, por lo que es útil en el tratamiento de la úlcera digestiva. Externamente, su efecto benéfico sobre heridas de lenta cicatrización es muy sorprendente. Se le reconoce bondades hemostáticas y en algunos trastornos de las vías urinarias: cistitis, uretritis, leucorrea, vaginitis, gonorrea y tricomoniasis. Además, también es empleado en el tratamiento de enfermedades respiratorias como la bronquitis, pleuritis, neumonía, resfriados, gripe y amigdalitis y dolores de garganta. En otras comunidades indígenas, es utilizada para aliviar afecciones de dolor de muela y en el tratamiento de picaduras de alacrán.⁽³⁾

Sin embargo, la principal y que parece útil mantener en primer lugar su propiedad vulneraria, vale decir, cicatrizante de heridas.

Los trastornos gástricos o infecciones hepáticas también pueden verse mejoradas gracias a los beneficiosos efectos que produce. El matico es considerada una de las principales plantas medicinales tanto en Ecuador como en Guatemala, México, Perú y región del Altiplano. En Ecuador es planta aromática y antiséptica (en forma de gargarismos). La infusión se recomienda en casos de úlceras gástricas y en diarreas infantiles. En forma de emplastos o compresas posee muy buen efecto hemostático en trastornos hemorroidales y úlceras sangrantes de extremidades. ^(3,6,30).

En Guatemala, México y el Altiplano se utiliza la infusión para realizar baños externos en procesos de infección vaginal (candidiasis), dolores reumáticos y heridas en piel. En uso interno (de sabor muy amargo) se toman dos o tres tazas diarias en casos de úlcera gástrica y trastornos espasmódicos. En Bolivia y noroeste argentino se preparan cataplasmas con las hojas machacadas para calmar los dolores reumáticos; mientras que la infusión sería útil en casos de gonorrea. Las flores, en forma de emplasto, se utilizan contra los procesos supurativos y el cocimiento de las semillas en casos de paludismo.⁽⁶⁾

En Perú y noroeste argentino se utiliza el cocimiento de las hojas por vía externa, como gran hemostático para cicatrizar heridas y llagas, o espolvoreando en ellas las hojas secas y molidas. En Perú también se emplea el polvo de las hojas para cicatrizar el ombligo de los niños recién nacidos.⁽⁶⁾

3.2.1.5. Formas de usos tradicionales :

- Decocción: es usado en lavados locales, como desinflamante de afecciones en la piel, favorece la cicatrización de heridas.
- Infusión: En gárgaras se usa como antiinflamatorio bucal administrado por v/o es útil para el tratamiento de úlceras y gastritis, infecciones urinarias, y diarreas infantiles.

- Baños de asiento.

3.2.1.6. Historia :

Esta planta tiene una larga tradición de uso en Sudamérica, habiendo sido muy estimada por las distintas etnias aborígenes. En tanto *matico* es el nombre del soldado español que herido durante la época de la conquista, descubrió accidentalmente sus propiedades curativas. En el Perú, se emplea desde le época preincaica ^(3,5).

3.2.1.7. Parte utilizada:

Hojas y ramas jóvenes, tallos, y frutos.

3.2.1.8. Principios activos:

Contiene Aceites esenciales, ácido artánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, triterpenoides ^(6,23).

3.2.1.9. Acciones Farmacológicas:

El aceite esencial de esta planta, ha mostrado actividad antibiótica in vitro frente a diversas cepas de bacterias, hongos y levaduras. Así, a la concentración de 20 mg/mL., se obtuvo respuesta frente a las especies de bacterias : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacteriums megmatis*, esta última responsable de la tuberculosis. También se ha encontrado que tiene actúa contra los hongos.

Otras investigaciones se han centrado en la utilización del matico como un posible tratamiento para la leishmaniasis y la esquistomiasis que es muy frecuente en la Amazonía y en las zonas tropicales de América del Sur. Mostrando entonces propiedades bactericidas y molusquicidas. Extractos de hojas preparados con butanol, cloroformo y éter petróleo han mostrado actividad hipotensora ^(23,27).

3.2.1.10. Efectos adversos y/o tóxicos:

De acuerdo a estudios realizados utilizando diferentes concentraciones del aceite esencial de *Piper aduncum L.*, se obtuvo el valor de LD₅₀

corresponde a $2.400 \pm 191,7$ mg / kg de peso corporal (Pergentino; 2007), perteneciendo por tanto a la clase de agentes xenobióticos de baja toxicidad. Sin embargo después de la administración diaria a los animales de prueba se demostró que estos tenían pérdida de equilibrio, problemas de respiración abdominal y ausencia de coordinación. En dosis entre 200 y 2000 mg/kg, las ratas mostraron aumento de la excreción de heces y orina y en dosis de 3500 mg/kg se da una ligera parálisis además de la reducción de la excreción de heces y orina. El aceite esencial no alteró significativamente los parámetros hematológicos y bioquímicos en comparación con el control en el tratamiento de la subaguda, con excepción de la reducción de la creatinina. El aceite esencial de *Piper aduncum L.*, tiene un alto margen de seguridad, con efecto mínimo en toxicidad hematológica y bioquímica^(6,19).

3.2.1.11. Contraindicaciones:

No reportados.

3.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Las propiedades antimicrobianas de sustancias y aceites esenciales que las plantas contienen como productos de su metabolismo secundario han sido reconocidas empíricamente durante siglos, pero sólo recientemente fueron confirmadas científicamente. Varios grupos de investigadores han estudiado la actividad biológica de plantas medicinales originarias de diversas regiones del mundo, guiados por el uso popular de las especies nativas. Por otro lado, los microorganismos que causan perjuicios a la salud humana se están mostrando resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, lo que ha incentivado aún más la búsqueda por antibióticos de ocurrencia natural. Extractos y aceites esenciales de plantas se han mostrado eficaces en el control del crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Se han sugerido usos prácticos de estas

actividades en humanos y animales, así como en la industria de alimentos.⁽³¹⁾

3.2.2.1. Agentes antimicrobianos.-

Existen muchas definiciones sobre los agentes antimicrobianos, se puede considerar que son aquellos utilizados para destruir o impedir el crecimiento de los microorganismos. Según su estado pueden ser: líquidos, sólidos o gases y por su naturaleza, físicos y químicos. Su eficacia de estos agentes está condicionada por varios factores como son: la naturaleza, concentración y características de la población microbiana presente, la temperatura, la duración del contacto entre el agente y los microorganismos, la naturaleza del material para descontaminar, particularmente la presencia de material orgánico, y el pH. ⁽³²⁾

Los agentes antimicrobianos van actuar sobre la estructura de la célula bacteriana y sobre sus procesos metabólicos, y sus modos posibles de acción son: desnaturalización de la proteína, rompimiento de la membrana o de la pared celular, remoción de grupos sulfhidrilos libres, interferencia con reacciones enzimáticas de los microorganismos y acción sobre el ADN. ⁽³²⁾.

Los agentes antimicrobianos, por su acción, se pueden considerar bacteriostáticos o bactericidas y por su naturaleza pueden ser físicos o químicos. Entre los agentes físicos de esterilización se utiliza especialmente el calor (calor húmedo y calor seco), la filtración y las radiaciones. Con respecto a los agentes químicos, algunos tienen inconvenientes para su uso, por no cumplir el principio de toxicidad selectiva, porque resultan muy tóxicos e irritantes para el hombre o porque afectan los materiales a esterilizar. ⁽³²⁾

Existen agentes químicos que pueden emplearse como esterilizantes, por su enérgica acción sobre los microorganismos, pero muchos tienen que usarse diluidos, con el objetivo de disminuir su toxicidad y poder irritante, y en este caso se usan habitualmente como desinfectantes o antisépticos.⁽³²⁾

3.2.2.2. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana:

- **Método de Dilución:**

Fundamento: Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (Caldo o agar).

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica utilizando un medio de cultivo adecuado, posteriormente se inocular dicho medio y tras la correspondiente incubación permite el crecimiento del microorganismo luego se realiza la lectura, determinando que concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo ⁽¹²⁾.

Concentración mínima inhibitoria (CMI): Se puede definir como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. ⁽³⁵⁾

Concentración mínima bacteriostática (CMB): Se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). ⁽³⁵⁾

- **Método de Difusión:**

Fundamento: Para determinar la actividad antibacteriana se realizan pruebas de sensibilidad antibacteriana (Antibiogramas), mediante el método Kirby Bauer (Difusión de Disco en Agar Müeller Hinton).

En este método, la sensibilidad es medida por los halos de inhibición que se evidencian alrededor de discos de papel de filtro, previamente impregnados con los extractos preparados a la concentración a ensayar.

Como control positivo se utilizan discos de sensibilidad para Antibiogramas ^(10,12).

- **Porcentaje de Inhibición relativa (PIR).-**

Tiene por finalidad comparar la actividad antimicrobiana de los extractos frente al control positivo del antibiótico, obteniéndose un porcentaje de inhibición.

$$\text{PIR} = \text{A/B} \times 100$$

Donde :

A : Diámetro de halo de inhibición del extracto.

B : Diámetro de halo de inhibición del antibiótico estándar.

3.2.2 GRUPOS FITOQUÍMICOS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA :

Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios . Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin.

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por plantas.

- **Fenoles y heterósidos fenólicos :**

Compuestos fenólicos simples- Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámico y cafeico. Plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo

(*Thymus vulgaris*), la manzanilla (*Matriarca chamomilla*) y la gayuba (*Arctostaphylos uva ursi*), cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizado a lo largo de los años en el tratamiento de la infección urinaria. Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad.

El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas. Dentro de este grupo cabe destacar también los aceites esenciales, compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina de la planta conocida como pimiento rojo o chile (*Capsicumm annuum*) .⁽³⁴⁾

Quinonas.- Las quinonas son compuestos que presentan anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio. Un ejemplo es la hipericina, una antraquinona aislada de la planta de San Juan (*Hypericum perforatum*), antiguamente utilizada como antidepresivo.⁽³⁴⁾

Taninos.- El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir

hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*)⁽³⁴⁾

Flavonas y compuestos relacionados.- Se puede definir a las flavonas como estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo⁽³³⁾ Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*Camellia sinensis*), las cuales ejercen actividad frente a *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros microorganismos . Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*).

Alcaloides.-

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. Un ejemplo son los derivados de la corteza de la *Cinchona officinalis* (quinina y quinidina), utilizados en el tratamiento de la malaria. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo.⁽³⁴⁾

Cumarinas.-

Las cumarinas son compuestos cuyas acciones antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora, son conocidas. Entre estos compuestos tenemos a la warfarina, que es usada como un anticoagulante oral y como un rodenticida. Se ha visto que tiene acción antiviral, asimismo, otras cumarinas tienen actividad antimicrobiana sobre *Candida albicans* en trabajos in vivo en conejos.⁽³³⁾

Estos trabajos fueron realizados , en 1954, indicaban el uso de cumarinas en lavados vaginales para el tratamiento de candidiasis en mujeres gestantes. Sin embargo, su uso interno es discutido por sus efectos contraceptivos en animales (Cowan, 1999).⁽³³⁾

Terpenoides y aceites esenciales:

Los terpenos o terpenoides son principios activos que actúan contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*. Se considera que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. La capsaicina tiene actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori*; aunque tiene un poder muy irritante sobre la mucosa gástrica, se ha demostrado que afecta el sistema nervioso, el cardiovascular y el digestivo. Se sugiere que la capsaicina también podría incrementar el crecimiento de *Candida albicans*⁽³³⁾

3.2.2.4. Bacterias Patógenas.-

Las bacterias patógenas son aquellas que producen enfermedades, es decir, causan daño en el hospedero. Generalmente, las bacterias patógenas son específicas, ya que un tipo de bacteria origina una enfermedad en personas, animales y plantas.

Algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades infecciosas incluyendo el cólera, sífilis, lepra, tifus, difteria, escarlatina, etc. Las enfermedades bacterianas mortales más comunes son las infecciones respiratorias como una mortalidad sólo para tuberculosis de cerca de dos millones de personas al año.

• *Bacillus subtilis* .-

Es un bacilo gram-positivo aerobio formador de esporas y muy ubicuitario (agua, suelo, aire, residuos vegetales). Por esta razón es relativamente

fácil que contamine alimentos frescos, principalmente aquellos que pueden tomar contacto con el suelo, o que se encuentre en los alimentos de origen vegetal. Sus esporas pueden sobrevivir a la cocción, germinar a continuación y multiplicarse en forma vegetativa cuando las condiciones ambientales le son propicias. El consumo de alimentos en los que han proliferado, y se encuentren en gran número, se ha relacionado con brotes de procesos gastrointestinales, atribuidos a la ingestión de una toxina preformada en el alimento, o a la generación de la toxina a nivel digestivo. No obstante, la información sobre las intoxicaciones alimentarias por *Bacillus subtilis* son escasas, y sólo se ha descrito implicado en algunos brotes ocasionales. Esta especie de *Bacillus* no se ha considerado patógena. Únicamente se ha relacionado muy ocasionalmente con algunas infecciones de distinta localización. En relación con los alimentos los brotes de intoxicación alimentaria atribuibles a esta especie también han sido muy ocasionales. Se ha descrito la producción de una toxina extracelular, la subtilina, de escasa toxigenicidad y únicamente relacionada con el desarrollo de reacciones alérgicas en individuos que trabajan con cultivos industriales de esta especie bacteriana. Además, se ha descrito la producción de una toxina no proteica termoestable, la amilosina, que sería formadora de canales de iones en las membranas celulares.

Los síntomas de su intoxicación alimentaria por *Bacillus subtilis* son muy similares a los provocados por la intoxicación por *Bacillus cereus*, causante de un cuadro diarreico y emético, el primero de ellos relacionado con el número de bacterias ingeridas, y el segundo relacionado con la cantidad de toxina emética ingerida. El comienzo de la sintomatología podrían ser tan pronto como a los 10 minutos de la ingestión, y podrían durar hasta 2 días. Su relación con la producción de cuadros de intoxicación alimentaria se produciría cuando se alcanza una concentración de 10^6 *Bacillus*, como *Bacillus cereus* sería suficiente con alcanzar el número de 10^5 células/gramo). células por gramo de alimento.

- ***Staphylococcus aureus***.

Los estafilococos se caracterizan por ser células esféricas, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que pueden ser individuales, en pares o grupos ⁽³²⁾. No tiene movilidad y no forma esporas, es anaerobia facultativa y de metabolismo fermentativo. Las colonias habitualmente son opacas y de color blanco o crema, a veces, amarilla a naranjas. Es catalasa positiva, oxidasa negativa y con frecuencia reduce el nitrato a nitrito. Crece en medios con 10% de cloruro de sodio. La temperatura óptima de crecimiento es 30 – 37°C.

Después de la incubación en agar-sangre, *S. aureus* reduce colonias blancas que tienden a adoptar un color amarillo dorado con el paso del tiempo. Casi todas las cepas tienen un borde de hemólisis beta claro que rodea la colonia. El estudio más usado para distinguir a *S. aureus* de otros estafilococos es la producción de coagulasa, que se fija de manera no enzimática a la protrombina y forma con ella un complejo que inicia la polimerización de la fibrina.

El *S. aureus* provoca más frecuentemente infecciones en la piel, como foliculitis, forúnculos, impétigo y celulitis, que se limitan a una pequeña área de la piel de una persona. El *S. aureus* también puede liberar toxinas (sustancias tóxicas) que pueden producir enfermedades tales como intoxicación por alimentos o síndrome de shock tóxico⁽³⁶⁾

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Son células planas o ligeramente curvadas, de 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 μm . Es una bacteria Gram negativa de motilidad unipolar. Aeróbica, con un tipo de metabolismo con oxígeno como aceptor terminal de electrones. Tiene una elevada concentración de citocromooxidasa (es positivo a la oxidasa). Se la identifica, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas *in vitro*. La identificación clínica definitiva de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye, la producción de piocianina y fluoresceína, y su habilidad de crecer a 42°C. ⁽¹⁰⁾

Pseudomonas aeruginosa es lo suficientemente variable en su crecimiento y en sus necesidades energéticas como para emplear moléculas simples (como amoníaco y dióxido de carbono) como únicas fuentes de nitrógeno y carbono. Gracias a ello, no necesita medios enriquecidos para crecer y puede sobrevivir y multiplicarse en límites amplios de temperatura en casi cualquier ambiente, incluso aunque éste se caracterice por un contenido elevado de sal.

Este patógeno oportunista de individuos inmuno comprometidos, infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y es el causante de otras enfermedades en la sangre.⁽³⁶⁾

También, la *P. aeruginosa* es causante de dermatitis, originada por disminución del control de la calidad del agua de uso doméstico. Es el factor más común causante de altas fiebres en infecciones. Además, ha estado involucrado en foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo.

- ***Escherichia coli*.**

Las bacterias de la especie *Escherichia coli* son células cilíndricas, de aproximadamente 1.1 – 1.5 x 2.0 – 6.0 µm, que pueden presentarse individuales o en pares. Gram negativas. Aeróbicas o aeróbicas facultativas, con tipo de metabolismo respiratorio y fermentativo. Produce ácido y gas de la mayoría de carbohidratos. Es Oxidasa negativa y fermenta la lactosa. Usualmente, no produce ácido sulfhídrico (H₂S).

Las cepas de *Escherichia coli* generalmente no son patógenas, sino indicadores de contaminación fecal. Su presencia en una muestra implica que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos, pueden estar presentes en la misma. Sólo algunas cepas de *Escherichia coli* son consideradas agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas entéricas se diferencian entre sí y de las no patógenas por su biotipo, generalmente asociado a la presencia de plásmidos.

La contaminación fecal puede originarse en las materias primas utilizadas en la elaboración de un producto o por contaminación durante o posterior al proceso de elaboración.⁽³⁶⁾

El número de bacterias generalmente depende del tipo de producto y proceso, y determina el procedimiento que se realizará para aislar bacterias que pertenezcan a la especie *E. coli*. En muestras de origen natural se podría esperar un número más alto de estas bacterias.

En ese caso no se realiza la etapa de enriquecimiento sino que directamente se cuenta el número de estas bacterias empleando un método de recuento de bacterias viables en un medio selectivo para *E. coli*.

3.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

- **Actividad antibacteriana.**- Capacidad de destruir o matar a las bacterias e impedir su proliferación y su acción patógena.
- **Antisépticos.**- Son sustancias desinfectantes que pueden ser utilizados sobre la piel, y en casos especiales sobre las mucosas.⁽³²⁾
- **Bactericida.**- Se le define como un agente que mata a las bacterias.⁽³²⁾
- **Bacteriostático.**- Es el agente que inhibe el crecimiento de la bacteria; esto continúa cuando se retira el agente.⁽³²⁾
- **Bacterias patógenas.**- Son aquellas que causan enfermedades infecciosas.
- **Cocimiento.**- Llamado también decoctos, son preparaciones farmacéuticas obtenidas por decocción (extracción de los principios activos obtenidos por contacto prolongado con agua hirviendo o muy caliente, hasta ebullición. Luego se deja en reposo por 10 minutos y se filtra.⁽⁹⁾

- **Droga vegetal.-** Parte de la planta que contiene el principio activo y que se utiliza en terapéutica.⁽³⁹⁾
- **Emplastos.-** Son preparaciones flexibles en las que las sustancias vegetales se mezclan con sustancias grasas o resinosas. Se aplican directamente en la piel.
- **Extracto.-** Son preparados obtenidos por concentración parcial de los líquidos extractivos.⁽⁷⁾
- **Extracto acuoso.-** Preparación en agua destilada de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular.
- **Extracto etanólico.-** Preparación en alcohol de la sustancia de una planta medicinal que contiene la porción biológicamente activa.
- **Extracto fluido.-** Extracto líquido de drogas crudas que contienen etanol como menstruo, como preservativo o como ambos fines, en el cual cada mililitro de extracto equivale a un gramo de droga.⁽⁷⁾
- **Fitoquímica.-** es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales.
- **Hemostático.-** Sustancia capaz de retener la hemorragia ya sea estimulando la contracción de las paredes vasculares, ocluyendo el vaso afectado o favoreciendo la coagulación sanguínea.
- **Infusiones.-** Son preparados líquidos obtenidos por infusión (extracción de los principios activos vertiendo agua hirviendo o muy caliente sobre la droga seca y pulverizada, dejando reposar 10 min).

- **Maceración.-** Consiste en la extracción de los principios activos de la droga triturada, a temperatura ambiente, utilizando agua, aceite o alcohol, generalmente, como disolvente. El tiempo de maceración depende de la naturaleza del disolvente a usar.
- **Medicina tradicional.-** Conjunto de creencias y conocimientos, sobre las enfermedades y su curación que proceden de la tradición y de la experiencia, no del estudio científico.
- **Menstruo.-** Solvente mediante el cual se efectúa el proceso de extracción de la droga cruda que generalmente está constituido por mezclas hidroalcohólicas o agua.⁽⁷⁾
- ***Piper aduncum* L.-** Especie que pertenece a la familia de las pipeáceas, es un arbusto perenne de hasta 5 m de alto, hojas alternas y pecioladas. Crece en Costa, Sierra y Amazonia hasta 2,700 msnm.
- **Piperaceae.-** La familia Piperaceae incluye de 10 a 12 géneros, dentro de ellas cerca de 700 especies pertenecen al género Piper ; de algunas de ellas se obtiene la conocida pimienta negra y blanca. Sus especies se caracterizan por ser arbustos y herbáceas ⁽²⁾.
- **Planta medicinal.-** Cualquier vegetal que contenga en cualquiera de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos.⁽³⁹⁾
- **Principio activo.-** Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.⁽³⁹⁾
- **Vulnerario .-** Sirve para el lavado de heridas.

CAPÍTULO V

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE TABLAS Y GRÁFICOS:

Tabla Nº 1: Screening fitoquímico del extracto acuoso de
Piper aduncum L. (Matico).

Metabolitos	Reacción	Resultado	Observación
Taninos	Sol. de Gelatina	++	Turbidez
Compuestos fenólicos libres	Sol. De FeCl ₃	++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	++	Coloración rosa-naranjado
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado Anaranjado
	Mayer	++	Precipitado blanco
	Wagner	++	Precipitado marrón
Saponinas	Prueba de Espuma	+	Formación de espuma.

Fuente : La autora

Leyenda: (+++) Abundante, (++)Moderado, (+)Leve, (-)Ausente.

Análisis de la tabla N°1 : El screening fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L. (matico) demostró que hubo moderada(++) presencia de taninos, compuestos fenólicos libres, flavonoides y leve presencia de saponinas.

Tabla N° 2: Screening fitoquímico del extracto etanólico de *Piper aduncum* L.

Metabolitos	Reacción	Resultado	Observación
Taninos	Sol. de Gelatina	++	Turbidez
Compuestos fenólicos libres	Sol. De FeCl ₃	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración roja
Alcaloides	Dragendorff	++	Precipitado Anaranjado
	Mayer	++	Precipitado blanco
	Wagner	++	Precipitado marrón
Triterpenos y Esteroides	Liebermann - Burchard	++	Coloración verde oscuro
Quinonas	Borträger	++	La fase acuosa se colorea de rosado.
Saponinas	Prueba de Espuma	+	Formación de espuma.

Fuente : La autora

Leyenda: (+++) Abundante, (++)Moderado, (+)Leve, (-)Ausente.

Análisis de la tabla N°2 : El screening fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (matico) demostró que hubo abundante(+++) presencia de compuestos fenólicos libres y flavonoides, moderada presencia de taninos, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas y una leve presencia de saponinas.

Tabla Nº 3: Método de Difusión en disco del extracto acuoso de *Piper aduncum* L.(Matico)

Bacterias patógenas	Diámetro (mm) de zona de Inhibición			Control positivo	PIR%
	Concentraciones (mg/mL)				
	100%	50%	25%		
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.6	13.4	11.5	16.0	71.87
<i>Bacillus subtilis</i>	8.4	6.7	5.3	17.0	31.18
<i>Escherichia coli</i>	6.1	5.2	4.3	16.0	26.88
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-

Fuente : La autora.

Donde:

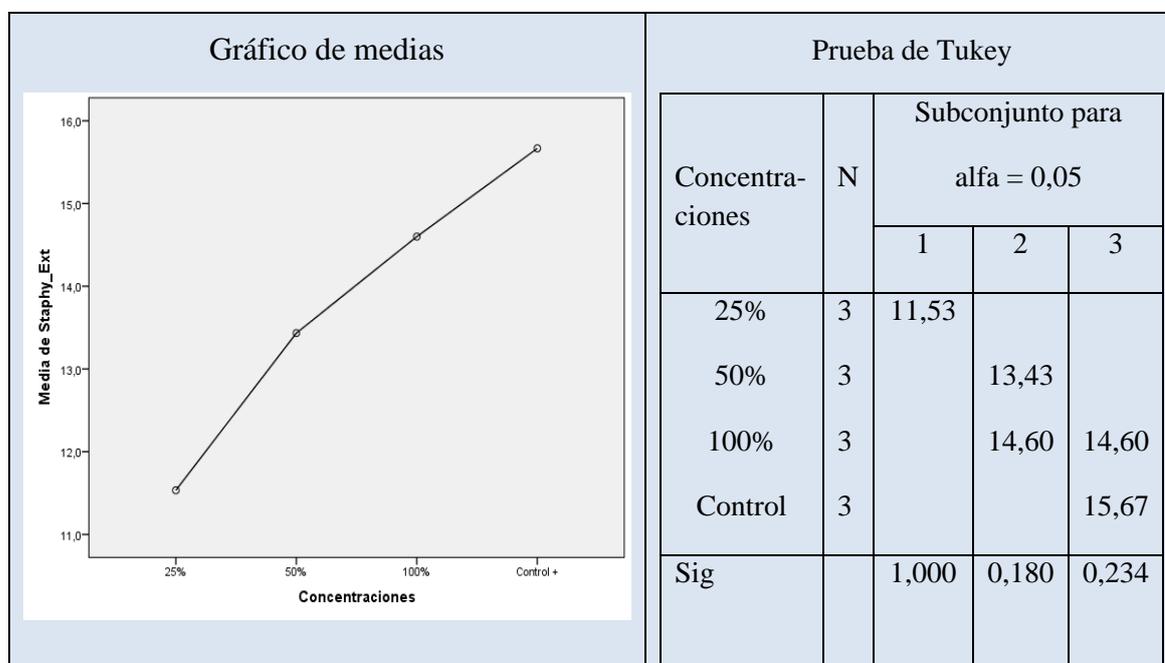
- C.P. = Cloranfenicol 30 µg
- C.N.= Agua destilada
- PIR = Porcentaje de Inhibición Relativa

Tabla N° 3: Método de Difusión en disco del extracto acuoso de *Piper aduncum* L.(Matico).

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para los dos protocolos que evidenciaron actividad antibacteriana. Se aplicó ANOVA unifactorial a los diámetros totales y la significancia se reportó con un nivel de confianza del 95%.

ANOVA : *Staphylococcus aureus*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	28,19	3	9,40	24,09		0,000	Si hay dif.
Dentro cc	3,12	8	0,39				
TOTAL	31,31	11					

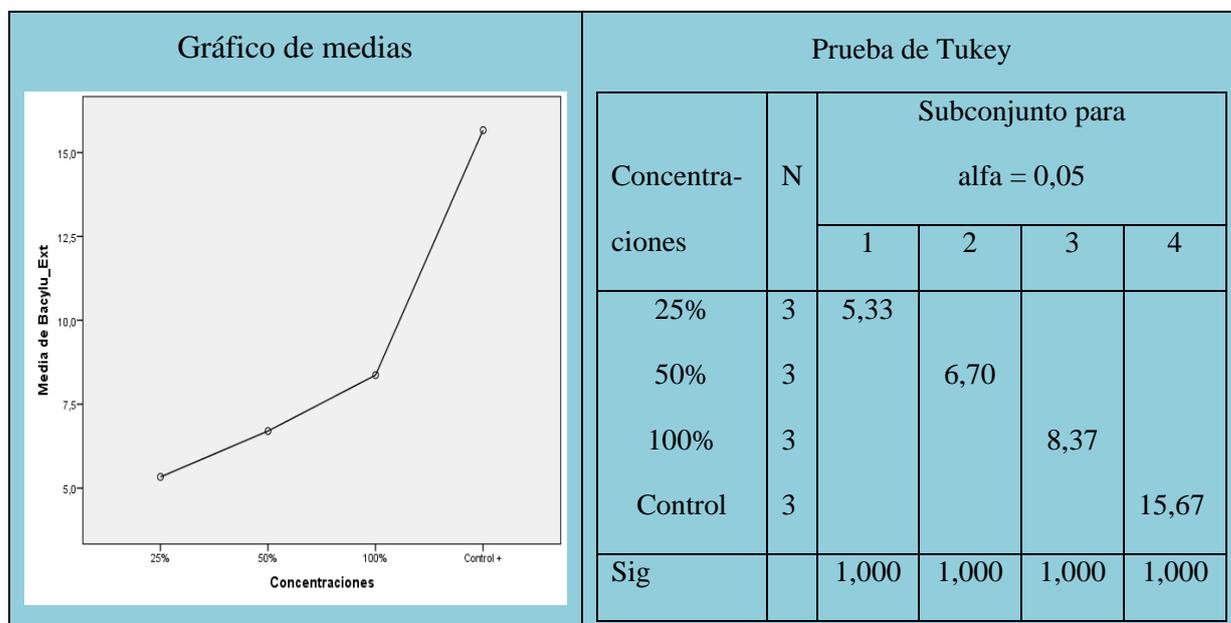


Análisis de la tabla N°3 de ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ($p < 0,05$) por lo que se concluye que si hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para el *Staphylococcus aureus*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se tiene que a una concentración del 100% del extracto acuoso se obtiene el mayor promedio del diámetro 14,60 mm similar al diámetro obtenido con el cloranfenicol que se utilizó como control positivo.

ANOVA : *Bacillus subtilis*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	190,74	3	63,58	397,37		0,000	Si hay dif.
Dentro cc	1,28	8	0,16				
TOTAL	192,02	11					

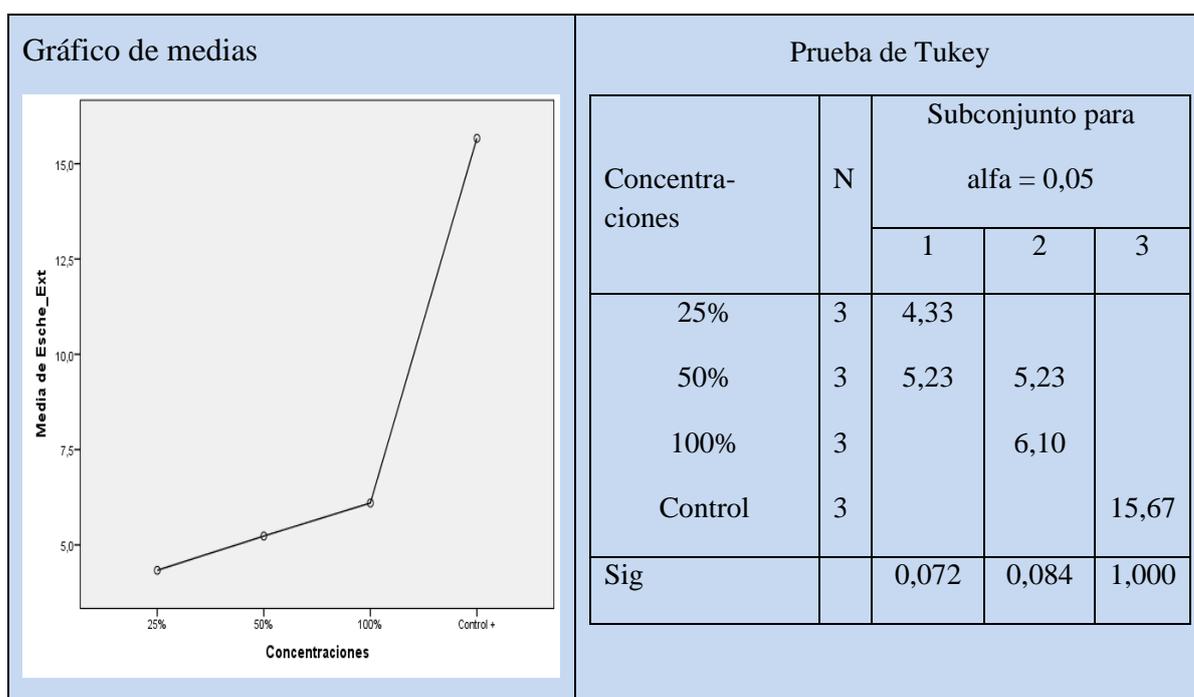


Análisis de la tabla N°3: de ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ($p < 0,05$) por lo que se concluye que si hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para el *Bacillus subtilis*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se tiene que a una concentración del 100% del extracto acuoso se obtiene el mayor promedio del diámetro 8,37 mm, pero inferior al diámetro con el cloranfenicol con 15,67 mm que se utilizó como control positivo.

ANOVA *Escherichia coli*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	250,13	3	83,38	595,54		0,000	Si hay dif.
Dentro cc	1,12	8	0,14				
TOTAL	251,25	11					



Análisis de la tabla N°3 de ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ($p < 0,05$) por lo que se concluye que si hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para *Escherichia coli*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se tiene que a una concentración del 50% y del 100% del extracto acuoso se obtienen los mayores promedios del diámetro 5,23 y 6,10 mm, pero inferior al diámetro con el cloranfenicol con 15,67 mm que se utilizó como control positivo.

Tabla N° 4: Método de Difusión en disco del etanólico de *Piper aduncum* L.(Matico)

Bacterias patógenas	Diámetro (mm) de zona de Inhibición			Control positivo	PIR%
	Concentraciones (mg/mL)				
	100%	50%	25%		
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.0	11.2	9.4	19.0	49.47
<i>Bacillus subtilis</i>	15.0	12.0	11.1	19.0	58.42
<i>Escherichia coli</i>	17.0	16.4	16.1	18.0	89.44
<i>Pseudomona aeuroginosa</i>	-	-	-	-	-

Fuente : La autora.

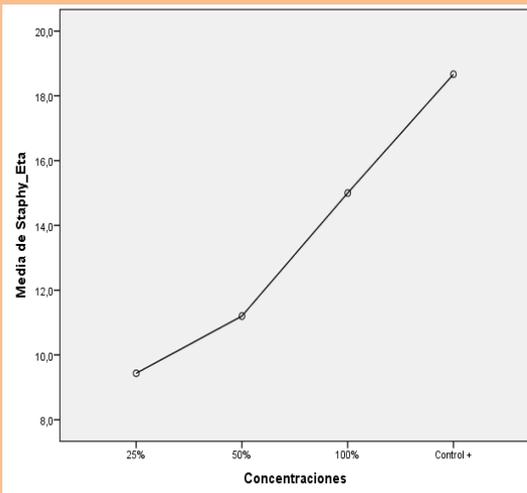
Donde:

- C.P. = Cloranfenicol 30 μ g
- C.N.= Alcohol de 96°
- PIR = Porcentaje de Inhibición Relativa

Tabla N° 4: Método de Difusión en disco del etanólico de *Piper aduncum* L.(Matico)

ANOVA : *Staphylococcus aureus*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	152,25	3	50,75	145,34		0,000	Si hay
Dentro cc	2,79	8	0,35				dif.
TOTAL	155,04	11					

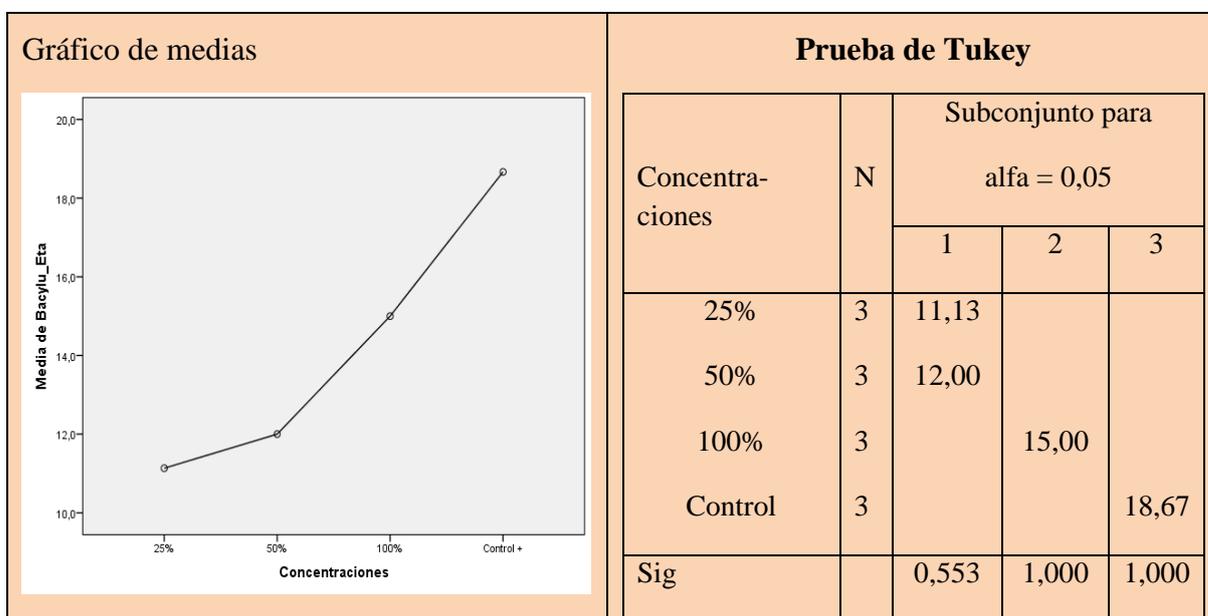
Gráfico de medias		Prueba de Tukey					
		Concentraciones	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
				1	2	3	4
		25%	3	9,43			
		50%	3		11,2		
		100%	3		0	15,0	
		Control +	3			0	18,67
		Sig		1,000	1,000	1,000	1,000

Análisis de la tabla N°4 La tabla da ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ($p < 0,05$) por lo que se concluye que si hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para el *Staphylococcus aureus*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se tiene que a una concentración del 100% del disco con extracto etanólico se obtiene el mayor promedio del diámetro 15,00 mm pero inferior al diámetro obtenido con el cloranfenicol 18,67 mm que se utilizó como control positivo.

ANOVA *Bacillus subtilis*

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	104,51	3	34,84	57,42		0,000	Si hay dif.
Dentro cc	4,85	8	0,61				
TOTAL	109,36	11					

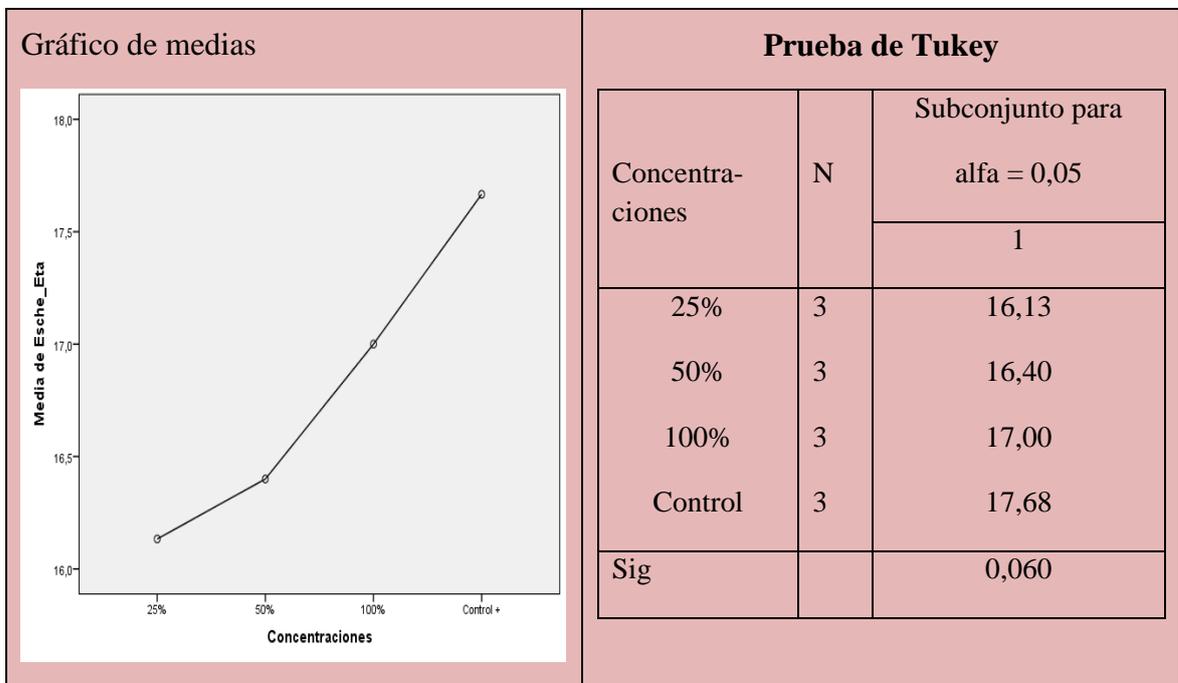


Análisis de la tabla N°4: De ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,000 ($p < 0,05$) por lo que se concluye que si hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para el *Bacillus subtilis*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se tiene que a una concentración del 100% del disco del extracto etanólico se obtiene el mayor promedio del diámetro 15,00 mm pero inferior al diámetro obtenido con el cloranfenicol 18,67 mm que se utilizó como control positivo.

ANOVA *Escherichia coli*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fc	Ft	Sig	Conclusión
Entre cc	4,19	3	1,40	3,73		0,061	No hay dif.
Dentro cc	2,99	8	0,37				
TOTAL	7,18	11					



Análisis de la tabla N°4: ANOVA (Análisis de varianza) muestra un nivel de significación de 0,061 ($p > 0,05$) por lo que se concluye que no hay diferencia significativa en los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición para *Escherichia coli*.

Luego con la Prueba por pares de promedios de Tukey se ratifica la no existencia de diferencias significativas entre los promedios de los diámetros a estas diferentes concentraciones, inclusive ni con el diámetro del control positivo que es el cloranfenicol.

Tabla N° 5: Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico)

Bacterias Patógenas	Extracto	CMI									
		Concentración decreciente de extractos mg/mL.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Concentración mg/mL.	250 (25%)	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	CN
<i>Escherichia coli</i>	Etanólico	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fuente : La autora

C.N. : Control del microorganismo en caldo

(+) : Crecimiento microbiano

(-) : Sin crecimiento microbiano

Análisis de la tabla N°5 : Se puede apreciar que el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* presentó CMI a una concentración de 31.25 mg/mL. (Tubo N°4), se puede observar que no hay crecimiento bacteriano.

Tabla N° 6: Concentración mínima bactericida del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum L. (Matico)* frente a *Escherichia coli*.

Bacteria patógena	Extracto	CMB									
		Concentración decreciente de extractos mg/mL.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Concentración mg/mL.	250 (25%)	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	CN
<i>Escherichia coli</i>	etanólico	-	-		-	+	+	+	+	+	+

Fuente : La autora

Donde :

C.N. : Control del microorganismo en caldo

(+) : Crecimiento microbiano

(-) : Sin crecimiento microbiano

Análisis de la tabla N°6 : Se puede apreciar que el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* presentó CMB a la concentración de 31.25 mg/mL. se puede observar que no hay crecimiento bacteriano.

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.-

Se investigaron las actividades antibacterianas de los extractos acuoso y etanólico de *Piper aduncum* L.(Matico), se determinaron sus componentes químicos principales : taninos, compuestos fenólicos libres, flavonoides, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas y saponinas; coincidiendo con los investigadores: Arroyo J, Bonilla P, Tomas G, Huamán J. Docentes de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quienes realizaron la investigación titulada: “Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* “Matico”. Los resultados obtenidos determinaron que el análisis fitoquímico determinó presencia de: saponinas, taninos, quinonas, flavonoides y alcaloides.

Según Domingo D. López-Brea, en su investigación titulada Plantas con acción antimicrobiana, menciona que los compuestos fitoquímicos con actividad antibacteriana son : taninos, compuestos fenólicos libres, quinonas, flavonoides, alcaloides y triterpenos y/o esteroides.

Santos Maximilian Leite et al. Investigador de la Universidad Federal de Santa María (Brasil) realizaron el trabajo titulado: “Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*.”

Concluyeron que el extracto hecho por maceración con el etanol tiene mayor contenido de sesquiterpenos y actividad antifúngica.

En la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico frente a cepas patógenas, se observó que el extracto acuoso de *Piper aduncum* L., a una concentración de 25%(250 mg/mL) frente a *Staphylococcus aureus*, mostró halos de inhibición de 11.5 mm. (Resistente) con

respecto al control positivo de Cloranfenicol que mostró un halo de inhibición de 16mm.

Los halos inhibición frente a las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y no fueron de tamaño significativo.

El extracto etanólico frente a *Escherichia coli* a una concentración de 25%(250 mg/mL), mostró un halo de inhibición de 16.1mm. (Intermedio). El control positivo de Cloranfenicol que mostró un halo de inhibición de 18 mm; mientras que el extracto etanólico frente a *Bacillus subtilis*, a la misma concentración presentó un halo de inhibición de 11.1mm.(Resistente).

Los extractos acuoso y etanólico a una concentración de 25% enfrentados a *Pseudomona aeruginosa*, no presentaron halos de inhibición.

El Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR), para el extracto acuoso frente a *Staphylococcus aureus*, a una concentración de 250 mg/mL. fue de 71.87%, mientras que el PIR para el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* fue de 89.44%, y el PIR , para el extracto etanólico frente a *Bacillus subtilis*, fue de 58.42%.

Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL, para el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL. La Concentración Mínima Bactericida (CMB), a una concentración de 250 mg/mL frente a *Escherichia coli* fue de 31.5 mg/mL.

Según los resultados podemos afirmar que los extractos de las hojas de *Piper aduncum* L., frente a bacterias patógenas, presentaron resistencia frente a bacterias gram positivas, y actividad intermedia frente a las bacterias gram negativas, pese a que estas presentan una envoltura externa que protege a la pared bacteriana (que es más angosta) mientras que en las Gram

positivas no se presenta dicha envoltura estando más expuesta la pared bacteriana (más ancha o gruesa) donde posiblemente actuaría el extracto evaluado, desestabilizando la pared bacteriana.

4.3. CONCLUSIONES:

1. La actividad antibacteriana del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L., a una concentración de 25%(250 mg/mL.) frente a *Staphylococcus aureus*, mostró halo de inhibición de 11.5 mm (Resistente) y el extracto etanólico al 25% frente a *Escherichia coli*, presentó un halo de inhibición de 16.1mm (Intermedio), la bacteria *Bacillus subtilis* obtuvo un halo de inhibición de 11.1mm (Resistente). En cuanto a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, no presento halos de inhibición en ninguno de los dos extractos (Resistente).
2. El porcentaje de inhibición relativa (PIR) para el extracto acuoso frente a *Staphylococcus aureus*, fue de 71.87 %, mientras que el PIR para el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* fue de 89.44%, y el PIR, para el extracto etanólico frente a *Bacillus subtilis*, fue de 58.42%.
3. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL. para el extracto etanólico de las hojas del *Piper aduncum* L. frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) a una concentración 250 mg/mL para el extracto etanólico frente a *Escherichia coli* fue de 31.25 mg/mL.
4. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuoso y etanólico de *Piper aduncum* L.(Matico) fueron: taninos, compuestos fenólicos libres, , flavonoides, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, quinonas y saponinas.

4.4. RECOMENDACIONES:

1. Continuar las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Piper aduncum* L. (Matico), frente a hongos y virus; a fin de comprobar otras propiedades terapéuticas que le atribuye la medicina tradicional.
2. Utilizar otras partes de la planta como los frutos, semillas y ramas jóvenes para determinar el real efecto farmacológico, pues se menciona que se utilizaba a nivel de los países andinos éstas partes como uso tradicional para infecciones del tracto urinario.
3. Elaborar una base de datos electrónica en la Universidad Alas Peruanas, de las plantas medicinales investigadas científicamente para contar con información actualizada.
4. Realizar trabajos de investigación similares, principalmente en el campo etnobotánico con otras plantas de nuestra región, en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en general.

4.5 FUENTES DE INFORMACIÓN :

1. García Luján C. Actividad antibacteriana de los extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple.[Tesis doctoral]. México : 2008.
2. Pérez A, Rojas J, Rodríguez J, Doncel A, et al. Evaluación de métodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de Sucre sobre bacterias y levaduras patógenas. Rev. Colombiana cienc. Anim.[en línea] 2011[fecha de acceso el 19 de marzo 2014] ; 3(1). Disponible en:

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3691389>
3. *Piper aduncum* Wikipedia La enciclopedia libre [citado 27 de junio del 2014]. Disponible en :

https://es.wikipedia.org/wiki/Piper_aduncum.
4. OMS. Resistencia a los antimicrobianos. libre [12 de mayo del 2015] Disponible en :

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> (último acceso el 12 de mayo del 2015).
5. Palacios J. Plantas Medicinales Nativas del Perú. Concytec - Lima-Perú: 2006.
6. Alonso J. *Piper aduncum* L. Universidad Politécnica Salesiana. Quito-Ecuador : 2011.
7. Miranda M. Farmacognosia y Productos naturales, La Habana (Cuba): 2001.
8. Villar del Fresno A. Farmacognosia general. Editorial Síntesis S.A.; Madrid-España : 2010.

9. Rodríguez A. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). . [En línea] 2014 [fecha de acceso 15 de diciembre del 2014]. Disponible en :
<http://www.dspce.esPOCH.dedu.ec/bitstream/123456789/212/1/56T00184.pdf>.
10. Alvares, V. et. al. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica.pp. 28, 70-78, 111. España : 1990.
11. Kuklinsky C. Farmacognosia Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega Barcelona – España: 2000.
12. Murray P. et al. Microbiología médica [en línea] . 5ª ed. : Elsevier España:2007. [actualizado 25 Agost 2009; citado 15 ene 2015]. Disponible en:
<http://www.farmafir.onored.com/bks/Microbiologia%20Medica%20MURRAY%205%AA%20edicion%202005.pdf>.(último acceso 25 de agosto del 2014).
13. Geosalud. Medicina natural. actualizado 25 Agost 2009; citado 15 ene 2015] Disponible en :
<http://www.geosalud.com/medicinanatural/Medicina%20Natural.htm>
(último acceso el 19 de mayo del 2015).
14. Abreú O, Rodríguez A, Morgado M, Cao L. Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoeitimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). Revista Cubana De Plantas Medicinales [en línea]. 2012 [fecha de acceso 26 de junio del 2014]; (2): 181. Disponible en :
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000200007.

15. Skinner N. Microbiología e inmunología médicas. International Microbiology [Internet]. (2007, Marzo), [fecha de acceso del 1 de Mayo del 2014]; 10(1): 74-75. Disponible en medio ambiente completa :
<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/view/4c457c9c23b2f.002>.
16. De Lima A, Salem J, de Souza J, Cortez A, Carvalho C, da Veiga Junior V, et al. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Brasil, 2011. Electronic Journal Of Biotechnology [en línea]. 2011 [fecha de acceso el 27 de Abril del 2014]; 14(4): 8. Disponible en: Scopus®.
<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n4-11/1336>.
17. Maximillan Leite et al. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *Braz. J. Microbiol.* [en línea]. 2013 [fecha de acceso 28 de junio del 2015]. Disponible en :
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000400035>.
18. Lina E, Dadang, Manuwoto S, Syahbirin G, Prijono D. Synergistic action of mixed extracts of *Brucea javanica* (Simaroubaceae), *Piper aduncum* (Piperaceae), and *Tephrosia vogelii* (Leguminosae) against cabbage head caterpillar, *Crociodomia pavonana*. Indonesia. Journal Of Biopesticides [en línea]. 2013 [fecha de acceso el 27 de Abril del 2014]; 6(1): 77-83. Disponible en Academic Search Complete.
<http://proyectos.concytec.gob.pe/access/ebshost.htm?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx>.

19. Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa T.M., Demedio J. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial *Piper aduncum* subespecie *ossanum* frente a *Varroa destructor*. Cuba, 2011 Revista Cubana de Protección Veg. vol 26 N°1 (2011): 52-61. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S101027522011000100008&script=sci_arttext.
20. Ruiz S, Anjos M, Carrara V, deLima J, Cortez D, Abreu Filho B, et al. Evaluation of the Antibacterial Activity of Piperaceae Extracts and Nisinon *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Journal Of Food Science [en línea]. 2013 [fecha de acceso el 30 de Abril del 2014]; 78(11): M1772-M1777. Disponible en :
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138211>.
21. Silva G, Teles H, De Oliveira C, Castro-Gamboa I, Silva D, Berlinck R, et al. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). Phytochemistry Letters [en línea] 2010 [fecha de acceso el 22 de Abril del 2014]; 3(3): 164-167. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390010000546>.
22. Silva W, de Souza Martins J, de Souza H, Heinzen H, Cesio M, de Barros N, et al. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattletick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology [en línea]. 2009 [fecha de acceso el 29 de Abril del 2014]; 164(2-4): 267-274. Disponible en :
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19573994>.

23. Arroyo J, Bonilla P, Tomas G, Huamán J. Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* “Matico”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Rev. Per. Quim Ing.[en línea] 2011[fecha de acceso el 1 de Mayo del 2014]. Vol 14 N°1 &2, Pags. 62-67. Disponible en : <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4599>.
24. Arroyo J, Almora Y, Quino M, Ruez E, Martínez J, Buendía J. Lima-Perú, 2012. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*. Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de “San Marcos”. Lima-Perú. Rev. An. Fac. med [en línea] 2012[fecha de acceso 12 de Mayo del 2013] 73(2): 85-91. Disponible en : http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/NMSM_ce4704c30c79654b55da2d60de9b13a3.
25. Arroyo J.; Hañari R.; Baca D.; Domínguez L.; Buendía J. Lima-Perú. “Efecto Antihipertensivo del Extracto de *Piper aduncum* “matico” sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones”. Facultad de Medicina Humana de Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Rev. An. Fac. med [en línea] 2012 [fecha de acceso el 26 de Mayo del 2014; 73(2) 85-91. Disponible en : <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/rt/metadata/1024/0>.
26. Zaa C, Valdivia M, Marcelo A. Efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico del *Piper aduncum* “matico” en un modelo in vitro de neurodegeneración. Rev. Perú. biol.[en línea] 2012 [fecha de acceso el 30 de Marzo del 2015]; 19(3) : 235-240. Disponible en : <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/997>.

27. Arroyo, J. ; Bonilla P.; Moreno L.; Ronceros G., Tomas G, Huán J., et al, Lima- Perú. Efecto gastroprotector y antisecretor de un fitofármaco de hojas de matico (*Piper aduncum*).Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública [en línea]. 2013 [fecha de acceso el 28 April del 2014]; 30(4): 608-615. Disponible en : http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342013000400011&script=sci_arttext.
28. Arroyo J, Herrera O, Chávez R, Ventura E, BuendiaJ, et al."Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) y su toxicidad oral en ratones".Rev. An. Fac. med [en línea] 2012[fecha de acceso el 30 de abril del 2014] ;73(2) 85-91.Disponible en:

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/6938>.
29. Matute M. Evaluación In Vitro del Extracto de *Piper angustifolium* (Matico) y la Clorhexidina como Antisépticos Bucales. [tesis] Perú: 2009.
30. Méndez C. "Efectividad del Gel de Matico (*Piper angustifolium*) en la evolución de la cicatrización de heridas de la Mucosa bucal post exodoncia del tercer molar inferior incluido en el Hospital Nacional Carlos Alberto Seguin. [tesis] Perú : 2010.
31. Texeira Duarte M. Actividad Antimicrobiana de Plantas medicinales y Aromáticas usadas en Brasil. Rev. Multiciencia [en línea] 2006[fecha de acceso Enero del 2015] ;7(1) 2-4. Disponible en : https://www.multiciencia.unicamp.br/art05_7_e.htm.

32. Llop A, Váldez-Dapena Ma. Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médicas.[internet] 2001[fecha de acceso 11 febrero del 2014] ;73. Disponible en :
<https://es.scribd.com/doc/200926441/MicrobiologiayParasitologiaMedicasTomol>.
33. Araujo J, Salas R. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Rev. Científica.[en línea]2010[fecha de acceso enero 2014]; 8-11. Disponible en :
<http://www.slideshare.net/ucsurcultural/cientifica6>
34. Domingo D. López-Brea. Plantas con acción antimicrobiana. Rev. Esp Quimioterap [en línea] 2003[fecha de acceso el 23 Enero 2014];16(4): 385-393 .Disponible en :
<http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
35. Horna G, Díaz S, Taboada V, Ortiz T. Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida de Ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.Rev.Med Hered.[en línea] 2005[fecha de acceso el 12 de Octubre 2014]; 16(1) : 39-45. Disponible en :
<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/article/view/862/828>.
36. Kidshealth.org. Infecciones por estafilococcus.[citado el 15 de marzo del 2015]. Disponible en :
http://kidshealth.org/teen/en_espanol/infecciones/staph_esp.html
37. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica de plantas medicinales. Editorial Acribia 2da. Edición- Lima-Perú, 2000
38. Ávila L. Introducción a la Metodología a la Investigación. [en línea] 2014[fecha de acceso el 26 de junio del 2015]. Disponible en :
<http://www.eumed.net/libros-gratis/2006c/203/#indice>.

39. Osorio J. Aspectos básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquía.[en línea] 2009[fecha de acceso 13 de mayo del 2014]. Disponible en :
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>.

40. Oleaga B, Morcillo G, Cortez E, García J. Enfermedades producidas por los microorganismos en la alimentación y como detectarlos en la Biotecnología. [En línea] 2015 [Fecha de acceso 10 de junio del 2015]. Disponible en :
<http://www.uned.es/expertobiotecnologiaalimentos/TrabajosSelecc/BegonaOleaga.pdf>.

41. 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 (Polimoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas”.Rev. Arnaldoa [en línea] 2014 [fecha de acceso 24 de marzo 2015] ; 21(1): 81-90. Disponible en :
<http://www.upao.edu.pe/Museo/pdf/05%20Metabolitos%20secundarios%20y%20efecto.pdf>.

ANEXOS

ANEXO Nº1

MATRIZ DE CONSISTENCIA

UNIVERSIDAD PARTICULAR “ALAS PERUANAS” FILIAL – ICA – ESCUELA DE POST GRADO
MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO DEL PROYECTO: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Piper aduncum* L.
(MATICO) FRENTE A BACTERIAS PATOGENAS, EN LA CIUDAD DE ICA-2013-2014”

INVESTIGADOR : Mg. Jessica Yolanda Huarcaya Rojas.
FECHA : ICA, Mayo del 2013

PROBLEMA (1)	OBJETIVOS (2)	HIPÓTESIS (3)	VARIABLES (4)	INDICADORES (5)	ÍNDICE (6)	TÉCNICAS (7)	INSTRUMENTOS (8)
<p>Problema General ¿Tendrán actividad antibacteriana los extractos acuoso y etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico) frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014?</p>	<p>Objetivo general Determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico) frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.</p>	<p>Hipótesis general Los extractos acuoso y etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico) presentarían actividad antibacteriana significativa frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014.</p>	<p>Variable Independiente “X”: Extracto acuoso y etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación botánica. • Obtención de: Extractos. • Screening fitoquímico 	<p>Características e hojas, tallos, inflorescencia. g/mL extracto Coloración y/o precipitación</p>	<p>Recolección de especie en campo. Extracción acuosa y etanólica. Reacción shinoda Reacción Alcaloides Reacción Lieberman-buchard</p>	<p>Clasificación taxonómica y botánica. Concentración a sequedad coloración Precipitación Coloración</p>
<p>Problemas específicos • ¿Cuál de los extractos presentará una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas? • ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos en estudio? • ¿Qué porcentaje de inhibición relativa presentarán las concentraciones significativas. son los metabolitos secundarios presentes en los extractos?.</p>	<p>Objetivos específicos. • Determinar que extracto presentaría una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas en la ciudad de Ica, 2013-2014. • Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la mínima bactericida (CMB). • Determinación del PIR. • Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos.</p>	<p>Hipótesis específicas - El extracto acuoso o etanólico presentaría una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas. - Presentarían CMI y CMB los extractos en estudio. - Presentarían PIR las concentraciones significativas. - Serían los metabolitos secundarios presentes en los extractos de <i>Piper aduncum</i> L. (Matico), los que y le confieren la actividad antibacteriana .</p>	<p>Variable Dependiente “Y”: Actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia o ausencia de crecimiento. • Presencia o ausencia de crecimiento. • Halos de extracto, halos del control. • Magnitud de reacción. 	<p>Tamaños de halos Magnitud de crecimiento Tamaños de halos Coloración y/o precipitación</p>	<p>Método difusión en agar. Mét. de dilución: CMIYCMB. Método .Difusión en agar Reacción shinoda Reacción alcaloides Reacción Liebermann-buchard</p>	<p>Formación de halos de inhibición(mm) Formación de turbidez y formación de colonias. Proporción porcentual Coloración Precipitación Coloración</p>

ANEXO N°2 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

**SCREENING FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE
LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO)**

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCIÓN	RESULTADO			
Taninos	Gelatina 1%	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
Compuestos fenólicos libres	FeCl ₃ 5%	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>
Flavonoides	Shinoda	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>
Alcaloides	Dragendorff	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
	Mayer	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
	Wagner	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
Saponinas	Prueba de espuma	PE	<input type="checkbox"/>	NPE	<input type="checkbox"/>

Fuente : La autora.

ANEXO N°3 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

**SCREENING FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO).**

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACCIÓN	RESULTADO			
Taninos	Gelatina 1%	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
Compuestos fenólicos libres	FeCl ₃ 5%	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>
Flavonoides	Shinoda	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>
Alcaloides	Dragendorff	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
	Mayer	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
	Wagner	PP	<input type="checkbox"/>	Turbidez	<input type="checkbox"/>
Saponinas	Prueba de espuma	PE	<input type="checkbox"/>	NPE	<input type="checkbox"/>
Triterpenosy/o esteroides	Liebermann-burchard	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>
Quinonas	Borträger	Color	<input type="checkbox"/>	NOC	<input type="checkbox"/>

Fuente : La autora.

ANEXO N°4 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO)

ESPECIE BACTERIANA : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Agua destilada			
ESPECIE BACTERIANA : <i>BACILLUS SUBTILIS</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Agua destilada			

Fuente : La autora.

ESPECIE BACTERIANA : <i>ESCHERICHIA COLI</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Agua destilada			
ESPECIE BACTERIANA : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Agua destilada			

Fuente : La autora.

ANEXO N°5 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO)

ESPECIE BACTERIANA : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Etanol de 96°			
ESPECIE BACTERIANA : <i>BACILLUS SUBTILIS</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Etanol de 96°			

Fuente : La autora.

ESPECIE BACTERIANA : <i>ESCHERICHIA COLI</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Etanol de 96°			
ESPECIE BACTERIANA : <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>			
Concentraciones del extracto :	100%	50%	25%
Placa 1 en (mm).			
Placa 2 en (mm).			
Placa 3 en (mm).			
Control (+) Cloranfenicol			
Control (-) Etanol de 96			

Fuente : La autora.

ANEXO N°6 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO).

Cepas patógenas	Extracto	Concentración mínima inhibitoria (CMI)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	mg/mL.	250 (25%)	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	CN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acuoso										
<i>Bacillus subtilis</i>	Etanólico										
<i>Escherichia coli</i>	Etanólico										

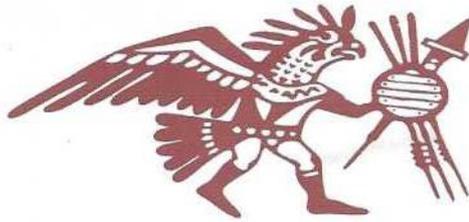
Fuente : La autora.

ANEXO N°7 : FICHA DE REGISTRO DE DATOS

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PIPER ADUNCUM* L. (MATICO).

Cepas patógenas	Extracto	Concentración mínima bactericida (CMB)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	mg/mL.	250 (25%)	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	CN
<i>Escherichia coli</i>	Etanólico										

Fuente : La autora.



UAP

UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del informe: Jorge Marcial Ordóñez Álvarez
- 1.2 Institución donde labora: U.N. "San Luis Gonzaga" de Ica
- 1.3 Nombre del Instrumento motivo de Evaluación: Ficha de registro de datos
- 1.4 Autor del instrumento: Mae. Jessica Yolanda Huerfano Rojas
- 1.5 Título de la Investigación: Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de PIPER ADUNCUM L. (Matico) frente a Bacterias patógenas, en la Ciudad de Ica, 2013-2014.

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE				BAJA				REGULAR				BUENA				MUY BUENA			
		0	6	11	16	61	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.															X					
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.															X					
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la investigación.																	X			
4. ORGANIZACIÓN	Existe un constructo lógico en los ítems.															X					
5. SUFICIENCIA	Valora las dimensiones en cantidad y calidad.																		X		
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para cumplir con los objetivos trazados.																		X		
7. CONSISTENCIA	Utiliza suficientes referentes bibliográficos																		X		
8. COHERENCIA	Entre hipótesis dimensiones e indicaciones.																	X			
9. METODOLOGÍA	Cumple con los lineamientos metodológicos.																	X			
10. PERTINENCIA	Es asertivo y funcional para la Ciencia.																		X		

III. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: De muy Buena.

IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 83.5 //

LUGAR Y FECHA: Ica, 02 de Noviembre del 2015.

JM Ordóñez
 Dr. Jorge M. Ordóñez Álvarez
 DOCTOR EN EDUCACIÓN

DNI. 21422759 Teléfono. 93374032



UAP

UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del informe: Javier Hernán Chávez Espinoza.....
 1.2 Institución donde labora: U.N. "San Luis Gonzaga" de Ica.....
 1.3 Nombre del Instrumento motivo de Evaluación: Ficha de registro de datos.....
 1.4 Autor del instrumento: Mg. Jessica Yolande Huaracaya Rojas.....
 1.5 Título de la Investigación: Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de PIPER ADUNCUM L (Natico) frente a Bacterias Patógenas, en la ciudad de Ica, 2013-2014.....

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE				BAJA				REGULAR				BUENA				MUY BUENA			
		0	6	11	16	61	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.																		X		
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.																		X		
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la investigación.																X				
4. ORGANIZACIÓN	Existe un constructo lógico en los ítems.																X				
5. SUFICIENCIA	Valora las dimensiones en cantidad y calidad.																		X		
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para cumplir con los objetivos trazados.																		X		
7. CONSISTENCIA	Utiliza suficientes referentes bibliográficos																		X		
8. COHERENCIA	Entre hipótesis dimensiones e indicaciones.																		X		
9. METODOLOGÍA	Cumple con los lineamientos metodológicos.																			X	
10. PERTINENCIA	Es asertivo y funcional para la Ciencia.																				X

III. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: M.u.y. buena.....

IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 86.....//

LUGAR Y FECHA: Ica, 30 de Octubre del 2015.....//


 Javier Hernán Chávez Espinoza

DOCTOR - SALUD PÚBLICA
 DNI. 21465353. Teléfono. 996391519



UAP

UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DE INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y nombres del informe: Reynaldo Walter Ramos Mayuri
- 1.2 Institución donde labora: U.N. "San Luis Gonzaga" de Ica
- 1.3 Nombre del Instrumento motivo de Evaluación: Ficha de registro
- 1.4 Autor del instrumento: Mag. Servia Yolanda Huarcaya Rojas
- 1.5 Título de la Investigación: Actividad antibacteriana de un extracto acuoso y etanólico de las hojas de PIPER ADUNCUM (Malaco) en la ciudad de Ica, 2013 - 2014

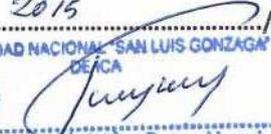
II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE				BAJA				REGULAR				BUENA				MUY BUENA			
		0	6	11	16	61	26	31	36	41	46	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.																X				
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.																		X		
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la investigación.																		X		
4. ORGANIZACIÓN	Existe un constructo lógico en los ítems.																		X		
5. SUFICIENCIA	Valora las dimensiones en cantidad y calidad.																	X			
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para cumplir con los objetivos trazados.																		X		
7. CONSISTENCIA	Utiliza suficientes referentes bibliográficos																			X	
8. COHERENCIA	Entre hipótesis dimensiones e indicaciones.																	X			
9. METODOLOGIA	Cumple con los lineamientos metodológicos.																			X	
10. PERTINENCIA	Es asertivo y funcional para la Ciencia.																			X	

III. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: De muy buena

IV. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 85.5

LUGAR Y FECHA: Ica, 05 de Noviembre del 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

 Reynaldo Walter Ramos Mayuri
 DR. EN EDUCACIÓN

DNI: 21454227 Teléfono: 956 607432

DECLARACIÓN JURADA

Yo, JESSICA YOLANDA HUDECAYA ROJAS Estudiante de
la Sección de de la Universidad ALAS PERUANAS, con
código N° 2012 2199 89 identificado (a) con DNI N° 21462686
con la tesis titulada:

"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANOLICO
DE LAS HOJAS DE PIPER ADUNCUM L. (Matico) FRENTE A
BACTERIAS PATOGENAS, EN LA CIUDAD DE ICA 2013-2014"

Declaro bajo juramento que:

- 1) La tesis es de mi autoría.
- 2) He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
- 3) Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

Dé identificarse la falta de fraude (datos falsos), de plagio (información sin citar a autores), de piratería (uso ilegal de información ajena) o de falsificación (representar falsamente las ideas de otros), asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad ALAS PERUANAS.

Lima, 09 de Febrero del 2016

Firma: Jessica Huancaya Rojas

DNI: 21462686



UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

Vicerrectorado de Investigación y Postgrado

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ASESORAMIENTO DE LA TESIS

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO Y/O GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR

Yo, YSABEL RAMOS LALUPÚ, docente del Vicerrectorado de Investigación y Postgrado de la UAP, identificado con DNI N° 07686388, Carnet de Extranjería o Pasaporte N°, me comprometo a asesorar la Tesis de:

Maestro Doctor del graduando Jessica Yolanda Huarcaya Rojas, cuyo título de Tesis es: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Piper Aduncum* L. (MATICO) FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS, EN LA CIUDAD DE ICA 2013 – 2014".

Actuaré como:

Asesor Metodológico

Asesor Científico

..... de del 20....


Dra. Ysabel Ramos Lalupú
Asesora

INFORME DE ASESORÍA DE TESIS

A : Dr. Roberto Antonio Rosas Lujan
Coordinador de la Escuela de Postgrado Filial Ica
Universidad Alas Peruanas

DE : Dra. Ysabel Ramos Lalupú
Asesor Metodológico

FECHA : 10 de Febrero del 2016

Es grato dirigirme a usted a fin de informar, quien suscribe fue designado como asesor metodológico y científico de Tesis Pura titulada "**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Piper Aduncum* L. (MATICO) FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS, EN LA CIUDAD DE ICA 2014 – 2015**" de la señora Mag. JESSICA YOLANDA HUARCAYA ROJAS, para optar el grado Académico de Maestro en Docencia Universitaria y Gestión Educativa en la Escuela de Postgrado.

Que habiendo concluido mi labor de Asesoría, debo expresar que la señora Mag. JESSICA YOLANDA HUARCAYA ROJAS, ha cumplido en forma satisfactoria con los requisitos que se requieren para la presentación del mencionado documento, en lo que corresponde al procedimiento metodológico que a continuación se detalla:

- **DE LOS ASPECTOS PRELIMINARES Y DE FORMA:** Se ha respetado el esquema de tesis establecido por la Escuela de Postgrado.
- **DEL CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO:** El problema de investigación, los problemas específicos, el tipo de investigación, diseño, nivel, enfoque, responden a un estudio experimental, planteado en la investigación.
- **DEL CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO:** Los antecedentes, las bases teóricas y la definición de términos básicos responden a las variables del estudio de investigación.
- **DEL CAPÍTULO III: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:** Se analizaron los resultados a través de pruebas estadísticas ANOVA y TUKEY.
- **LAS CONCLUSIONES** de la investigación guardan relación con las hipótesis planteadas.



- **LAS RECOMENDACIONES** de la investigación guardan relación con los objetivos planteados.
- **LAS REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ELECTRÓNICAS** de la investigación se presentaron de acuerdo a las normas Vancouver.

Por lo que se **APRUEBA** metodológicamente la presente tesis.

Por las consideraciones expuestas, estimo que la tesis elaborada por de la señora Mag. JESSICA YOLANDA HUARCAYA ROJAS, se encuentra expedita para su oportuna sustentación.

Atentamente,

Dra. Ysabel Ramos Lalupu
Asesor Metodológico de Tesis

ANEXO N°14: OBTENCIÓN DE LA MUESTRA



Figura N°4 : Casa Naturista Lucho de la Ciudad de Ica

ANEXO N°15: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL



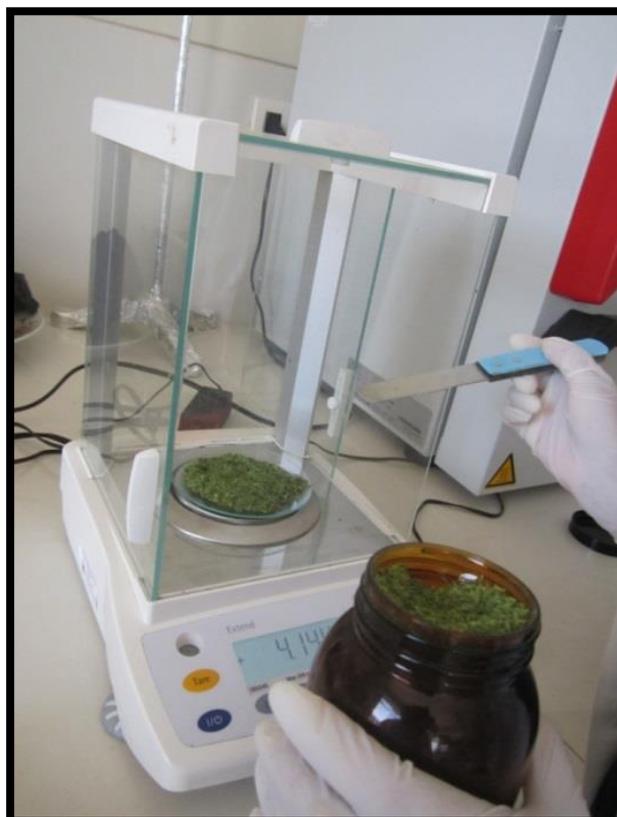
Secado Natural de las hojas de *Piper aduncum* L.



Secado Artificial de las hojas de *Piper aduncum* L.



Molienda de las hojas de *Piper aduncum* L.



Pesado de las hojas de *Piper aduncum* L.

ANEXO N°16: PREPARACIÓN DE EXTRACTOS



Extracto Etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L.



Maceración de las hojas de *Piper aduncum* L.



Extracto Acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L.



Filtración del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* L.

ANEXO N°17: SCREENING FITOQUÍMICO



Reactivos y Materiales.



Identificación.



Identificación de Metabolitos Secundarios.



ANEXO N°18: ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES



Esterilización de Placas Petri y otros.



Medios de Cultivo.



Concentraciones del extracto etanólico.

ANEXO N°19: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



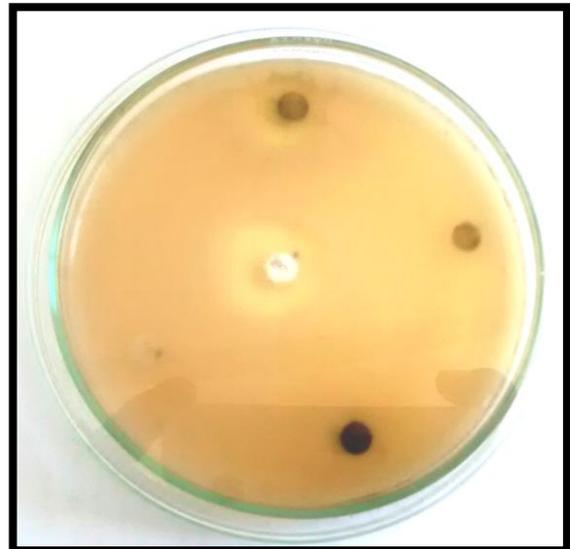
Plaqueando el Agar Müeller – Hinton.



Preparación de las Placas para la Siembra.

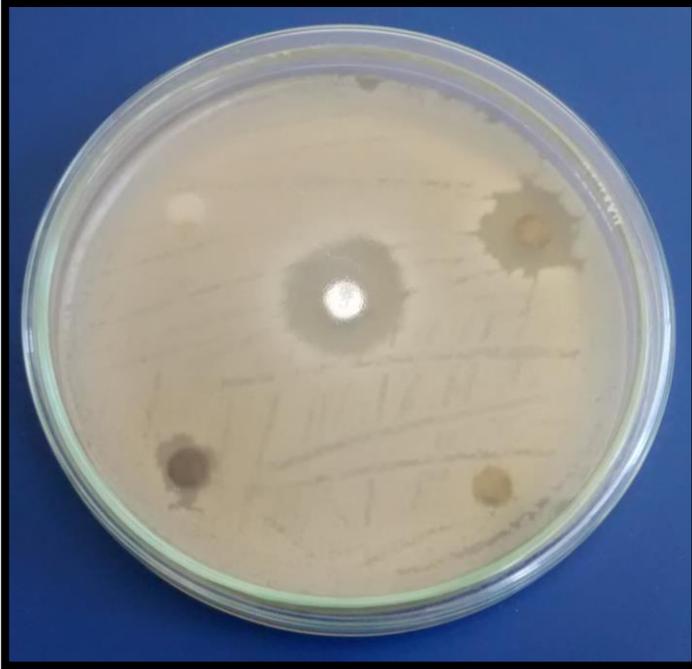


Método de difusión en disco:
Staphylococcus aureus.



Método de difusión en disco:
Bacillus subtilis.

ANEXO N°20: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



Método de difusión en disco:
Escherichia coli.

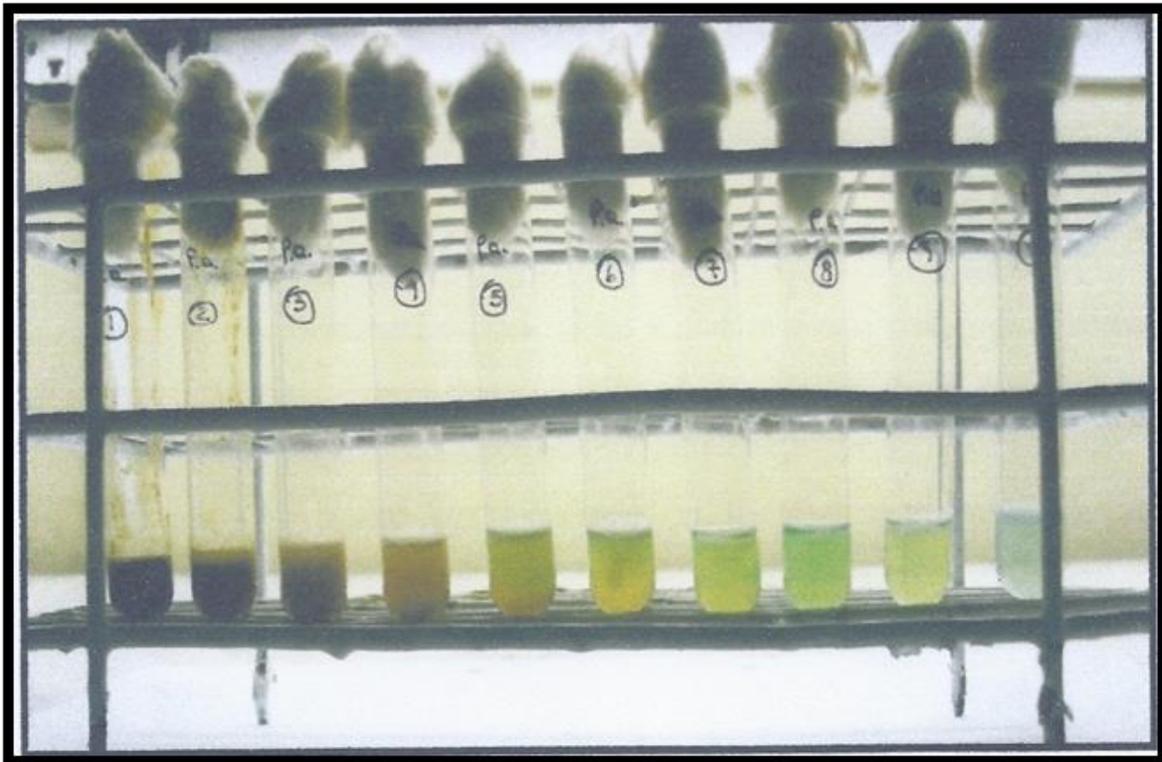


Lectura de halos de inhibición.

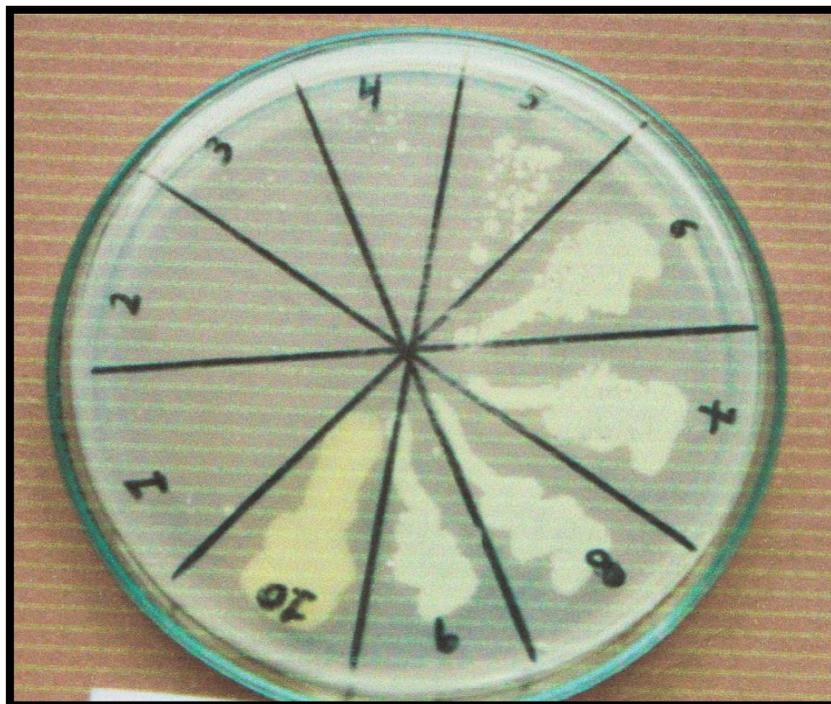


Método de difusión en disco:
Pseudomonas aeruginosa.

ANEXO N°21: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA



CMI del extracto etanólico frente a *Escherichia coli*.



CMB del extracto etanólico frente a *Escherichia coli*.

ANEXO N°22 : CONSTANCIA DE CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"

CONSTANCIA N° 301-USM-2013

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Planta completa), recibida de **Jessica Yolanda HUARCAYA ROJAS**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Alas Peruanas U.A.P. Sede Ica, ha sido estudiada y clasificada como: ***Piper aduncum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: PIPERALES

FAMILIA: PIPERACEAE

GENERO: Piper

ESPECIE: *Piper aduncum* L.

Nombre vulgar: "Matico".

Determinado por: Mg. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 03 de diciembre de 2013



Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)