



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA DE *Ruta*

graveolens "ruda" SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTOR

ROQUE LEZAMA, ESKARLLET ESTHER

ASESORES

DRA. LLAQUE SÁNCHEZ, MARÍA ROCÍO DEL PILAR

MG. BLGO. POLO GAMBOA, JAIME

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios, por la inspiración
y fortaleza, así como la dicha de
vivir en alegría y paz

Tu señor Dios que desde tu reino
nos cuidas y proteges, ilumíname
por un buen camino; Porque en
los días de oscuridad me diste luz
y fuerza para continuar,
brindándome salud para lograr y
seguir adelante mis objetivos.

A mi madre Beatriz Lezama Pérez
por apoyarme en todo lo está en su
alcance, por saber escucharme y
aconsejarme en todo el trayecto
de mi formación.

AGRADECIMIENTO

A MI MADRE, quien sin escatimar esfuerzo
Alguno, han sacrificado gran parte de su vida
Para formarme y educarme.

A MIS ASESORES; por brindarme la gran oportunidad de
Realizar y acompañarme en este trabajo y regalarme
un espacio de su valioso tiempo.

A la Universidad por su colaboración en la
ejecución de este trabajo

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **ROQUE LEZAMA ESKARLLET** con DNI N° **76377097** a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica que todos los datos e información que

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA DE *Ruta graveolens* "ruda" SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Trujillo, Febrero del 2019

ROQUE LEZAMA ESKARLLET

DNI: 76377097

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

Página del Jurado	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Declaratoria de autenticidad	iv
Presentación	v
Índice	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática	01
1.2. Trabajos previos	01
1.3. Teorías relacionadas al tema	03
1.4. Formulación del problema	06
1.5. Justificación del estudio	06
1.6. Hipótesis	06
1.7. Objetivos	07

II. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Diseño de investigación	08
2.2. Variables, operacionalización	08
2.3. Población y muestra	09
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	10
2.5. Métodos de análisis de datos	11
2.6. Aspectos éticos	11

III. RESULTADOS	12
IV. DISCUSIÓN	16
V. CONCLUSIONES	18
VI. RECOMENDACIONES	19
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	20
VIII. ANEXOS	25

RESUMEN

Se evaluó la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" a diferentes concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El estudio fue de tipo experimental. Se evaluó la actividad antibacteriana del aceite de ruda a 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%), repitiéndose 10 veces. Las concentraciones al 25% y 50% no presentaron efecto inhibitorio (halos de inhibición de 8 y 9.4mm respectivamente), al 75% el halo de inhibición aumentó a 14.8 mm (DS 0.9 ± 0.3 , IC 95% (14,1- 15.5mm) entre los intervalos de 13.0 a 16.0 mm, no superaron los valores de CLSI (≥ 15 mm) Sin embargo, al 100% se obtuvo mayor halo inhibitorio con 18,6 mm (DS $1,4 \pm 0.5$, IC 95% (17.6 – 19.6mm)) entre los intervalos de 16.0 a 21.0mm, superando los valores del CLSI, considerándose que *S. aureus* es sensible al aceite esencial de ruda. La oxacilina tuvo como halo de inhibición 31.4mm Se concluye que el aceite esencial de *Ruta graveolens* "ruda" si es eficaz como antibacteriano y que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible al aceite esencial de ruda al 100%.

Palabras claves: Antibacteriana, aceite esencial, *Ruta graveolens*, ruda, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The in-vitro antibacterial efficacy of essential oil of *Ruta graveolens* "rue" leaf was evaluated at different concentrations on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The study was experimental. The antibacterial activity of rue oil was evaluated at 4 concentrations (100%, 75%, 50% and 25%) and repeated 10 times. Concentrations at 25% and 50% had no inhibitory effect (zones of inhibition of 8 and 9.4mm respectively), at 75% the zone of inhibition increased to 14.8 mm (SD 0.9±0.3, 95% CI (14.1- 15.5mm) between the intervals of 13.0 to 16.0 mm, did not exceed the values of CLSI (≥15mm). However, at 100%, a greater zone of inhibition was obtained of 18.6 mm (SD (1.4±0.5, 95% CI (17.6 - 19.6mm)) between the intervals of 16.0 to 21.0mm, surpassing the CLSI values, considering that *S. aureus* is sensitive to essential oil of rue. It is concluded that *Ruta graveolens* "rue" essential oil is effective as an antibacterial and that *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is sensitive to "rue" essential oil at 100%.

Keywords: Antibacterial, essential oil, *Ruta graveolens*, rue, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son un problema de salud pública de variable magnitud en diferentes áreas geográficas del mundo, lo que representa una importante carga para los sistemas de salud y en la última década, la prevalencia de este organismo ha aumentado considerablemente en la población general. ¹

Staphylococcus aureus son microorganismos gran positivos y son de los patógenos más importantes que afectan al ser humano. Producen un amplio espectro de infecciones, desde leves que involucran la piel, hasta graves, como bacteriemia y sepsis que pueden llevar a la muerte²

La especie *Ruta graveolens* “Ruda”, posee innumerables estudios farmacotológicos a nivel internacional, pero aún las bases de datos y sistemas informativos están poco documentados al respecto. Con las nuevas investigaciones que existen sobre esta planta, se crean grandes posibilidades de obtener fitofármacos con acción antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antimicrobiana, entre otras, con menor potencial de efectos adversos³.

La resistencia antimicrobiana genera mayor morbimortalidad, así como una elevación en los costos de salud. Los países en vías de desarrollo en general muestran niveles de resistencia mayores que en países industrializados y a su vez cuentan con menos recursos para el desarrollo de estrategias para su contención. Ante ello, la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobiana procedentes de fuentes naturales, incluyendo las plantas, se ha vuelto cada vez más importante, ya que el uso de plantas medicinales en muchos países, ha sido parte de la cultura popular como un tratamiento de diferentes problemas relacionados con la salud. ⁴

Diversos ensayos han demostrado que los extractos y aceites obtenidos de plantas tienen propiedades antibacterianas, anti fúngicas, antivirales, insecticidas, entre otros⁵.

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Reddy and Al-Rajab (India, 2016) estudiaron la composición química y la actividad antibacteriana de *Ruta graveolens* sobre patógenos Gram positivos y negativos comparado con gentamicina, mediante el método de difusión en discos de agar. Los resultados encontrados fueron para *Bacillus cereus* un halo de 26.60 mm +/- 0.03, para *E. fecalis* un halo de 27.10 mm +/-0.02, *Staphylococcus aureus* un halo de 23.40 mm +/- 0.06, *E. coli* un halo de 17.70 mm +/-0.02, *K. pneumonie* un halo de 18.10 mm +/- 0.04. Concluyeron que el aceite esencial de ruda tiene mejore efecto antibacteriano sobre patógenos Gram positivos debido a la abundancia natural de cetonas y alcoholes en los aceites esenciales.⁶

Pushpa H. et al (India, 2015). Este estudio investigo las composiciones químicas y la actividad antibacteriana del aceite volátil de las hojas frescas de *Ruta graveoleace*, de São Luís, Maranhão, Brasil. El aceite esencial se aisló usando hidrodestilación en un aparato del tipo de Clevenger, y se caracterizó por GC-FID y GC-MS. Se identificaron siete compuestos que representan el 100% del aceite. Los compuestos principales fueron 2-nonanona (39,17%) y 2-undecanona (47,21%). La actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con zonas de inhibición de 8,30-25,60 mm a valores MIC de 0,75-1,40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, la bacteria más susceptible fue *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Se concluye del presente estudio que además de su uso tradicional, *Ruta graveolens*. Entonces podría ser utilizado como fuente natural de compuestos antibacterianos y posibles aplicaciones en la industria farmacéutica.⁷

França O. et al (Brazil, 2015) identificaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*) sobre múltiples patógenos, mediante el método de difusión en discos de agar comparado con gentamicina. Los resultados encontrados fueron expresados en halos de inhibición (mm), para *E. coli* un halo de 7 mm, para *S. aureus* un halo de 12 mm, para *S. typhi* un halo de 12 mm, *K. pneumonie* un halo de 6 mm. Este estudio contribuye al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para la creciente resistencia a múltiples fármacos.⁸

Rojas J. et al (Venezuela, 2011) determinaron la composición química y el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Ruta graveolens* comparado con eritromicina sobre

patógenos estandarizados gram positivos y negativos, mediante el método de difusión en discos de agar. Los resultados encontrados para *S. aureus* ATCC 25923 fueron un halo de 8 mm, para *E. coli* ATCC 25992 un halo de 8 mm, y para *K. pneumonie* ATCC 23357 un halo de 7 mm. El estudio concluyó que el aceite esencial de *Ruta graveolens* tiene bajo efecto antibacteriano, motivando a hacer nuevas investigaciones en diferentes patógenos.⁹

Naveda G. (India,2010), Demostró que el extracto etanolico de *Ruta graveolens* (Ruda), presentó concentración mínima inhibitoria (CMI) de 22,85 mg/ml. *Staphylococcus aureus* fue la cepa más sensible, seguida por *Pseudomona aeruginosa*.¹¹

Bayoud B. et al (India, 2007), encontraron que el extracto etanólico de la hoja de *Ruta graveolens* a una concentración de 10mg/ml, presentó actividad antimicrobiana contra *Pseudomona aeruginosa* con un resultado de un halo de 9mm. Así mismo demostró la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de Ruda (*Ruta graveolens*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Perejil (*Petroselinum sativums*), contra cepas hospitalarias con resistencia múltiple a *Staphylococcus aureus*, los extracto se maceraron en alcohol de 70 grados, las pruebas de susceptibilidad lo realizaron de acuerdo con las recomendaciones de la NCCLS, también detectaron la presencia de omega 3 y 6, donde concluyen que los responsables de la actividad bactericida son timol, carvacrol y eugenol.¹⁰

K. Meepagala K. et.al (2005). Evaluaron que los aceites ensayados de *Ruta graveolens* presentaron un amplio rango de actividad tanto para bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) como Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumonie*). Analizaron los datos obtenidos en este ensayo y pudieron observar que la muestra Inhibió un total de cuatro bacterias, exhibiendo una CIM de 100 µg/ml para *S. aureus*(7mm) y 200 µg/mL para *E. faecalis*(8mm), *E. coli*(9mm) y *K pneumonie* (7 mm); mientras que la ME mostró actividad contra *S. aureus* (8mm), *E. coli* (9 mm) y *K. pneumonie* (8 mm) a una CIM de 200 µg/ml para cada bacteria¹²

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Los estafilococos son bacterias esféricas grampositivas que suelen estar distribuidas en

grupos irregulares a manera de racimo de uvas. Crecen con sencillez en distintos medios siendo metabólicamente activos, pero fermentan los carbohidratos produciendo pigmentos cuyo color puede ser blanco e incluso volverse amarillo intenso. Determinadas cepas constituyen parte de la flora saprofita de la piel y de las mucosas del hombre; mientras que otras producen alteraciones como formación de abscesos entre otras infecciones piógenas que incluyen septicemia mortal. El mecanismo de acción de los estafilococos patógenos es a través de la hemólisis, coagulación del plasma y producción de diversas enzimas y toxinas extracelulares, siendo un tipo común de envenenamiento alimentario el provocado por la enterotoxina estafilocócica termoestable. Además, estos gérmenes desarrollan resistencia a muchos agentes antimicrobianos con rapidez, planteando problemas terapéuticos difíciles.¹³

Al menos 20 especies pueden hallarse en el género *Staphylococcus*; siendo *Staphylococcus aureus* un microorganismo positivo a la coagulasa y patógeno de gran importancia para el ser humano, causante de muchas infecciones graves. En su composición incluye proteínas antigénicas y polisacáridos, así como otras sustancias de la estructura de la pared celular, como el peptidoglucano, el cual es un polímero polisacárido que contiene subunidades enlazadas capaz de ser destruido por ácidos fuertes y la exposición a la lisozima. Esto es de relevancia en la patogenia de las infecciones debido a que desencadena la fabricación de interleucina -1 y anticuerpos opsonicos en los monocitos; teniendo actividad de tipo endotoxínico al actuar como agente quimioatrayente de los leucocitos polimorfonucleares, lo cual activa el complemento.¹⁴

Este agente puede producir enfermedad por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos, así como por su producción de muchas sustancias extracelulares, de las cuales la mayoría son enzimas y otras se consideran toxinas, encontrándose bajo el control genético de los plásmidos; pudiendo producir catalasa que convierte al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, y producen coagulasa, que coagula el plasma oxalatado o citratado. Otras enzimas producidas incluyen la hialuronidasa, estafilocinasa que conlleva a la fibrinólisis, proteinasas, lipasas y beta lactamasas; así como también toxinas exfoliativas, toxina de síndrome de choque séptico y enterotoxinas.¹⁵

S. aureus provoca enfermedad través de invasión directa y destrucción del tejido como también por la producción de toxinas, debiéndose las manifestaciones clínicas casi exclusivamente a la actividad de estas últimas, como por ejemplo en el síndrome de piel escaldada por estafilococos, intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico. Además, otras manifestaciones clínicas se producen a consecuencia de la multiplicación de los microorganismos, dando lugar a la formación de abscesos y destrucción tisular observada en infecciones cutáneas, neumonía, empiema, endocarditis, osteomielitis y artritis séptica.¹⁴

La familia Rutaceae, también llamada Rutaceae, pertenece al orden de Sapindales con aproximadamente 150 géneros y más de 1600 especies. Están enormemente distribuidos en las regiones tropicales y templadas del globo, siendo más abundantes en América tropical, Sudáfrica y Australia.¹⁵

La Ruda es una planta resistente, perenne y arbustiva que mide desde 50 hasta 100 cm. de altura. Esta provista de una raíz leñosa, fasciculada y de tallos cilíndricos, erguidos, que engrosan año tras año, de estructura leñosa en la base y con ramas superiores herbáceas.¹⁶

Las hojas son alternas, de color verde azulado, bi o tri pinnadas, los segmentos laterales son alargados y el terminal ovalado. Están provistas de glándulas que despiden un olor fuerte, en ocasiones desagradable, pero característico de la especie.¹⁷⁻¹⁸ Las flores son de color amarillo o amarillo verdoso, miden de 8 a 10 mm de diámetro y están agrupados en ramilletes terminales. La flor central tiene 5 pétalos y 5 sépalos, mientras que las restantes tienen 4 pétalos y 4 sépalos. Los pétalos son cóncavos y dentados.¹⁷⁻¹⁸

Esta familia es conocida por presentar una gran variedad de metabolitos secundarios altamente aromáticos debido a la presencia de aceites esenciales, lo que ha atraído la atención de varios grupos de investigación sobre su importancia química y biológica de muchos de estos metabolitos.^{14, 15, 18, 19} Entre los representantes de esta familia de productores de aceites esenciales, destacan *Ruta graveolens* L., popularmente conocida como “rue”, “rue-smelly”, “rutade-smell strong”, “rue y rue-home-of-gardens”¹⁷ ampliamente utilizado como recurso medicinal por la población local en toda América del Sur.^{19, 20}

La Ruda pertenece a la Familia de las Rutáceas que comprende 161 géneros y más de 1600 especies cosmopolitas que van desde pequeñas “matas” hasta arbustos y árboles. El género *Ruta* incluye siete especies de arbustos aromáticos. 17, 4 Esta familia agrupa gran cantidad de plantas útiles en medicina, puesto que son ricas en aceites esenciales, alcaloides, glucósidos¹⁷ En medicina popular, hay varias propiedades terapéuticas descritas de *R. graveolens* L., que incluyen el uso de esta planta en trastornos menstruales, inflamaciones de la piel, calambres, dolor de oídos y dolor de cabeza. ^{21, 22}

Los ensayos farmacológicos tienen sus propiedades antihelmíntica, abortiva, antiparasitaria, cicatrizante, antiinflamatoria, antidiarreica, antirreumática, antifebril, antiulcerosa, repelente de vermicida, antidiabética, antirreumática y antimicrobiana.^{20,22,23} En los últimos años, ha habido un interés creciente en investigaciones que buscan posibles usos de productos vegetales como antimicrobianos en lugar de varios antibacterianos sintéticos que pueden causar varios efectos secundarios. Históricamente, los productos naturales y sus derivados han sido una fuente invaluable de agentes terapéuticos. Cuando in vitro, los ensayos antimicrobianos han servido eficazmente como métodos confiables para detectar varias clases de metabolitos secundarios con alta actividad antimicrobiana. ^{24, 25, 26}

Los antimicrobianos de fuentes vegetales pueden ejercer su actividad a través de diferentes mecanismos de los que actualmente se usan como drogas sintéticas. Por lo tanto, pueden ayudar significativamente en el tratamiento de cepas microbianas resistentes.²⁷

1.4 . FORMULACION DE PROBLEMA

¿Es eficaz como antibacteriano el aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con oxacilina a 1 µg, en un estudio in vitro?

1.5 . JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son frecuentes y conllevan riesgos

potencialmente peligrosos para la vida humana. Su alta prevalencia como colonizadora en personas comunes y quienes están en contacto con hospitales, es cada vez mayor, esto puede significar un aumento en la formulación de nuevos fármacos y por ende de los costos, pues su resistencia también está en aumento. Por lo que es necesario continuar con la búsqueda de diferentes formas de prevención y tratamiento de los cuadros clínicos, para lo cual proponemos este estudio experimental que analizará la eficacia antibacteriana de una planta muy comercializada en nuestro país, con el fin de brindar información a posteriores trabajos y así tener una alternativa en cuanto al tratamiento de las enfermedades que pueda causar este agente bacteriano.

1.6 HIPÓTESIS

- **H₁:** El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” es eficaz como antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparando con Oxacilina a 1µg, en un estudio in vitro.
- **H₀:** El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” no es eficaz como antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparando con Oxacilina a 1µg, en un estudio in vitro.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” a diferentes concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con oxacilina a 1µg, en un estudio in vitro.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” al 100%.
- Establecer la eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” al 75%.

- Establecer la eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 50%.
- Establecer la eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 25%.
- Establecer la eficacia antibacteriana de la oxaciclina a la concentración de 1 µg.

II. METODOLOGIA

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACION: experimental con repeticiones múltiples pos prueba

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Dónde:

RG: Grupos de estudio

X1: Aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 100%

X2: Aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 75%

X3: Aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 50%

X4: Aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 25%

X5: Control positivo: Oxaciclina 1 µg.

X6: Control negativo: DMSO

O: Observaciones del diámetro del halo de inhibición.

2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano

No farmacológico: Aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda"

Farmacológico: Oxaciclina a concentración de 1 mcg.

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto inhibitorio

- **Si efecto inhibitorio:** halo de inhibición $\geq 15\text{mm}$.
- **No efecto inhibitorio:** halo de inhibición $<15\text{mm}$.

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Agente antibacteriano no farmacológico: <i>Ruta graveolens</i> "ruda" Agente antibacteriano farmacológico: Oxacilina.	La <i>Ruta graveolens</i> "ruda" será dividida en las siguientes diluciones: a) 100% b) 75% c) 50% d) 25% e) Oxacilina 1 μg f) Agua destilada	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto inhibitorio	Se medirá mediante el incremento del halo de inhibición por medio del método Kirby Bauer.	Se considera: Sensible: $\geq 15\text{ mm}$ Resistente: $<15\text{mm}$	Eficaz ($\geq 15\text{ mm}$) No eficaz ($<15\text{ mm}$)	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACION: Estuvo constituida por todas las cepas de *Staphylococcus aureus* cultivadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

MUESTRA:

Tamaño muestra: se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre

halos de inhibición, para hallar el número de placas necesarias que validen la investigación por lo que se obtuvo un total de 10 repeticiones por cada dilución; se realizaron 60 observaciones.

Unidad de análisis: El halo de inhibición con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Muestreo: tipo Censal

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas petri con cultivos viables.
- Cepas cultivadas de 18 -24 horas.

Criterios de exclusión:

- Cepas que no crecieron en el medio de cultivo.
- Cepas o muestra contaminada.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA:

Consistió en la observación directa del crecimiento de las colonias de las bacterias de las bacterias cultivadas en las placas Petri y la medición de lo halos de inhibición.

El procedimiento:

- a) La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbarium de la Universidad Antenor Orrego.
- b) Se obtuvo el extracto del aceite esencial de la *Ruta graveolens* "ruda" (Anexo 03)
- c) Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar para el cultivo de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI a través del estándar M02-A12.³²⁻³³⁻³⁵.
- d) Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M02-A12³² y M100³⁵ del CLSI, mediante el método de Kirby Bauer.

INSTRUMENTO:

El instrumento que se utilizó será la ficha de recolección de datos que se adjunta número

de placas, las diluciones, los halos de inhibición (anexo 04)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado por tres profesionales, un médico y dos biólogos quienes analizaron que los ítems considerados en la dicha ficha de recolección de datos fueron relevantes en el estudio

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información obtenida fue tabulada en una ficha Excel, y luego se analizó en el programa SPSS versión 25. Para los gráficos se utilizó el diagrama de cajas o bigotes. Se aplicó las pruebas estadísticas para homogenizar la muestra y luego análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros y análisis postanova Tukey o Duncan permitiendo identificar la dilución con la que se obtuvo el mayor tamaño de halo de inhibición.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS:

En el estudio se tomó en cuenta las medidas de bioseguridad en el laboratorio dadas por la OMS³² Así mismo se consideró la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

III. RESULTADOS

TABLA 1: Eficacia antibacteriana in Vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" a diferentes concentraciones y Oxacilina a 1µg sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

CONCENTRACION	95% de intervalo de confianza para la media		Error estándar	Desv. estándar	Mediana	Mínimo	Máximo
	Límite inferior	Límite superior					
25%	7.5	8.5	0.2	0.7	8.0	7.0	9.0
50%	8.7	10.1	0.3	1.0	9.0	8.0	11.0
75%	14.1	15.5	0.3	0.9	15.0	13.0	16.0
100%	17.6	19.6	0.5	1.4	19.0	16.0	21.0
Oxacilina	30.6	32.2	0.4	1.2	32.0	29.0	33.0

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

TABLA 2: Eficacia antibacteriana in Vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” a diferentes concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con oxacilina a 1µg.

p: 0.01

FUENTE DE VARIACIÓN	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3519.5	4.0	879.9	779.4	.000
Dentro de grupos	50.8	45.0	1.1		
Total	3570.3	49.0			

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

TABLA 3: Eficacia antibacteriana in Vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” a diferentes concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comprado con oxacilina a 1µg

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
25%	10	8.0				
50%	10		9.4			
75%	10			14.8		
100%	10				18.6	
Oxacilina	10					31.4
Sig.		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

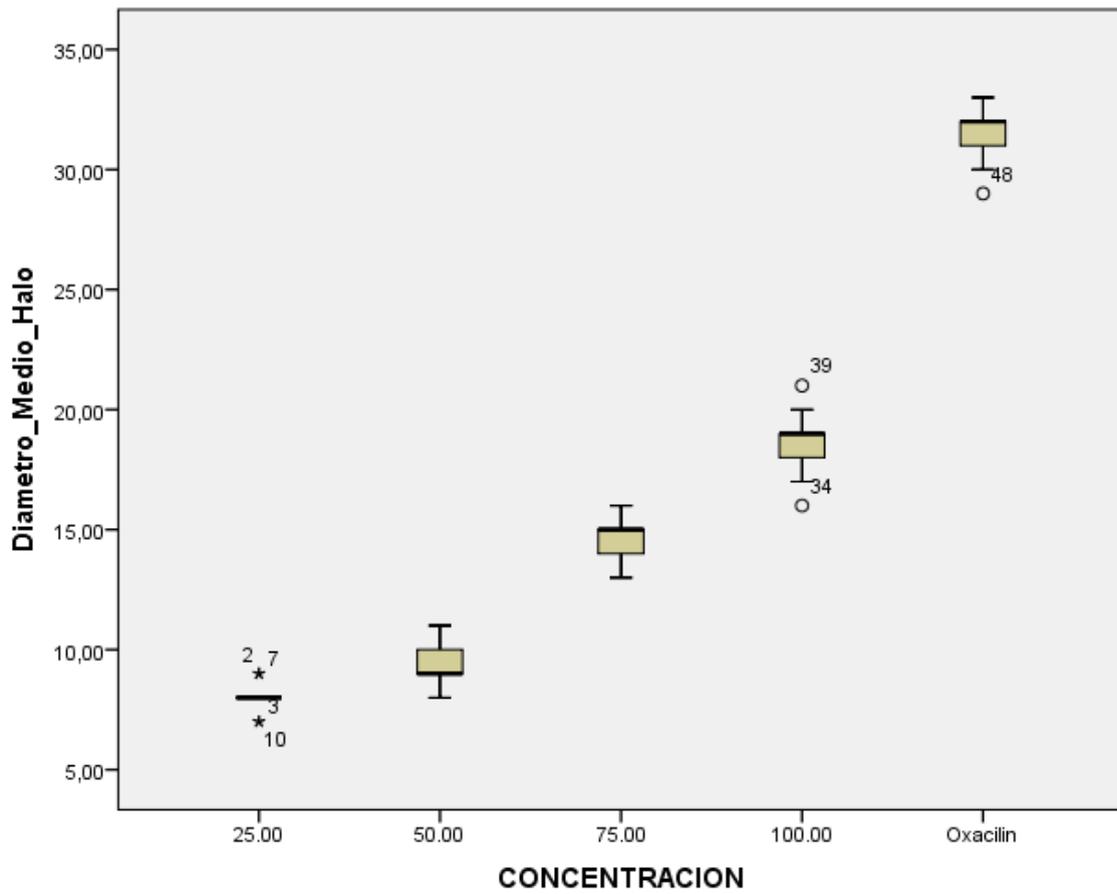


Gráfico 1: Eficacia antibacteriana in Vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” a diferentes concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comprado con oxacilina a 1µg

IV. DISCUSIÓN

En el estudio se evaluó la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con oxacilina a 1ug observándose 10 placas por grupo con un total de 60 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representaban el extracto del aceite esencial de *Ruta graveolens* "ruda" a distintas concentraciones (100%, 75%, 50% ,25%) en el patrón de oxacilina de 1 ug y agua destilada.

En la tabla 1 se observa que las diluciones al 25% Y 50% no presentan efecto inhibitorio debido a que sus valores promedio son muy pequeños con un halo de 8 y 9.4 mm, de forma consecutiva del experimento en la dilución al 75% se encuentra un halo de inhibición de 14.8 mm (DS 0.9 ± 0.3 , IC 95% (14,1- 15.5) entre los intervalos de 13.0 a 16.0 mm, sin embargo, no supera los valores de CLSI (≥ 15 mm) para considerar que tiene efecto inhibitorio. Para la evidencia del efecto antibacteriano se utilizó Oxacilina 1 ug siendo un antibacteriano de primera línea , además es el más usado para diferentes pruebas de sensibilidad microbiana , trabajando con *Staphylococcus aureus* con las siguientes concentraciones ya mencionadas . Pero también se logra evidenciar que el valor máximo de halo inhibitorio llegó a 16mm siendo en este caso eficaz como antibacteriano, se podría decir que si se aumenta la concentración del producto a otras presentaciones (oleosa u acuosa) podría tener eficacia. A sí mismo en la dilución al 100% se obtiene un halo inhibitorio de 18,6 mm (DS $1,4 \pm 0.5$, IC 95% (17.6 – 19.6) entre los intervalos de 16.0 a 21.0mm, superando los valores del CLSI(≥ 15 mm) considerándose que si posee efecto inhibitorio antibacteriano, y al compararse con otros autores como Pushpa H. et al ⁷ donde coincide en su estudio que se identificó 7 compuestos que da una presentación total del aceite siendo 2 las principales 2-nonanona (39,17%) y 2-undecanona (47,21%) por lo que tiene más efecto inhibitorio siendo sensible a estos agentes *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* , siendo objeto en este estudio.

En la tabla 2 se consideró que las dimensiones de los halos de inhibición son normales, se comparó las cuatro concentraciones del efecto inhibitorio del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" a diferentes concentraciones y Oxacilina a 1µg sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fue altamente significativa entre los grupos (ANOVA refleja la evaluación estadística de los resultados) se obtuvo un valor de $p < 0.01$,

por lo que fue necesario realizar la prueba Post ANOVA como es el test de Tukey ya que las varianzas fueron homogéneas permitiendo comprobar el efecto de las concentraciones sobre los promedios de los diámetros del halo de inhibición. Demostrandose , mediante el método de arrastre de vapor de agua, que el extracto del aceite esencial de las hojas de Ruda (***Ruta graveolens***) presento efecto antibacteriano , al inhibir el crecimiento *In Vitro* contra la cepa *Staphylococcus aureus* y este resultados coinciden con los registros de França O. et al⁸ dio a conocer el efecto inhibitor del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens*) sobre múltiples patógenos. Así mismo dicho por Bayoud B. et al¹⁰ y K. Meepagala K. et al¹²

En la tabla 3 indica que el halo de inhibición por cada concentración lo separa en 5 subconjunto de acuerdo al efecto que produjeron las diferentes concentraciones del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* “ruda” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comparado con la oxacilina a 1µg donde tienen diferencias significativas por tener $p < 0,05$. Así mismo en la Grafico 01 se puede visualizar estas diferencias, donde se observa que el aceite esencial de *Ruta graveolens* “ruda” si muestra acción antibacteriana. Y en el caso como Naveda G.¹¹ demostró que extracto etanolico de *Ruta graveolens* (Ruda), la cepa más sensible fue *Staphylococcus aureus*. Así mismo demostró la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de Ruda (*Ruta graveolens*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Perejil (*Petroselinum sativums*), contra cepas hospitalarias con resistencia múltiple a *Staphylococcus aureus*.

En si la Ruda tiene como propiedades medicinales y composición fitoquímica destacando y enfatizando el acetite esencial compuestos por esterres (acetatos de 2- nonilo y 2 endudo) metilnonil, metilheptiel, cetonas, monoferponas, metilnonilcetona en una proporción del 90% , alcohol (2-undecanol) cumarines y furanocumarinas (0,15 – 0,70 %) , destacando bergapteno.

Ahora en cuanto efecto antibacteriano de la Ruda está dado por propiedades medicinales como fenoles, alcaloides, flavonides, metabolitos causante de la actividad antibacteriano contra gram positivos y gram negativos, además señala que también pueden inhibir psicótopos, coliforme fecales.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" demostró ser eficaz como antibacteriano a concentración de 100%, superando lo estipulado por el CLSI (>15mm), sin embargo, es menor a oxacilina a 1µg.
2. El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 100% tuvo 18.6 mm de halo de inhibición considerado como sensible.
3. El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 75% tuvo 14.8 mm de halo de inhibición no fue eficaz como antibacteriano; considerado como resistente.
4. El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 50% tuvo 9.4 mm de halo de inhibición no siendo eficaz como antibacteriano
5. El aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" al 25% tuvo 8mm de halo de inhibición no siendo eficaz como antibacteriano; considerándose como resistente.
6. La oxacilina a 1µg es eficaz como antibacteriano 31.4 mm de halo de inhibición considerado como sensible.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la eficacia de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda" frente a otras bacterias.
2. Ampliar el estudio para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del aceite esencial de la hoja de *Ruta graveolens* "ruda"
3. Evaluar el efecto del aceite esencial en estudio y con otros solventes con otras pruebas como disco difusión, micro dilución ,
4. Realizar más proyectos de investigación que busquen el descubrir nuevas especies naturales con efecto antibacteriano, antiviral o anti fúngico.
5. Continuar el presente trabajo para determinar cuál de los efectos secundarios es el que otorga la actividad antibacteriana.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Ves Losada Juan Eduardo, Graziano Ana Paula, De Abreu Maximiliano, Blanco Miriam, Frutos Lorena, Tula Lucas et al. Infecciones graves por *Staphylococcus aureus*: características clínicas, sensibilidad antibiótica y uso de antimicrobianos. Serie de casos. Arch. argent. pediatr. 2014; 112(4): e152-e155. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752014000400015
2. Córdova R, Cavero P, Huaranga J, Pachas C. Portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus* en trabajadores del Hospital Regional de Ica, Perú 2011. Rev., Med. Panacea 2011; 1(3):59-66. Disponible en: <http://revpanacea.unica.edu.pe/index.php/RMP/article/view/44>
3. Avellaneda J, et al. Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el Centro Médico Naval. [Tesis para optar el grado de químico farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; (15) pag 16 – 21. 2000. disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/avellaneda_m_j/indice.htm
4. García Apac Coralith. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta méd. Peruana. 2012 Abr; 29(2): 99-103. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172012000200010&lng=es.
5. Alzamora Libertad et al. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales Fac San Marcos, 2001; 62(2): 156 – 61. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/4167>
6. Reddy and Al-Rajab. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils Cogent Chem., 2016; 2 (1) p. 1220055 Disponible en: <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1220055>
7. H. Pushpa, N. Ramya Shree, Shibani P. Shetty and D.H. Ramesh, Screening of Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activity of *Ruta graveolens*. Advan. Biol. Res., 2015; 9 (4): 257-264, Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/fd1b/8986e0197fef63e6a90fd555af4f4b3117e8.pdf>
8. França Orlanda J.F, Nascimento A.R. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil South African Journal of Botany. 2015; 99, 103–106. Disponible: <https://ac.els->

- cdn.com/S0254629915002628/1-s2.0-S0254629915002628-main.pdf? tid=55573b84-Od8e-44ca-8397-4196aac8473a&acdnat=1527012411_of5ec0ab27364fefda088377bcd18279
9. Rojas J, Mender T, Rojas L, Gullien E, Buitrago A, Lucena M, Cardenas N. Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. *Avances en Química*, 2011; 6(3), 89-93. Disponible: <http://www.redalyc.org/pdf/933/93321324005.pdf>
 10. Bayoud B., Djilani S., Legseir B.: "Antibacterial activity of ethanol of *datura stramonium* and *Ruta graveolens*". *The Icfai Journal of Life Science* 1 (1), 2007. Disponible: <http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2009/vol1/138.Reddy.pdf>
 11. Naveda G.: "Establecimiento de un Proceso de Obtención de Extracto de Ruda (*Ruta graveolens*) con alto contenido Polifenolico" Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Ecuador. pag. 72. 2010. disponible en : <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2295/1/CD-3036.pdf>
 12. Brooks G, Butel J, Ornston L. et al. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 14va edición. Manual moderno. México, 1992; Pgs. 207-212. Disponible: http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smff.com.pdf
 13. Murray M, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología médica*. 6ta edición. Elsevier. España, 2009; Pgs. 209-222. Disponible: https://parabolasdocotidiano.files.wordpress.com/2011/10/microbiologia_murray.pdf
 14. Albarici T.R., Vieira P.C, Fernandes J.B., Silva M.F.G., Pirani J.R. Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova*, 2010; 33, 2130–2134. Disponible: http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/11536/art_PIRANI_Cumarinas_e_alcaloides_de_Rauia_resinosa_rutaceae_2010.pdf?sequence=1
 15. De La Cruz, M.G. *Plantas Mediciniais de Mato Grosso: a farmacopeia popular dos raizeiros*. Carlini & Caniato Editorial, Cuiabá, 2008. Disponible: <https://www.carliniecaniato.com.br/produto/plantas-mediciniais-de-mato-grosso-farmacopeia-popular-dos-raizeiros/>
 16. Endara, L., Soria, S., y Pozo, F.: "Medicina Tradicional Andina y Plantas Curativas, Herbolario de Plantas Curativas y Medicinales "Ministerio de salud pública.(20), pag 362 – 365. 2008. Disponible en : https://www.researchgate.net/profile/Rainer_Bussmann/publication/283355334_PLA

NTAS MEDICINALES DE LOS ANDES Y LA AMAZONIA -

[La Flora magica y medicinal del Norte del Peru/links/563a6f7808ae405111a5883f/PLANTAS-MEDICINALES-DE-LOS-ANDES-Y-LA-AMAZONIA-La-Flora-magica-y-medicinal-del-Norte-del-Peru.pdf](http://La_Flora_magica_y_medicinal_del_Norte_del_Peru/links/563a6f7808ae405111a5883f/PLANTAS-MEDICINALES-DE-LOS-ANDES-Y-LA-AMAZONIA-La-Flora-magica-y-medicinal-del-Norte-del-Peru.pdf)

17. Vasquez M. et al. "In Vitro ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT FROM LEAVES OF *Ruta graveolens* (Ruda), THROUGH THE FRONT MACRODILUTION METHOD *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*. [Tesis para optar el grado de químico farmacéutico]. IQUITOS - UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA; pag 12 – 14. 2015.
http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3643/Jessica_Tesis_Titulo_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y
18. Bizzo H.R., Hovell A.M.C., Rezende C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 2009; 32, 588–594. Disponible: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/vol32no3_588_04-qn09038.pdf
19. Costa J.F.O, Juiz P, Pedro A.S, David J.P, De David L, Giulietti J.M, França A.M, Santos F, Dos R.R, Soares M.B.P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010; 20, 502–505. Disponible: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n4/v20n4a07.pdf>
20. Elaissi A., Salah H.K., Mabrouk S., Larbi K.M., Chemli R., Harzallah-Skhiri F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. *Food Chemistry*. 2011; 129, 1427–1434. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461100803X>
21. Lorenzi H, Matos F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2002. Disponible: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v14s0/a07v14s0.pdf>
22. Al-Qurainy A, Khan S, Ali M.A, Al-Hemaid F.M, Tarroum M, ASHRAF M. Authentication of *Ruta graveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pakistan Journal of Botany*, 2011; 43, 1613–1620. Disponible: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(3\)/PJB43\(3\)1613.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(3)/PJB43(3)1613.pdf)
23. Souza E.L, Stamford T.L.M, Lima E.O, Trajano V.N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 2007; 18, 409–413. Disponible: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301112234>
24. Mejri J, Abderrabba M, Mejri M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial*

- Crops and Products. 2010; 32, 671–673. Disponible: http://www.academia.edu/19412325/Chemical_composition_of_the_essential_oil_of_Ruta_chalepensis_L_Influence_of_drying_hydro-distillation_duration_and_plant_parts
25. Ratheesh M, Shyni G.L, Sindhu G, Helen A. Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011; 63, 285–290. Disponible: <https://www.semanticscholar.org/paper/Inhibitory-effect-of-Ruta-graveolens-L.-on-damage%2C-Ratheesh-Shyni/93a81711f435c30ead55b766ae15667127bebd7>
26. Yamashita O.M, Fernandes Neto E., Campos O.R., Guimarães S.C. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2009; 11, 202–208. Disponible: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000200015
27. Ahmad N, Faisal M, Anis M, Aref I.M. In vitro callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*. 2010; 76, 597–600. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629910001328>
28. Silver L, Bostian K. Screening of natural products for antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1990; 9, 455–461. Disponible: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01964283>
29. Koehn F.E, Carter G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4, 206–220. Disponible: <https://www.nature.com/articles/nrd1657>
30. Freiesleben S, Jäger A. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms — a review. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2014. 3, 154. Disponible: <https://www.omicsonline.org/open-access/correlation-between-plant-secondary-metabolites-and-their-antifungal-mechanismsa-review-2167-0412.1000154.php?aid=24331>
31. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. , 2014; 124 (7), 2836–2840. Disponible: <https://www.jci.org/articles/view/68834>
32. Bernal M, Guzman M. EL ANTIBIOGRAMA DE DISCOS. NORMALIZACION DE LA TECNICA DE KIRBY-BAUER, *Biomédica* 1984; 4 (3-4). Disponible: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1891/1917>

33. Barrientos A, Cabrejos G, Casquero J, Collantes H, Córdova R, Obregón G. et al. Norma técnica de Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. Ministerio de salud. Perú, 2005. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/0/jer/-1/Manual%20de%20bioseguridad%20-%20INS.pdf>
34. Peredo H.A et al. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos, 2009 3 – 1 (24 – 32). Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
35. CLSI. Performance Standards for antimicrobial Disk susceptibility, approved standard – twelfth edition. CLSI document M02 - A12. Wayne PA: CLINICAL and laboratory standards institute; 2015. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>
36. OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra 2005. Tercera edición. Disponible: http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 S^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Siendo n= el número de repeticiones a efectuar en cada investigación

$$Z_{\alpha/2} = 2.58$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

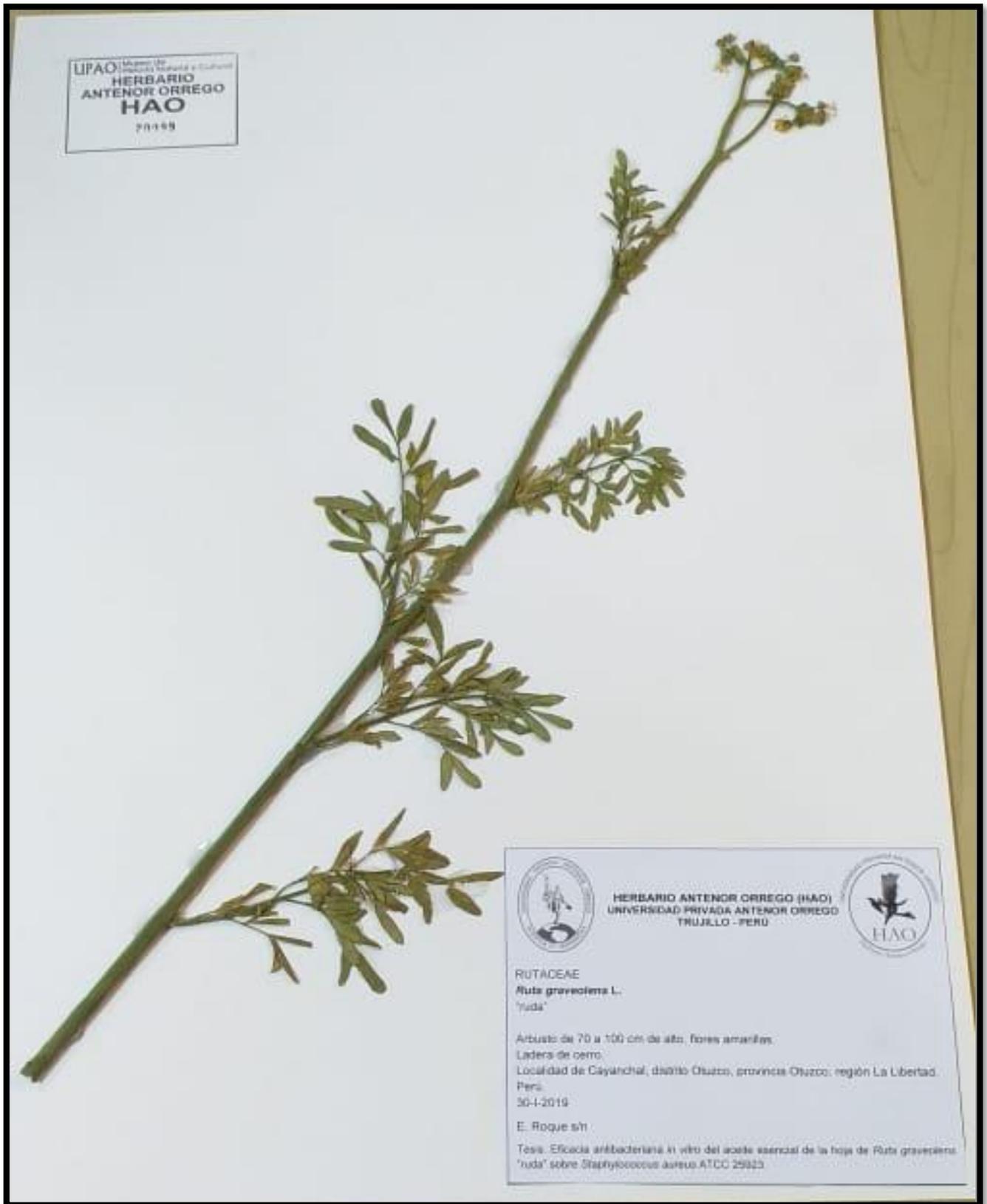
$$S = 0.06$$

$$X_1 \text{ OXACILINA} = 22$$

$$X_2 \text{ PLANTA} = 8$$

N:10 numero minimo de repeticiones por cada concentración

ANEXO 2

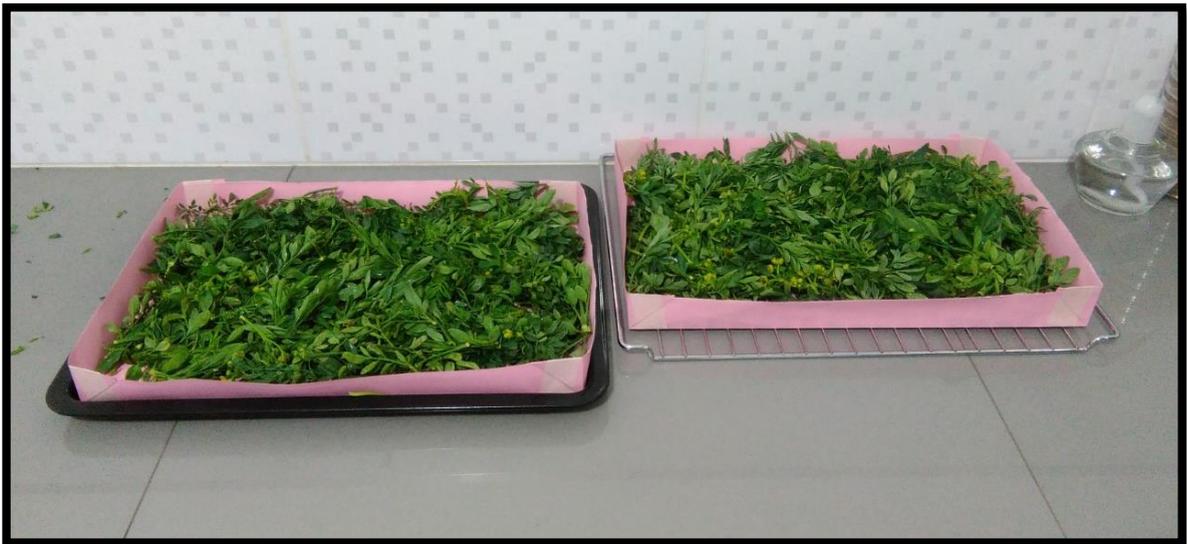


ANEXO 03

PROCEDIMIENTO

1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Ruta graveolens* "ruda" se obtuvo en el mercado La Hermelinda de Trujillo, en una cantidad de 6 Kg aproximadamente y se llevó al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionó las hojas con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la "muestra fresca" (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno a 30-35°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujo manualmente las hojas secas hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservaron almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le considero como "muestra seca" (MS).



2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Ruta graveolens* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llene las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estarán conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desemboca en un embudo decantador tipo pera. Así, el balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua paso a través del ducto hacia el balón con la MS y arrastro los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se



convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, y quedó el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual, se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización (no mayor a 8 días de preferencia).

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Muller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo

se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que se solidifique completamente.

4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Staphylococcus aureus*, cultivado hace 20 horas, de tal modo que se observe una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).



b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Staphylococcus aureus*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedo como una capa en toda la superficie.



c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se preparó 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocará 750 μ L de AE y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de AE y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%, y 250 μ L de AE y 750 μ L de DMSO al tubo de 25%.

d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μ L de



AE al 25% y se colocó en un disco, 10 μ L de AE al 50% en otro disco, 10 μ L de AE al 75% en otro disco y 10 μ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

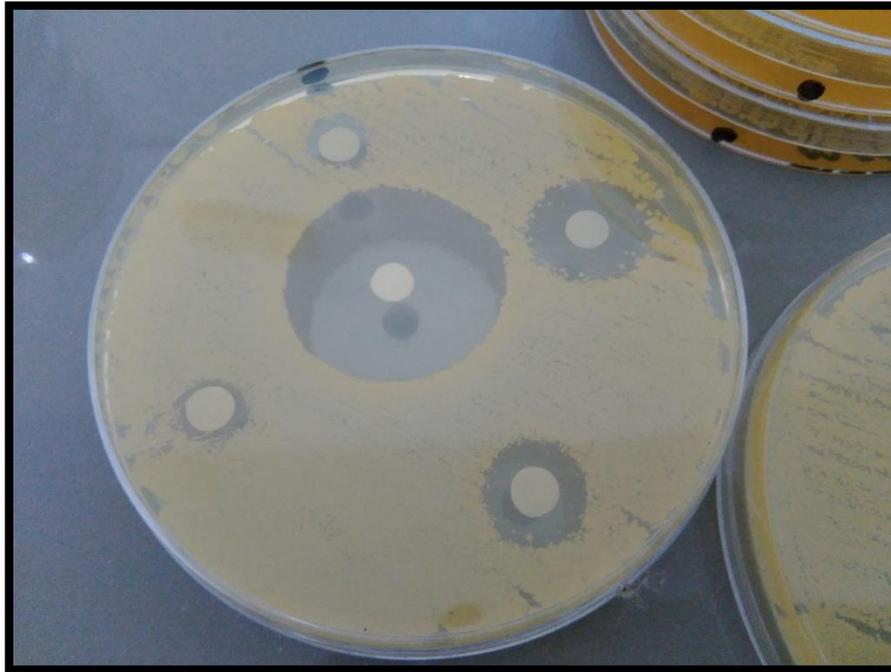
e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano.

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomó los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocó en la superficie del agar sembrado con el

microorganismo *Staphylococcus aureus*, de tal modo que quedo los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Oxacilina 1 μ g (control positivo). Se dejó en reposo por 15 min y después las placas se incubo de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Ruta graveolens* y para la Oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



ANEXO 4.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de ruda				Oxacilina	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

ANEXO 5

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL

A. Ambiente Seguro

Limpieza: Es el proceso mediante el cual se eliminan materias orgánicas y otros elementos extraños de los objetos en uso, mediante el lavado con agua, con o sin detergente, utilizando una acción mecánica o de arrastre.

La limpieza debe preceder a todos los procedimientos de desinfección y esterilización de todas las áreas.

La limpieza debió ser realizada con paños húmedos y el barrido con escoba húmeda a fin de evitar la resuspensión de los gérmenes que se encuentran en el suelo.

La limpieza se inició por las partes más altas, siguiendo la línea horizontal, descendiendo por planos.

Desinfección: Se realizó utilizando principalmente agentes químicos en estado líquido, como el alcohol a 70%, la pasteurización a 75°C y la irradiación ultravioleta.

Descontaminación: Se realizó un tratamiento químico aplicado a objetos que tuvieron contacto con sangre o fluido corporales, con el fin de inactivar microorganismos en piel u otros tejidos corporales.

Esterilización: Esterilización por vapor, esterilización por calor seco, esterilización por inmersión en productos químicos.

B. Protección Corporal

La utilización de mandiles o batas es una exigencia multifactorial en la atención a pacientes por parte de los integrantes del equipo de salud.

Recomendaciones:

- Usar bata, chaqueta o uniforme dentro del laboratorio.
- Esta ropa protectora fue quitada inmediatamente antes de abandonar el área de trabajo
- Fue transportada de manera segura al lugar adecuado para su descontaminación y lavado.

C. Protección Ocular y Tapaboca

La protección ocular y el uso de tapabocas tienen como objetivo proteger membranas mucosas de ojos, nariz y boca durante procedimientos y cuidados de pacientes con actividades que puedan generar aerosoles, y salpicaduras de sangre.

Anteojos o lentes de Seguridad:

- Deben permitir una correcta visión
- Deben tener protección lateral y frontal, ventilación indirecta, visor de policarbonato, sistema antirrayaduras y antiempañantes
- Deben permitir el uso simultáneo de anteojos correctores
- Deben ser de uso personal.
- Serán utilizados todo el tiempo que dure el procesamiento de las muestras y el fraccionamiento de las unidades de sangre. Cualquier excepción a esta regla, debe estar incluida en el programa de bioseguridad del servicio.

Tapaboca:

- Debe ser de material impermeable frente a aerosoles o salpicaduras
- Debe ser amplio cubriendo nariz y toda la mucosa bucal.
- Puede ser utilizado por el trabajador durante el tiempo en que se mantenga limpio y no deformado.
- Esto dependerá del tiempo de uso y cuidados que reciba.

D. Protección de los pies

- Esta protección está diseñada para prevenir heridas producidas por sustancias corrosivas, objetos pesados, descargas eléctricas, así como para evitar deslizamientos en suelos mojados. Si cayera al suelo una sustancia corrosiva o un objeto pesado, la parte más vulnerable del cuerpo serían los pies. No se debe llevar ninguno de los siguientes tipos de zapatos en el laboratorio:
 - ✓ Sandalias
 - ✓ Zuecos
 - ✓ Tacones altos
 - ✓ Zapatos que dejen el pie al descubierto
- Se debe elegir un zapato de piel resistente que cubra todo el pie. Este tipo de calzado proporcionará la mejor protección.

E. Protección de las manos

Se utilizó para evitar o disminuir tanto el riesgo de contaminación con los microorganismos de la piel del operador, como de la transmisión de gérmenes manipulados por el operador. Las manos son lavadas según técnica clínica y secadas antes de su colocación. De acuerdo al uso los guantes pueden ser estériles o no, y se deberá seleccionar uno u otro según necesidad.

Anexos 6
ANALISIS ESTADISTICOS

		Comparaciones múltiples				
		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
(I) CONCENTRACION					Límite inferior	Límite superior
25,00	50,00	-1,40000*	.47516	.039	-2.7501	-.0499
	75,00	-6,80000*	.47516	.000	-8.1501	-5.4499
	100,00	-10,60000*	.47516	.000	-11.9501	-9.2499
	200,00	-23,40000*	.47516	.000	-24.7501	-22.0499
50,00	25,00	1,40000*	.47516	.039	.0499	2.7501
	75,00	-5,40000*	.47516	.000	-6.7501	-4.0499
	100,00	-9,20000*	.47516	.000	-10.5501	-7.8499
	200,00	-22,00000*	.47516	.000	-23.3501	-20.6499
75,00	25,00	6,80000*	.47516	.000	5.4499	8.1501
	50,00	5,40000*	.47516	.000	4.0499	6.7501
	100,00	-3,80000*	.47516	.000	-5.1501	-2.4499
	200,00	-16,60000*	.47516	.000	-17.9501	-15.2499
100,00	25,00	10,60000*	.47516	.000	9.2499	11.9501
	50,00	9,20000*	.47516	.000	7.8499	10.5501
	75,00	3,80000*	.47516	.000	2.4499	5.1501
	200,00	-12,80000*	.47516	.000	-14.1501	-11.4499
200,00	25,00	23,40000*	.47516	.000	22.0499	24.7501
	50,00	22,00000*	.47516	.000	20.6499	23.3501
	75,00	16,60000*	.47516	.000	15.2499	17.9501
	100,00	12,80000*	.47516	.000	11.4499	14.1501

Prueba de homogeneidad de varianzas

Diametro_Medio_Halo

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.589	4	45	.194

ANEXO 7

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de ruda				Oxacilina	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	19	14	9	8	33	0
2	18	15	9	9	30	0
3	20	15	10	7	32	0
4	16	13	9	8	32	0
5	19	15	11	8	32	0
6	19	14	11	8	31	0
7	18	16	8	9	32	0
8	17	15	9	8	29	0
9	21	15	9	8	31	0
10	19	16	9	7	32	0

ANEXO 8

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTE M	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1												
2												
3												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos						
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación						
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial						
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir						
VALIDEZ						
APLICABLE		NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:

Firma y sello

Firma y sello

Firma y sello

EVALUACIÓN DEL INFORME DE TESIS (ENFOQUE CUANTITATIVO)

FACULTAD: De Ciencias Médicas

ESCUELA: De Medicina

ALUMNO: Roque Lezama Eskarlet

FECHA: febrero 2019

TEMA: "EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA DE *Ruta graveolens* "ruda" SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923"

INDICADORES	NIVEL MÁXI MO POSIBL E A	NIVEL EFEC TIVO LOGR ADO	NIVEL EFECTI VO LOGRA DO
1. TÍTULO			
1.1. El título contiene las variables del problema de investigación e informa adecuadamente el contenido del trabajo.	2		
2. INTRODUCCIÓN			
2.1. Presenta antecedentes sustentados con fuentes confiables y congruentes con el problema de investigación.	2		
2.2. Desarrolla la fundamentación científica, técnica y humanística (marco teórico)	2		
2.3. Justifica la pertinencia científico-tecnológica y relevancia de la investigación.	2		
2.4. El problema está claramente contextualizado, delimitado y caracterizado.	2		
2.5. El problema está formulado en forma clara, concreta y precisa, e incluye explícitamente las variables a trabajar.	2		
2.6. Los objetivos se relacionan directamente con la formulación del	2		
3. MARCO METODOLÓGICO			
3.1. La hipótesis se relaciona con los objetivos y es verificable.	2		
3.2. Identifica de manera clara y precisa las variables de estudio.	2		
3.3. Define teóricamente las variables de estudio	2		
3.4. Operacionaliza las variables adecuadamente	3		
3.5. Los indicadores se derivan de la definición teórica de las variables.	3		
3.6. Selecciona adecuadamente el tipo de estudio y diseño de investigación.	2		
3.7. Establece la población y la muestra de acuerdo a la naturaleza y carácter del estudio.	2		

3.8. Selecciona técnicas adecuadas a la naturaleza del estudio.	2		
3.8. Selecciona y /o elabora el/los instrumento(s) que le permitan recoger los datos relacionados con las variables e indicadores del estudio.	2		
3.10. De ser necesario, realiza correctamente la validación de su instrumento	2		
3.11. Selecciona los métodos estadísticos adecuados para el análisis de información	2		
4. RESULTADOS			
4.1. Procesa los resultados elaborando cuadros y/o gráficos estadísticos.	4		
4.2. Ordena los cuadros de resultados de acuerdo a sus objetivos específicos	3		
4.3. Interpreta adecuadamente los resultados	4		
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS			
5.1. Elabora un análisis minucioso de los resultados tomando en cuenta los antecedentes y el marco teórico.	5		

6. CONCLUSIONES			
6.1. Las conclusiones se derivan directamente de los objetivos y/o hipótesis	4		
7. RECOMENDACIONES			
7.1. Las recomendaciones son pertinentes a las conclusiones planteadas.	3		
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS			
8.1. La bibliografía deben contener las referencias señaladas al interior del documento.	2		
8.2. Cita correctamente las fuentes revisadas en base a las Normas Internacionales correspondientes.	2		
9. DE LA SUSTENTACIÓN			
9.1. Elabora adecuadamente las diapositivas para su exposición.	3		
9.2. Revela conocer el contenido de su tema de investigación.	9		
9.3. Demuestra conocimiento y entrenamiento en el manejo y empleo del método Científico	10		
9.4. Utiliza los términos con propiedad, sigue las normas de la sintaxis.	7		
9.5. Frente a preguntas sobre temas nuevos que se le plantea, responde con propiedad y se deja entender claramente.	6		
TOTAL	100		

Escala de conversión del Puntaje a Escala vigesimal:

PUNTAJE	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98	100
NOTA	13.6	14	14.4	14.8	15.2	15.6	16	16.4	16.8	17.2	17.6	18	18.4	18.8	19.2	19.6	20

PUNTAJE	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
NOTA	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2	2.4	2.8	3.2	3.6	4	4.4	4.8	5.2	5.6	6	6.4

PUNTAJE	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66
NOTA	6.8	7.2	7.6	8	8.4	8.8	9.2	9.6	10	10.4	10.8	11.2	11.6	12	12.4	12.8	13.2

Dra. Ana María Chian García

PRESIDENTE

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

SECRETARIA

Dr. Mg. David René Rodríguez Díaz

VOCAL

Nota: En la Jornada de Investigación N° 1, el informe se evaluará **hasta el ítem 4.3**, más la sustentación con los ítems **9.1 a 9.5**. Se consideran **HABILITADOS** los estudiantes que obtengan puntaje igual o mayor a 44.1, En esta Jornada el puntaje de los ítems 9.1 a 9.5 solo es **REFERENCIAL**. El puntaje obtenido se guardará para considerarlo en la Jornada N° 2.

En la Jornada N° 1, el Jurado estará conformado por el **Docente de la experiencia curricular**.

En la Jornada N° 2, se continúa la evaluación desde el **ítem 5.1 hasta el 9.5**.

Para efecto de la nota final se considera lo siguiente:

Puntaje obtenido en los Ítems 1.1 hasta 4.3 + puntaje de los ítems 5.1 hasta 9.5

En la Jornada N° 2, el Jurado estará conformado por tres docentes: un metodólogo y dos especialistas.



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

El que suscribe DRA. LLAQUE SÁNCHEZ, MARÍA ROCÍO DEL PILAR, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Informes de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, de la alumna: ROQUE LEZAMA, ESKARLLET ESTHER, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA DE Ruta graveolens “ruda” SOBRE Staphylococcus aureus ATCC 25923, Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 7 días del mes de febrero del 2019

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

CPM 19275



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

El que suscribe MG. BLGO. POLO GAMBOA, JAIME, Docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Informes de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, de la alumna: ROQUE LEZAMA, ESKARLLET ESTHER, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulada:

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA HOJA DE Ruta graveolens "ruda" SOBRE Staphylococcus aureus ATCC 25923, Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 7 días del mes de febrero del 2019

Dr. _____

CPN _____