

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DEL GEL DE
ALOE VERA EN UNA CEPA DE *STREPTOCOCCUS*
PNEUMONIAE”**

AUTOR: ANTHONY JOEL NEIRA LÁZARO

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO ZARATE ARCE

TRUJILLO-PERU

2018

JURADO

<p>_____</p> <p>Presidente Dr. Castañeda Sabogal, Álex CMP. 21221</p>	<p>_____</p> <p>Secretario Dr. Fernández Gómez, Víctor Javier CMP. 26941</p>
<p>_____</p> <p>Vocal Dr. Cornejo Cruz, Marco Antonio CMP. 26961</p>	<p>_____</p> <p>Asesor Dr. Zárate Arce, Marco Antonio CMP. 15345</p>

ASESOR

Dr. Marco Antonio Zárate Arce

DEDICATORIA

A mi madre Sonia Lázaro Silva que ha hecho más por este proyecto que yo mismo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido lograr esta meta. A mi grandiosa familia y a mis maestros, el Dr. José González Cabeza y Dr. Marco Antonio Zárate Arce por el enorme apoyo dado.

RESUMEN

Objetivo: Determinar si existe efecto antimicrobiano *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae* usando espectrofotometría.

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio de tipo comparativo, longitudinal, prospectivo, experimental. La población estuvo conformada por el conjunto de microtubos conteniendo 5 concentraciones del gel de *Aloe vera* (50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125%) con y sin inóculo de una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, analizando el efecto antibiótico a través del sistema de curvas de absorbancia por espectrofotometría a las 24 horas de incubación.

Resultados: Existió un aumento significativo de absorbancia por espectrofotometría en todo el grupo “ensayo” comparada con el “control negativo” tras 24 horas de incubación ($p < 0.002$). Sin embargo, existió una disminución estadísticamente significativa de 22% de la absorbancia del grupo “ensayo” del “control positivo” desde la concentración de 50% ($p < 0.008$). Además, se observó un aumento de 1.2 veces de absorbancia en el grupo “control negativo” tras 24 horas de incubación; sin embargo, éste no fue estadísticamente significativo ($p > 0.100$).

Conclusiones: El gel de *Aloe vera* impide el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* en un 22% a partir de la concentración de 50%, en 24 horas de incubación; sin embargo, no se obtuvo la concentración mínima inhibitoria en las diluciones estudiadas.

Palabras Clave: *Aloe vera*, *Streptococcus pneumoniae*, Concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

Objective: To determine if there is an in vitro antimicrobial effect of *Aloe vera* gel in a strain of *Streptococcus pneumoniae* using spectrophotometry.

Material and Methods: A comparative, longitudinal, prospective, experimental study was carried out. The population consisted of the set of microtubes containing 5 concentrations of Aloe vera gel (50%, 25%, 12.5%, 6.25% and 3.125%) with and without inoculum of a strain of *Streptococcus pneumoniae*, analyzing the antibiotic effect through of the system of absorbance curves by spectrophotometry at 24 hours of incubation.

Results: There was a significant increase in absorbance by spectrophotometry in the whole "test" group compared to the "negative control" after 24 hours of incubation ($p < 0.002$). However, there was a statistically significant decrease of 22% of the absorbance of the "test" group of the "positive control" from the 50% concentration ($p < 0.008$). In addition, a 1.2-fold increase in absorbance was observed in the "negative control" group after 24 hours of incubation; however, this was not statistically significant ($p > 0.100$).

Conclusions: *Aloe vera* gel prevents the growth of *Streptococcus pneumoniae* in approximately 22% from the 50% concentration in 24 hours of incubation; however, the minimum inhibitory concentration was not obtained in the dilutions studied.

Palabras Clave: *Aloe vera*, *Streptococcus pneumoniae*, minimal inhibitory concentration.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	37

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú el gel de *Aloe vera* es usado para el tratamiento de trastornos respiratorios como bronquitis y asma.¹ *Streptococcus pneumoniae* es el agente principal de la neumonía adquirida en la comunidad y causa otras condiciones como exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, sinusitis, otitis media y conjuntivitis.²

En el siguiente estudio se intentó demostrar, usando un enfoque metódico novedoso, si el gel de *Aloe vera* posee efecto antibacteriano contra el *Streptococcus pneumoniae*, bacteria causante de la muerte de 922 000 niños menores de 05 años durante el año 2015, representando el 15% de muertes de niños de esta edad.³ A nivel mundial, en 1990, el *Streptococcus pneumoniae* fue el agente más frecuentemente aislado en casos de infecciones respiratorias en niños menores de 2 años y adultos mayores de 60 años²; además, fue la segunda causa más frecuente, después de *Haemophilus influenzae* tipo b, en la meningitis bacteriana y otitis media en niños²; además, fue el agente etiológico más importante en la neumonía adquirida en la comunidad en adultos y la segunda causa más frecuente de meningitis bacteriana, después de *Neisseria meningitidis*.²

En el Perú, en el año 2015 se notificaron 7010 casos de neumonía en niños menores de 5 años, falleciendo 77 de estos niños. En el 2017, se notificaron 26035 casos de neumonía en niños menores de 5 años, muriendo 240 niños; mostrando un aumento de la mortalidad en 4.8% comparado con el año 2016.⁴

Aunado a éste aumento de la mortalidad⁴, una problemática es la tendencia de aumento de la resistencia de *S. pneumoniae* a diversos fármacos.⁵ En el Perú, en el 2013, se reportó 58% de resistencia al cotrimoxazol, 52.2% a las penicilinas, 29,1% a las tetraciclinas, y 28.9% a la azitromicina⁵. El 29,5% de las cepas fueron multirresistentes, o sea, resistentes a tres o más grupos de antibióticos.⁵ La resistencia a las penicilinas que son el tratamiento de primera elección⁶, fue de 5% de las cepas en el año 1997, 15% en el año

2000 y 2001, 36 y 37% en los años 2003 y 2004, y 47% en el 2008⁵. Además, en los casos de enfermedad neumocócica invasiva se reportaron resistencia en 3% de las cepas en adultos en 1994, y 23% en el 2008.⁷

La resistencia a los B-lactámicos se debe al desarrollo de formas alteradas de proteínas fijadoras de penicilina, asociado a modificaciones en las *pbp1a*, *pbp2x* y sobre todo *pbp2b*.⁸ La resistencia a los macrólidos está causado por modificación de la metilasa ribosómica, y por expulsión activa.⁸ La resistencia a quinolonas es causada por mutaciones de los genes *parC* y *gyrA*⁸, genes involucrados en la codificación proteica de la topoisomerasa IV⁸.

Entre los serotipos que han presentado mayor resistencia se encuentran el 6, 9, 14, 19 y 23.⁵ En el Perú los serotipos causantes de infecciones respiratorias altas en niños son, en orden de frecuencia: 19, 6, 23, 14.⁸

Una de las plantas que ha demostrado actividad antimicrobiana ante *Streptococcus spp.* es el *Aloe vera*⁹.

El *Aloe vera* es una planta de la familia de las asfodeláceas o liláceas, con alrededor de 360 especies diferentes.¹⁰ La planta de *Aloe vera* se compone de raíz, tallo, hojas y flores¹⁰. Las hojas se componen de 3 capas: el exocarpio (o corteza), la cutícula y la pulpa¹⁰. La pulpa representa el 65 al 80% del peso total¹⁰. Entre la corteza y la pulpa, ocupando toda la superficie interna de la hoja, se encuentran los conductos de aloína, que son una serie de canales por donde circula la savia de la planta, conocida como acíbar, el cual presenta un alto contenido de aloína, el cual es una antraquinona derivada del aloe-emodina y glucosa.¹⁰

La pulpa en bruto contiene aproximadamente 98.5% de agua, mientras que el gel mucinoso contienen aproximadamente 99.3%.^{11,12} El 0.7% de material sólido residual está compuesto de vitaminas hidro y liposolubles, minerales, enzimas, polisacáridos,

componentes fenólicos y ácidos orgánicos.¹¹ Podríamos clasificar los elementos en 8 grupos: antraquinonas, cromonas, vitaminas, minerales, carbohidratos, enzimas, lípidos, compuestos orgánicos y aminoácidos.^{10,13}

Basado en esto, existen diversos mecanismos antimicrobianos y retrovirales que posee el *Aloe vera*. Diferentes antraquinonas naturales y compuestos similares han mostrado efectos antivirales para algunas infecciones tales como el Herpes Simple tipo 1 y 2, Varicela e Influenza HIV-1 mediante la inhibición de la adsorción del virus y su consecuente replicación.¹⁴ Sus compuestos alqui bencénicos tienen efecto membranolítico contra los protozoarios ciliados.¹⁴ La concentración de antraquinonas en el gel de *Aloe vera* es aproximadamente 0.16%.¹⁴

El acemanano, presente en el gel de *Aloe vera*, activa a los macrófagos e induce a la secreción de óxido nítrico, citoquinas como IL-1, IL-6, FNT-alfa, interferón gamma y marcadores celulares de superficie; además, estimula la respuesta antigénica de los linfocitos, y estimula la genesis de macrofagos.^{10,14,15}

Aloe vera contiene 6 sustancias antisépticas: Lupeol, ácido salicílico, nitrógeno ureico, ácido cinámico, fenoles y sulfuros.¹⁵

El *Aloe vera* presenta gran actividad antibacteriana contra Gram-positivos comparado con Gram-negativos¹⁶. Los extractos etanólicos muestran mayor inhibición que los extractos de metanol. Las antraquinonas, sustancias similares a las quinolonas, aisladas del exudado de *Aloe vera* presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro¹⁶. La emodina actúa contra la *Escherichia coli* posiblemente inhibiendo su sistema de transporte de solutos de su membrana¹⁷.

Otro mecanismo antibiótico, probablemente por competencia por los nutrientes, lo realizan 29 bacterias endófitas aisladas de la planta de *Aloe vera*: Estas bacterias pertenecen a 13 géneros de bacterias: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*,

Chryseobacterium, *Sphingobacterium*, *Aeromonas*, *Providencia*, *Cedecea*, *Klebsiella*, *Cronobacter*, *Macrococcus* y *Shigella*. También, metabolitos de las especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium* y *Shigella* poseen efectos antimicrobianos de amplio espectro contra cepas patogénicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*. Así también, 80% de las bacterias endófitas producen 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, DPPH, que posee propiedades bactericidas.¹⁸

Lorenzetti y col., en el año 1964, midieron la actividad antimicrobiana de hojas de *Aloe vera* L. usando el método de agar difusión sobre *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium xerose*, *Shigella paradysenteriae*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella schotimuelleri*, y *Salmonella paratyphi*. Ninguno de los extractos con petróleo, cloroformo, etanol o agua destilada mostró actividad inhibitoria sobre los organismos en estudio, excepto el gel puro congelado de las hojas de *Aloe vera*, los cuales produjeron halos de inhibición en *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. xerose*, y *S. paratyphi*, mostrando la importancia de los elementos antraquinonas que se pueden alterar con los mencionados extractos, y no al mantenerse en congelación sin oxidación.¹⁹

Lawrence y col., en el año 2014, en la India, publicaron un estudio de la actividad antibacteriana de extractos de etanol, metanol y acetato del gel de *Aloe vera* en cuatro bacterias Gram-positivas y cuatro Gram-negativas. Los extractos mostraron diversas eficacias. Los extractos de etanol y metanol mostraron mayor actividad que el de acetona, el cual mostró leve o ningún efecto antibiótico ($p < 0.05$). Los componentes más importantes hallados en los extractos de etanol y metanol fueron el ácido p-cumarico, pirocatecol y ácido cinámico. El estudio sugiere que la actividad antimicrobiana del gel de *Aloe vera* depende de la sinergia de efectos de diferentes compuestos.²⁰

Ramírez y col., en el 2012, en Venezuela, estudiaron el efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de *Aloe vera* sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. Se

determinaron 3 indicadores: la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y el Tiempo Mínimo Inhibitorio (TMI). Se determinó que la CMI fue del 10% de extracto gel de *Aloe vera* y el TMI fue de 5 horas en las concentraciones 10%, 20% y 30%, y de 8 horas para 50%, 80%, 90% y 100%. Se comprobó que el gel de *Aloe vera* tiene poder bacteriostático sobre *Listeria monocytogenes* ($p < 0.001$).²¹

Kriplani et al., en el año 2013, en la India, evaluaron la eficacia antimicrobiana de 6 materiales de llenado de canales dentales en 18 cepas de bacterias aisladas de canales de un diente molar primario. Usando el método de agar difusión compararon la eficacia antimicrobiana de los compuestos: óxido de zinc eugenol, óxido de zinc eugenol más *Aloe vera*, hidróxido de calcio más agua, hidróxido de calcio más *Aloe vera*, *Aloe vera* más agua, Metapex y vaselina. En el caso de *Streptococcus pyogenes*, el halo de inhibición mayor obtenido fue del *Aloe vera* más agua (18.16mm), comparado con el óxido de zinc eugenol (11.5mm), y Metapex (10.33mm). *Staphylococcus aureus* fue inhibido principalmente por óxido de zinc eugenol más *Aloe vera* (20.5mm), seguido de *Aloe vera* más agua (18.33mm) e hidróxido de calcio más agua más *Aloe vera* (15.33mm). Determinaron que la concentración mínima bactericida de *Aloe vera* fue 500mg/mL.²²

Gawron-Gzella et al., en el año 2014, en Polonia, estudiaron la eficacia de un jarabe cuyo componente principal es un extracto de hojas de *Aloe arborescens*, especie del mismo género de *Aloe vera*. Se demostró que era bactericida contra colonias de las bacterias más frecuentes en las infecciones respiratorias altas. Las bacterias estudiadas y la Concentración Mínima Inhibitoria para ellas fueron: *Peptostreptococcus anaerobius*, ≥ 200 mg/mL; *Parvimonas mira*, ≥ 200 mg/mL; *Staphylococcus aureus*, > 200 mg/mL, *Streptococcus pyogenes*, 6.2 mg/mL; *Streptococcus pneumoniae*, 6.2 mg/mL; *Streptococcus anginosus*, 100 mg/mL, *Haemophilus influenzae*, 6.2 mg/mL, *Moraxella catarrhalis*, 50 mg/mL, *Pseudomona aeruginosa*, ≥ 200 mg/mL y *Candida albicans*, 200 mg/mL, después de aproximadamente 15 minutos. Recomendaron el uso de este jarabe

como una alternativa o complemento de la terapia clásica en infecciones respiratorias, especialmente en niños.²³

Coronado, en Perú, en el 2015, demostró que existe efecto sinérgico *in vitro* de vancomicina con *Aloe vera* al 50%, 75% y 100% sobre tres cepas de *Staphylococcus aureus*, resultando bactericida a la concentración de 75 y 100% (UFC=0). Comparó la sensibilidad de la bacteria a la sustancia antibiótica mediante una escala cualitativa, escala de Duraffourd, demostrando que la vancomicina asociada a *Aloe vera* a 50%, 75% y 100% fue altamente sensibles.²⁴

Goudarzi et al., en el año 2015 realizaron un estudio para comparar la actividad antimicrobiana del gel de *Aloe vera* con Ciprofloxacino, Gentamicina e Imipenen en 140 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo resistentes, o sea que son resistentes a 2 o más antibióticos incluida Cefalosporinas de tercera generación. Los resultados de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias del 50% de las bacterias (MIC50) fueron: gel de *Aloe vera*, 200 mcg/mL; Ciprofloxacino, 4 mcg/mL, Gentamicina, 8 mcg/mL e Imipenem, 4 mcg/mL. La diferencia entre la potencia del gel de *Aloe vera* sobre la *Pseudomona aeruginosa* con los demás antibióticos fue muy alta. Sin embargo, considerando que 72.8% de las cepas fueron resistentes a Ciprofloxacino, 52.8% fueron resistentes para Gentamicina y 47.1% para Imipenem, recomendaron que sería beneficioso el uso de Aloe como coadyuvante en la terapia.²⁵

En el presente estudio pretendemos demostrar la actividad antimicrobiana del gel de *Aloe vera* sobre cepas patógenas de *Streptococcus pneumoniae* mediante microdilución. Basándonos en la bibliografía existente, nuestro trabajo es conveniente debido a los resultados discordantes en la bibliografía consultada; además, tiene implicancia práctica debido a que se han realizado métodos novedosos en la medición del efecto antibiótico. Este estudio tiene un beneficio social debido a que promovería el uso de tratamientos alternativos o complementarios, mejorando las terapias antibióticas, disminuyendo así la tendencia a altas resistencias bacterianas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA CIENTÍFICO

¿Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae*?

B. HIPÓTESIS

- a. **HO:** No existe actividad antimicrobiana *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
- b. **H1:** Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.

C. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- i. Medir la curva de absorbancia por espectrofotometría de las diferentes concentraciones de gel de *Aloe vera* con y sin inóculo de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* tras 24 horas de incubación.
- ii. Comparar la curva de absorbancia por espectrofotometría de las diferentes concentraciones de gel de *Aloe vera* con y sin inóculo de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* tras 24 horas de incubación.
- iii. Comparar la curva de absorbancia por espectrofotometría de las diferentes concentraciones de gel de *Aloe vera* inoculadas con una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, con un control de cepa de *Streptococcus pneumoniae* en un medio óptimo de crecimiento, tras 24 horas de incubación.

D. MATERIAL Y MÉTODOS

- a. **POBLACIÓN DIANA O UNIVERSO:** Cultivos de una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
- b. **POBLACIÓN DE ESTUDIO:** Cultivo de una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
- c. **MUESTRA**
 - i. **UNIDAD DE ANÁLISIS:** Microtubo con una concentración de gel de *Aloe vera* inoculado posteriormente con una cepa de *Streptococcus pneumoniae*.
 - ii. **UNIDAD DE MUESTREO:** Microtubo con una concentración de gel de *Aloe vera* inoculado posteriormente con una cepa de *Streptococcus pneumoniae* tras un periodo de incubación de 24 horas.

iii. TAMAÑO MUESTRAL:

Se usó la fórmula de comparación de dos medias independientes usando T Test a priori para modelos experimentales. ²⁶

Se usó el software G*Power 3.1.9.2 (Germany)²⁷

Los valores usados fueron:

- Colas: Una
- Tamaño del efecto d: 2.5 (obtenido para desviación estándar 2 y diferencia de medias de 10)
- Error α : 0.05
- Poder (1-error β): 0.95
- Ratio N2/N1: 1

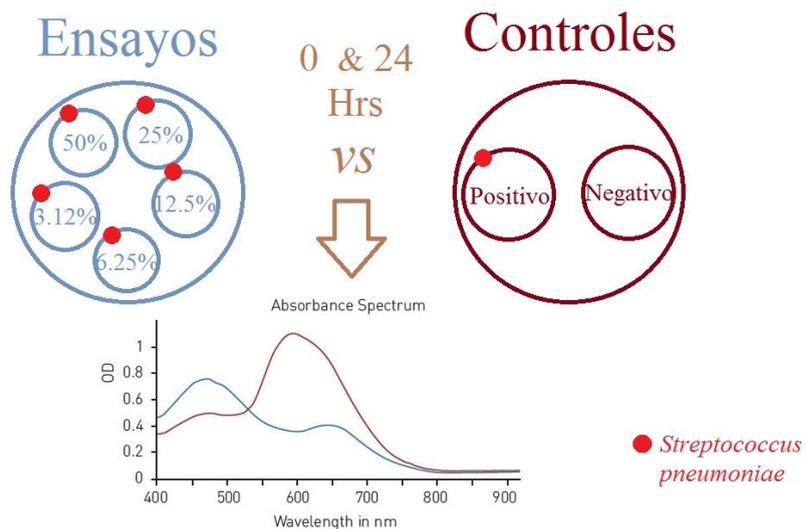
La muestra obtenida fue de 5 para cada grupo.

Por lo tanto, se repitieron 5 veces el experimento de cada concentración en estudio, en el grupo “ensayo”.

E. DISEÑO DE ESTUDIO

a. TIPO DE ESTUDIO: Es experimental, longitudinal, prospectivo, analítico.

b. DISEÑO ESPECÍFICO:



c. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

Variable	Tipo	Escala	Indicador	Índice
Concentración de gel de <i>Aloe vera</i>	Cualitativa	Ordinal	Porcentaje	50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%
Actividad antimicrobiana por espectrofotometría	Cuantitativa	Discreta, De Razón	Absorbancia	0 a 1

d. DEFINICIONES OPERACIONALES

- i. *Aloe vera*: Un testigo adicional al personal técnico que realiza el procedimiento observó la aplicación de 5 concentraciones del gel de *Aloe vera* diluidos con caldo Brain-Heart infusion en sus respectivos microtubos. Las concentraciones fueron: 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125%.
- ii. Actividad antimicrobiana: Se compararon estadísticamente las absorbancias medidas a las 0 y 24 horas de incubación entre los grupos “ensayo”, que correspondía a las diversas concentraciones de gel de *Aloe vera* inoculadas con una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, el grupo “control negativo”, que correspondía sólo a gel de *Aloe vera* sin inóculo bacteriano, y el grupo “control positivo” que correspondía a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* en caldo BHI.

En espectrofotometría, se requieren entender 2 términos: transmitancia y absorbancia. La transmitancia se define como el porcentaje del haz de luz que ha atravesado la muestra sin ser dispersado.²⁸ La absorbancia es lo opuesto, es el porcentaje de luz

reflejado o absorbido por la sustancia (muestra en estudio) y es calculada por $-\log_{10}$ del valor de la transmitancia, la cual es medida por un receptor de luz detrás de la muestra.²⁸ La absorbancia es referida con valores usualmente entre 0 a 1. A medida que existan mayor cantidad de moléculas en una muestra, mayor será el porcentaje de luz dispersado y absorbido por éste, y mayor el valor de la absorbancia. Las bacterias dispersan y absorben luz de longitudes de 600 nm, un valor referencial altamente conocido.²⁹ Es por esta razón que se usa esta longitud de onda, con la cual se medirá la concentración de bacterias en la muestra.

La medición de la absorbancia fue hecha en un Espectrofotómetro Thermo Fisher Nicolet iS50 FT-IR con microtubos con BHI estéril como blanco con el fin de anular la absorbancia propia del medio de cultivo.²⁹

F. PROCEDIMIENTOS (Ver ANEXO 03)

a. Aprobación del proyecto:

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para la ejecución del proyecto mediante una solicitud a la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego. (Ver ANEXO 01).

b. Autorización para la ejecución:

Una vez aprobado el proyecto se procedió a solicitar el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego, coordinando con el asesor las fechas de realización del proyecto. (ver ANEXO 02)

c. Obtención del *Aloe vera*:

El *Aloe vera* Linneo *Burm f.*, se obtuvo de un jardín ornamental de la ciudad de Trujillo, La Libertad. La edad promedio de las plantas fue de 2 años de vida. Se evaluó la integridad de la planta mediante el examen visual previa

extracción, evaluando un color uniforme, continuidad del exocarpio y ausencia de plagas.

Se recolectó 500 g de hojas de *Aloe vera*, la recolección de la especie se realizó por el método convencional para lo cual se seleccionó el material en el campo a horas de la mañana, verificando que esté en buenas condiciones y se trasladó en bolsas plásticas estériles, oscuras a temperatura ambiente (aproximadamente 29°C).

d. Preparación de la muestra:

- i. Transporte:** Se identificó la muestra taxonómicamente en el Herbario Antenor Orrego (HAO) (ver **ANEXO 08**) y se transportó a temperatura ambiente, al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada Antenor Orrego.
- ii. Lavado y esterilización:** Tras separar las sustancias extrañas, el material recolectado se lavó con agua destilada estéril. Luego se procedió a esterilizar la superficie de las hojas con alcohol etílico al 70%.
- iii. Extracción del gel:** Se realizaron cortes manuales a la hoja con un cuchillo estéril, resecaando la pulpa desde aproximadamente 2,5cm desde la base hasta 15 cm antes de la punta. Se obtuvo el gel por curetaje y aspersión de agua destilada estéril que facilitó la recolección.
- iv. Obtención de las diluciones:** Tras la obtención del gel éste se diluyó con caldo Brain-Heart infusión para obtener las siguientes concentraciones: 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125%.

e. Obtención de la cepa y preparación del inóculo:

Se aisló un cultivo puro de *Streptococcus pneumoniae* de la siguiente manera:

1. Se obtuvo una muestra de esputo de un paciente con cuadro clínico compatible con neumonía lobar del hospital Víctor Lazarte Echeagaray.

2. Se realizó tinción Gram, observando diplococos Gram positivos, encapsulados.
3. Se sembró la muestra en agar sangre mediante estriación, incubándolo a 37°C por 24 horas. Se observaron crecimiento de colonias alfa hemolíticas. También se sembró en caldo Tioglicolato, y en agar Cerebro-Corazón siendo incubados a 37°C por 24 horas, realizando coloración de Gram a partir de los cultivos para confirmar la presencia de diplococos Gram positivos.

No se obtuvo el fenotipo bacteriano basado en la susceptibilidad antibiótica.

f. Distribución de las diluciones: Se distribuyeron de la siguiente manera en una microplaca estándar de 96 pocillos:

- i. El grupo “ensayo” corresponden a 25 microtubos con gel de *Aloe vera* divididos en 5 concentraciones distintas: 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125% obtenidos de la dilución de caldo Brain-Heart Infusion (BHI) más gel de *Aloe vera* hasta conseguir 100uL de la dilución. A cada microtubo se añadió 10uL de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* de un tubo base a 1 McFarland.
- ii. El grupo “control negativo” consistían en 5 microtubos, cada uno representando a cada dilución del gel de *Aloe vera* diluidos con BHI hasta completar 100uL, sin cepa bacteriana.
- iii. El grupo “control positivo” son 2 microtubos que contienen 100uL de BHI y 10uL de la cepa bacteriana de un tubo base a 1 McFarland.
(ver ANEXO 04)

g. Determinación de la Actividad antimicrobiana:

Se definirá como actividad antimicrobiana a la disminución estadísticamente significativa entre las absorbancias medidas a las 24 horas de incubación entre los grupos “ensayo” y “control positivo”. Se definió como la concentración mínima inhibitoria a la concentración mínima de gel de *Aloe vera* de la curva de absorbancia del grupo “ensayo” desde el cual no exista diferencia

significativa con el grupo “control negativo” a las 24 horas de incubación.

La medición de la absorbancia fue hecha en un Espectrofotómetro Thermo Fisher Nicolet iS50 FT-IR con microtubos conteniendo caldo BHI como blanco a una longitud de onda de 600 nm. Se usaron rangos de 0 a 1. La absorbancia se basa en el principio de dispersión de luz por la vibración entre los átomos de las moléculas de una sustancia y la absorbancia de fotones de cierta longitud de onda por espacios de energía en sus orbitales moleculares.³⁰

h. Análisis de datos

- 1. Estadística descriptiva:** Los datos obtenidos se expresaron en tablas de $n \times n$. Teniendo en cuenta de la naturaleza de las mediciones realizadas, se consideró en el presente experimento que la distribución de los valores obtenidos siguen una distribución no paramétrica.
- 2. Estadística analítica:** Con el fin de demostrar la hipótesis planteada, en el presente estudio se comparó las medias de los grupos “control negativo”, “ensayo” y “control positivo” representando los microtubos con las concentraciones de gel de *Aloe vera* sin cepa bacteriana, con cepa bacteriana y sólo la cepa bacteriana sin inhibidor respectivamente. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes no paramétricas y la prueba Wilcoxon para muestras relacionadas no paramétricas . Los datos fueron procesados a través del programa estadístico IBM® SPSS® 1.0.0.903.

G. CONSIDERACIONES ÉTICAS

A pesar de que la declaración de Helsinki ³¹ aborda principios éticos para estudios en humanos, nuestra investigación tomó en cuenta el principio de beneficencia debido a que estudia una terapia alternativa para una enfermedad infecciosa de prevalencia en países en desarrollo y contribuye con la comunidad científica médica; éste trabajo cumplió con la recomendación de usar en último término a un ser humano, ya que promueve el estudio *in vitro* para verificar la actividad antimicrobiana de un posible nuevo antibiótico como el gel de *Aloe vera* y promueve similares trabajos en otros serotipos y con diferentes metodologías; y se siguió la recomendación de enviar el protocolo de la investigación al Comité de Bioética e Investigación de nuestra facultad para su respectiva revisión, con el propósito de cumplir con las exigencias. (Ver **ANEXO 07**)

Se preservó la salud del equipo investigador al cumplir con las normas de bioseguridad descritos en el Manual de Bioseguridad del Ministerio de Salud del Perú, cumpliendo así los artículos 96 al 99 de la Ley General de Salud.³³

Se tomó en cuenta también la conservación del ambiente cumpliendo los procedimientos de eliminación de desechos y material biocontaminado y potencialmente dañino descritos en el Manual de Bioseguridad del Ministerio de Salud del Perú ³³, cumpliendo así los artículos 103 al 105 de la Ley General de Salud.³⁵

En nuestro trabajo se evitó el plagio mediante el respeto a los derechos de autor según las restricciones adherentes, y mediante la presentación del análisis de la bibliografía revisada y ,cuando sea necesario citar literalmente porciones breves de información, se hizo entre comillas. La fuente de base para el análisis estadístico fueron resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto y no fuentes de estudios previos. Declaramos que no existieron conflictos de interés.(Artículo 48 del Código de Ética y Deontología del Colegio médico del Perú).³⁴

III. RESULTADOS

Para determinar la actividad antimicrobiana se usó el sistema de microdilución, y se distribuyeron los grupos en una microplaca estándar de 96 pocillos, como se grafica en el **ANEXO 04**.

Primero se realizó la distribución de las diluciones dentro de una cabina esterilizada con rayos UV y usando el sistema de absorción de aire. Luego se procedió a la lectura de cada microtubo en un Espectrofotómetro Thermo Fisher Nicolet iS50 FT-IR con microtubos con BHI estéril como blanco y con una longitud de onda de 600 nm. Se realizaron 3 mediciones de cada microtubo. Los valores se muestran en el **ANEXO 05**.

Los microtubos se incubaron a 35°C en un sistema aerobio durante 24 horas, tras lo cual se realizó nuevamente una medición de las absorbancias. A esta medición en el tiempo la llamamos “24 Hrs”. Ver **ANEXO 06**.

Se corroboró que no existan mediciones notablemente sobrevaloradas o infravaloradas, y se procedió a tabular los datos en tablas que enfocaran los resultados de los grupos “ensayo” ,“control negativo” y “control positivo”, que corresponde a los microtubos que contenían las diversas concentraciones de gel de *Aloe vera* con y sin cepa de *Streptococcus pneumoniae* y los microtubos con la cepa de *Streptococcus pneumoniae* en caldo Brain-Heart infusion, sin gel de *Aloe vera*, respectivamente. Ver **Tabla 01**.

Con los datos tabulados, se compararon las medias usando la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes de distribución no paramétricas y la prueba de Wilcoxon en caso de ser muestras relacionadas.

TABLA 01. PROMEDIO DE LAS ABSORBANCIAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE LOS GRUPOS “ENSAYO”, “CONTROL NEGATIVO” Y “CONTROL POSITIVO” A LAS 0 y 24 HRS DE INCUBACIÓN

<i>Aloe vera</i> %	0 HRS		24 HRS.					
	CONTROL NEGATIVO	ENSAYO	CONTROL NEGATIVO	p^a	ENSAYO	p^b	CONTROL POSITIVO	p^c
3.125	0.261	0.258	0.266	1.00	0.781	0.002*	0.804	0.910
6.25	0.242	0.26	0.265	0.285	0.760	0.002*	0.804	0.095
12.5	0.245	0.250	0.351	0.180	0.726	0.002*	0.804	0.066
25	0.240	0.240	0.262	0.285	0.816	0.002*	0.804	0.519
50	0.205	0.227	0.346	0.109	0.623	0.002*	0.804	0.008*
Media	0.240		0.298		0.7412		0.804	

a Comparación de medias del grupo “control negativo” a las 0 y 24 horas de incubación usando la prueba de Wilcoxon.

b Comparación de medias del grupo “control negativo” y “ensayo” a las 24 horas de incubación usando la prueba U de Mann-Whitney.

c Comparación de medias del grupo “control positivo” y “ensayo” a las 24 horas de incubación usando la prueba U de Mann-Whitney.

* Se rechaza la hipótesis nula debido a $p < 0.05$

Como observamos en la **Tabla 01**, se puede apreciar un ligero incremento de 1.2 veces aproximadamente la absorbancia en el grupo “control negativo”, especialmente en la concentración de 50%, a las 24 horas de incubación; sin embargo, éste *no* fue estadísticamente significativo. ($p > 0.109$). **Tabla 01**, nota **a**.

Además, se puede observar un aumento estadísticamente significativo de la absorbancia de aproximadamente 2.5 veces en el grupo “ensayo” comparado con el “control negativo” tras 24 horas de incubación, siendo el valor del “25%” el de mayor absorbancia representando aproximadamente 3.2 veces más el de su control ($p < 0.02$). Ver **Tabla 01**, nota **b**. Es importante recalcar que las desviaciones estándar del grupo “ensayo” al 25% son las más altas comparadas con los demás grupos. Ver **Gráfico 02**.

Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano se compararon las medias de los grupos “ensayo” y “control positivo” a las 24 horas de incubación, el cual mostró una disminución estadísticamente significativa de la absorbancia en la concentración de “50%” de gel de *Aloe vera*. ($p < 0.008$). Ver **Tabla 01**, nota c.

Con el fin de evidenciar este fenómeno, graficó la curva de absorbancia del grupo “ensayo” a las 24 horas de incubación (*amarilla*), el cual muestra una tendencia negativa, o sea, inversamente proporcional. Para corroborar este hecho, se ha trazado la recta *trendline*, mostrando una *pendiente* de -0.003 , que significa que, por cada 1% de gel de *Aloe vera* disminuye 0.003 la absorbancia de este grupo.³⁴ Ver **Gráfico 02**.

GRÁFICO 01. CURVAS DE ABSORBANCIA A 600 NM SEGÚN CONCENTRACIÓN DEL GEL DE ALOE VERA DEL GRUPO “ENSAYO”, “CONTROL NEGATIVO” y “CONTROL POSITIVOS” A LAS 0 Y 24 HORAS DE INCUBACIÓN

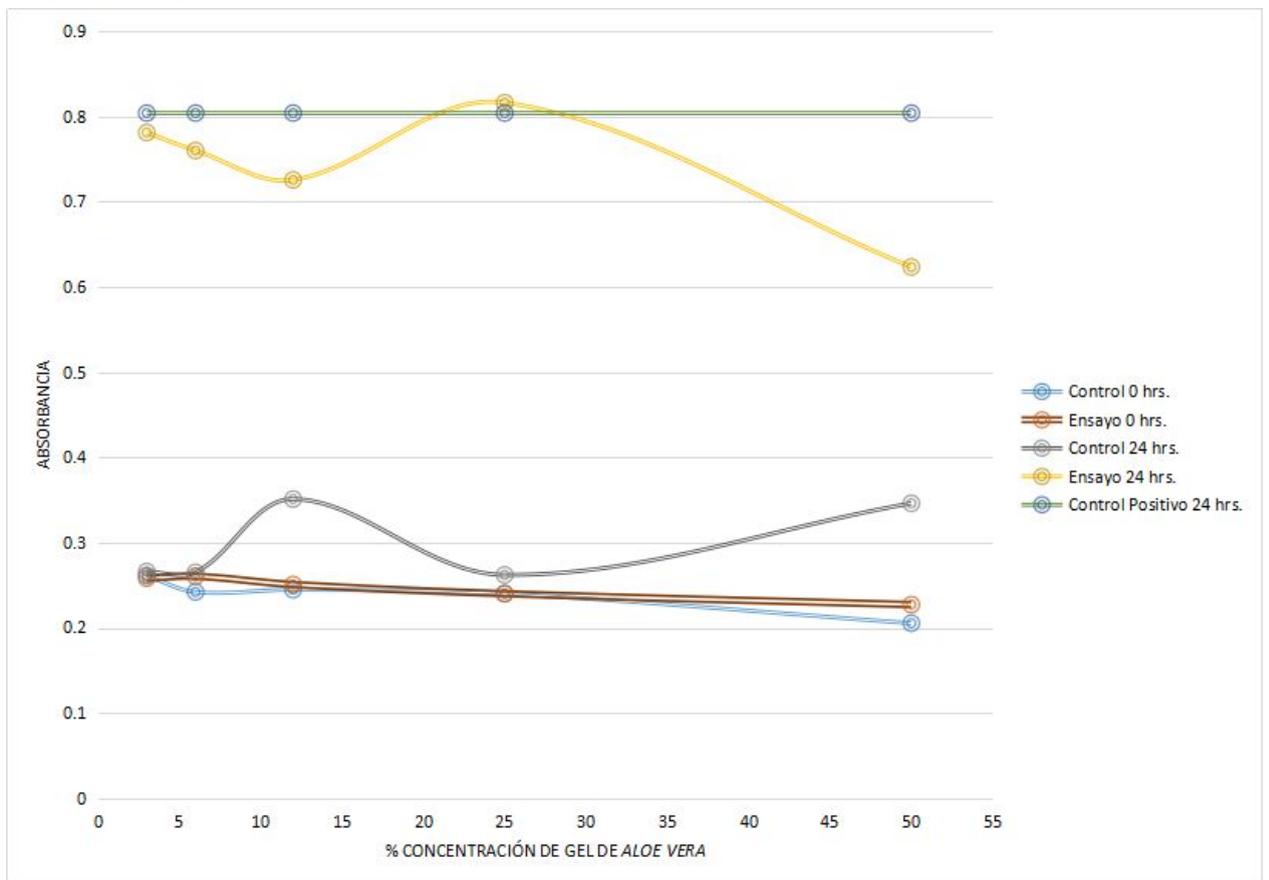
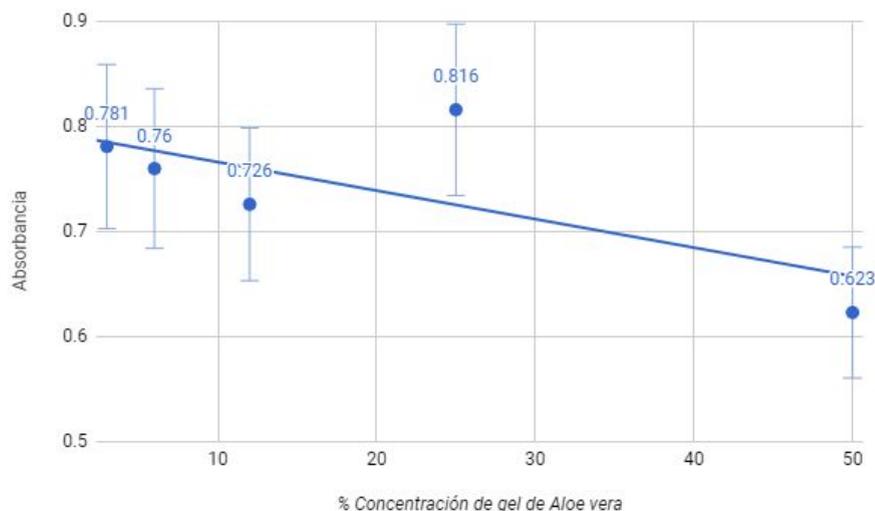


GRÁFICO 02. TRENDLINE DE LA CURVA DE ABSORBANCIA POR ESPECTROFOTOMETRÍA DEL GRUPO “ENSAYO” A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN



Con el fin de dilucidar los elementos que causarían este efecto del grupo “ensayo”, se han determinado los grupos funcionales presentes en el gel de *Aloe vera*. Se determinaron como elementos principales, alcoholes primarios alifáticos y amidas primarias alifáticas. Ver **Tabla 02**.

TABLA 02. ANÁLISIS DEL GEL DE *ALOE VERA* POR BANDAS DE ABSORBANCIA MEDIDAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER.

Pico	Altura	Grupo funcional
649.24	71.83	<i>Fingerprint</i>
1643.88	75.59	N-H
3389.80	25.62	O-H

IV. DISCUSIÓN

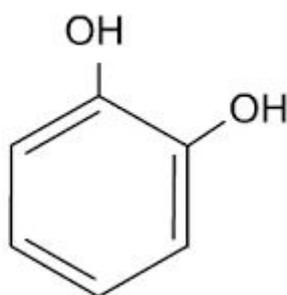
El gel de *Aloe vera* en bruto no es un agente útil en su efecto antimicrobiano ante la cepa de *Streptococcus pneumoniae* debido a que ninguna concentración del gel inhibió notablemente el crecimiento de la cepa en estudio, siendo el motivo de no poder cuantificar la concentración mínima inhibitoria. Sin embargo, ha mostrado una inhibición estadísticamente significativa de 22% del crecimiento a las 24 horas de incubación en la concentración de 50%, con una tendencia evidentemente positiva de su efecto inhibitorio directamente proporcional a la concentración del gel. Esta tendencia se hace más evidente con el cálculo de la pendiente, -0,003, con la cual se estimaría una probable concentración mínima inhibitoria a la concentración de 200% de gel de *Aloe vera*.

Estos resultados no corroboran el estudio de Shupe *et al*⁹ que durante la inscripción de su patente del descubrimiento de bacteriocinas producidas por el gel de *Aloe vera* y otras sustancias antibióticas, se refirió al gel de *Aloe vera* como una sustancia que “extermina eficazmente, elimina o reduce en gran medida, el crecimiento bacteriano de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acne*, *Helicobacter pylori* y *Salmonella typhi*”.⁹

Así también difieren con los resultados de Karumari *et al*³⁵ que en su estudio de la actividad antibacterial del gel de *Aloe vera* con cepas bacterianas Gram positivas, evidenció de 62 a 76 % de inhibición del crecimiento bacteriano en el sistema agar difusión.³⁵

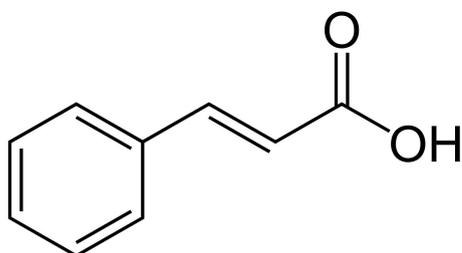
Teorizando, el efecto inhibitorio significativo del gel de *Aloe vera* al 50% se puede explicar debido a 5 componentes del gel de *Aloe vera*, los cuales explicarían la predominancia de los grupos O-H y N-H en éste.

El primero es el Pirocatecol, el cual es un fenol hidroxilado, representando al grupo de los taninos condensados, es una sustancia aromática que según Cowan ³⁷ en su revisión sobre los compuestos antimicrobianos de las plantas, serviría de un mecanismo de defensa de la planta ante microorganismos, insectos y herbívoros por su olor penetrante y sabor picante. Es muy conocido por su efecto desinfectante, incluso tuberculicida, por mantener su efecto bactericida aún después de muchas horas en superficies sólidas o en material orgánico.³⁸ Geissman ³⁹, explicó que este efecto lo causarían los grupos hidroxilos, que al reducirse producirían radicales libres, causantes del efecto tóxico en la bacteria; así también el grupo fenol causa desnaturalización de proteínas bacterianas y disrupción de las membranas celulares sin necesidad de actuar en las proteínas fijadoras de penicilina.^{37,39}



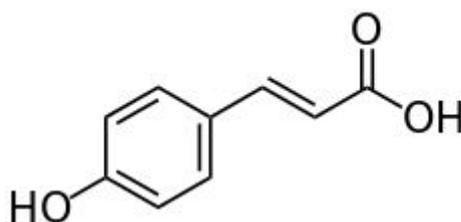
pirocatecol

El segundo compuesto es el ácido cinámico, otro fenol hidroxilado, que Kouassi y Shelef ⁴⁰ en su estudio del efecto del ácido cinámico en *Listeria monocytogenes* por medio de espectrofotometría y electrotransferencia, describieron que causaría un efecto antibiótico al inhibir la recaptación de glucosa y por lo tanto la producción de adenosín trifosfato en la célula bacteriana; además, inhibe ciertas enzimas que son mecanismos protectores bacterianos, como la listeriolisina.^{40,41}



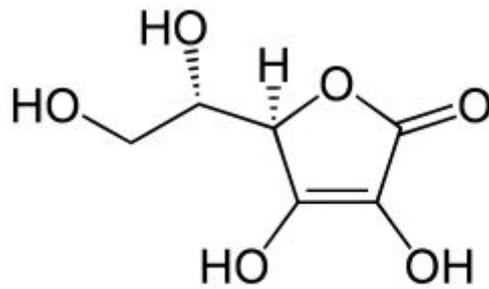
ácido cinámico

El tercer compuesto es el ácido p-coumárico, el cual Branowski ⁴², en su estudio con *Saccharomyces cerevisiae*, ha reportado incrementar la fase de latencia de micro-organismos por inhibir la actividad enzimática de éstos aún con pequeñas concentraciones de éste. ^{42,43,44}



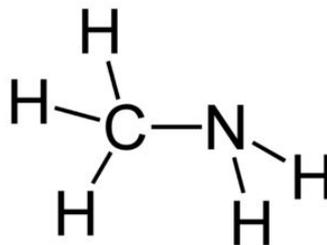
ácido p-coumárico

El cuarto compuesto que también causaría el efecto antimicrobiano es el ácido ascórbico, conocida como vitamina C, que según Vilter ⁴⁵ interferiría con la actividad enzimática de las membranas bacterianas y en mecanismos genéticos de éstos y no por la producción de óxido nítrico, tal y como Fite *et al* lo demuestran en su estudio con *Yersinia enterocolitica*. ^{46, 47}



ácido ascórbico

El quinto compuesto corresponde a la Metilamina y sus derivados, que en general, son compuestos urémicos muy tóxicos ⁴⁷, que pueden ser convertidos a ácido úrico, elemento antibacteriano altamente conocido.



metilamina

El incremento de 1.5 veces la absorbancia en la concentración de 50% del grupo “control negativo” a las 24 horas de incubación podría ser explicado probablemente por los cuerpos fenólicos propios del gel de *Aloe vera*. Entre estos compuestos fenólicos encontramos a las cromonas que como su nombre lo dicen, poseen la capacidad de producir un cromo, un tinte morado a la oxidación de éstos el cual causaría el aumento de la absorbancia.

En la curva del grupo “ensayo” a las 24 horas de incubación se evidencia una orientación atípica en la concentración del 25% del gel de *Aloe vera* en comparación con las otras concentraciones. Sin embargo, en esta concentración la desviación estándar fue alta comparada con los otros grupos (0.119 vs 0.031), presentando mayor fluctuación, por lo que, tomando el valor menor de esta fluctuación, el efecto inhibitorio del gel de *Aloe vera* mostraría un comportamiento lógico.

En este experimento se ha logrado probar que el método usado, microdilución con medición de absorbancia por espectrofotometría, es adecuado para medir y determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* usando gel de *Aloe vera* confrontada con una cepa de *Streptococcus pneumoniae*, y de éste modo, puede ser replicado en otras especies.

Es necesario reconocer que el presente estudio, a pesar de no tener la función de extrapolar la eficacia del gel de *Aloe vera*, presentaría mayor reproducibilidad si se hubiese usado una cepa estandarizada ATCC. Aún así, se usó una cepa solamente, para controlar el sesgo de la variabilidad de especies dentro de un género.

V. CONCLUSIONES

1. El gel de *Aloe vera* presenta actividad antimicrobiana sobre una cepa de *Streptococcus pneumoniae* inhibiendo significativamente 22% de su crecimiento a partir de la concentración de 50%.
2. Se observó un aumento de 1.2 veces la absorbancia de las diversas concentraciones del gel de *Aloe vera* sin inóculo bacteriano, sin embargo, no fue estadísticamente significativo.
3. No se obtuvo la concentración mínima inhibitoria de gel de *Aloe vera* sobre una cepa de *Streptococcus pneumoniae* a las 24 horas de incubación en las diluciones estudiadas, sin embargo, se predice que éste será aproximadamente 200%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda usar el gel de *Aloe vera* liofilizado, debido a que se estima que la concentración mínima inhibitoria del gel de *Aloe vera* sobre esta cepa de *Streptococcus pneumoniae* estaría alrededor del 200%.
2. Se recomienda disminuir la concentración de bacterias endógenas de la pulpa de la planta *Aloe vera* por medio de irradiación ultravioleta a una capa delgada de ésta, o por medio de extractos etanólicos, filtración u otro método científicamente demostrado.
3. Se sugiere la descontaminación de los cuerpos fenólicos mediante el uso de irradiación gamma, inmersión por alcoholes hidrofílicos u otro método científicamente demostrado para un análisis más fidedigno si se usa espectrofotometría.
4. Se recomienda el uso de diversas cepas fenotipificadas por susceptibilidad y con cepas estandarizadas control (ATCC) para futuros estudios.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Busmann R, Glenn A, *Plantas medicinales utilizadas en Perú para el tratamiento de enfermedades respiratorias*, Rev peru biol. 2010; 17(3)
2. Alonso de Velasco E, Verheul A, Verhoef J, Snippe H, *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*, Microbiological Reviews. 1995; 59(4):591-603
3. Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, *CDC Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 13th ed. Washington D.C. Public Health Foundation, 2015.
4. Ordóñez L, *Situación epidemiológica de las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) en el Perú a la SE 52-2017*. 2017, 26 (51): 1606-1607
5. Torres N, Velásquez R, Mercado E, Egoavil M, Horna G, Mejía L, Castillo M, Chaparro E, Hernández R, Silva W, Campos F, Sáenz A, Hidalgo F, Letona C, Valencia A, Cerpa R, López De Romaña B, Torres B, Castillo F, Calle A, Rabanal S, Pando J, Lacroix E, Reyes I, Guerra H, Ochoa T, *Resistencia antibiótica de Streptococcus pneumoniae en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú*. Rev Perú Med Exp Salud Pública 2013; 30(4):575-82
6. Perú. Ministerio De Salud. *Guía de Práctica Clínica de Neumonía en la Niña y el Niño*. 2006.
7. Ruiz J, Simarro E, Gómez J., *Resistencias y tratamiento de Streptococcus pneumoniae*, Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 191-195
8. Mercado E, Egoavil M, Horna S, Torres N, Velásquez R, Castillo M, Chaparro E, Hernández R, Silva W, Campos F, Sáenz A, Hidalgo F, Loetona C, Valencia A, Cerva R, López De Romaña B, Pando J, Torres B, Castillo F, Calle A, Rabanal S, Ochoa T, *Serotipos de neumococo en niños portadores antes de la vacunación antineumocócica en el Perú*, Rev Peru Med Exp Salud Pública 2012,29(1):53-60
9. Shupe K, Coats B, *Antimicrobial agents isolated from Aloe vera*, United States Patent, US 6,290,964 B1, 1999.
10. Dominguez R, Arzate I, Chanona K, Welti J, Alvarado J, Caderón G, Garibay V, Gutiérrez G, *El gel de Aloe vera: estructura, composición, química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria*. Rev Mex Ing Quím 2012;11(1)23-43
11. Hamman J, *Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel*. Molecules 2008, 13, 1599-1616.
12. Nejatizadeh-Barandozi F, *Antibacterial activities and antioxidant capacity of Aloe vera*, Organic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 3, no. 5, pp. 1–8, 2013.
13. Lawrence R, Tripathi P, Eyakumar E, *Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from Aloe vera*. Braz. J. Microbiol. 2009, vol.40, n.4, pp.906-915.
14. Yamaguchi I, Mega N, Sanada H, *Components of the Gel of Aloe Vera (L.) Burm f.* Biosci.Biotech.Biochem. 1992. 57(8)
15. Surjishe A, Vasani R, Saple D, *Aloe Vera: A Short Review*. Indian Journal of Dermatology 53.4 (2008): 163–166.

16. Habeeb F, Shakir E, Bradbury F, Cameron P, Taravati M, Drummond A, Gray A, Ferro V, *Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel*. *Methods*. 2007, 42, 315-320.
17. Alves D, Pérez-Fons L, Estepa A, Micol V, *Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin*. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 549-561.
18. Akinsanya M, Goh J, Lim S, Ting A, *Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in Aloe vera*. *FEMS Microbiol Lett.* 2015 Dec; 362 (23):184
19. Lorenzetti L, Salisbury R, Beal J, Baldwin J, *Bacteriostatic Property of Aloe vera*, *Journal of Pharm Scie* 1964; 53(10):1287
20. Lawrence R, Tripathi P, Jeyakumar E. *Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from Aloe vera*. *Braz. J. Microbiol.* 2009, 40(4):906-915.
21. Ramirez L, Moron De Salim A, Catinella R, Castillo L, *Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de Aloe vera sobre cultivos de Listeria monocytogenes*. *ALAN.* 2012, 62(1):73-78
22. Kriplani R, Thosar N, Baliga M S, Kulkarni P, Shah N, Yeluri R, *Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Various Root Canal Filling Materials Along with Aloe vera Used in Primary Teeth: A Microbiological Study*, *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 2013, 37, 257-262
23. Gawron-Gzella A, Michalak A, Kedzia A, *Antimicrobial activity of preparation Bioaron C*. *Acta Poloniac Pharmaceutica-Drug Research.* 2014, 17(5)
24. Coronado C, *Efecto sinérgico in vitro del Aloe vera con Vancomicina sobre tres cepas de Staphylococcus aureus*. Tesis para Obtener el Título de Médico Cirujano. 2015. Universidad Privada Antenor Orrego.
25. Goudarzi M, Fazeli M, Azad M, Sadat S, Mousavi R, *Aloe vera gel: effective therapeutic Agent against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from burn wound infections*, *Chemotherapy Research and Practice* 2015, 5.
26. Rosner, Bernard. *Fundamentals of Biostatistics* 8ED. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, 2015
27. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, AG. et al. *Behavior Research Methods* (2007) 39: 175.
28. Allen, D., Cooksey, C., & Tsai, B. *Spectrophotometry*, 2010.
29. Widdel, F. (2007). *Theory and Measurement of Bacterial Growth*. Bremen: University Bremen.
30. Valladares S, *I Curso Regional de Capacitación organizado por el Proyecto AQUILA II y ejecutado por Fundación Chile*, México, D.F., FAO, *Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible*, FAO, 1994.
31. World Medical Association. *World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. *JAMA.* 2013;310(20):2191-2194. doi:10.1001/jama.2013.281053.
32. Congreso De La República Del Perú, *Ley 26846: Ley General de Salud*, 1997.
33. Ministerio de Salud del Perú. PRONAHEBAS Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas - *Manual De Bioseguridad: Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre*, 2004.
34. Colegio Médico Del Perú, *Código de Ética y Deontología*. 2007.

35. Warne, Russell T. (2011). *Beyond multiple regression: Using commonality analysis to better understand R2 results*. Gifted Child Quarterly. 2011, 55: 313–318.
36. Karumari J., Vijayalakshmi K., Balasbrumanian E., *Antibacterial Activity Of Leaf Extracts Of Aloe Vera, Ocimum Sanctum And Sesbania Grandiflora Against The Gram Positive Bacteria*, Issn: 2249-622x, Asian Journal Of Biomedical And Pharmaceutical Sciences; 04(35); 2014; 60-63
37. Cowan, M.M. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clin. Microbiol. Rev. (1999), 12(4), 564-582.
38. Kametani, S.; Yuasa, A.K.; Kikuzaki, H.; Kennedy, D.O.; Honzawa, M.; Yuasa, M., *Chemical constituents of Cape Aloe and their synergistic growth inhibiting effect on Ehrlich Ascites Tumor Cells*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007, 71(5), 1220-1229
39. Geissman T A. *Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds*. In: Florkin M, Stotz E H, editors. Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents. New York, N.Y: Elsevier; 1963, 9:265
40. Kouassi, Y.; Shelef, L.A., *Inhibition Of Lysteria Monocytogenes By Cinnamic Acid: Possible Interaction Of The Acid With Cysteiny Residues*. J. Food Safety. 1998, 18(3), 231-242
41. Duke, J.A., *Handbook Of Phytochemical Constituents Of Gras Herbs And Other Economic Plants*. Boca Raton, Fl. Crc Press. 1992, 320-340
42. Baranowski, J.D.; Davidson, P.M.; Nagel, C.W.; Branen, A.L., *Inhibition Of Saccharomyces Cerevisiae By Naturally Occurring Hydroxycinnamates*. 1980, J. Food Sci. 45 (3), 592-594.
43. Mokbel, Ms.; Sukanuma, T., *Antioxidant And Antimicrobial Activities Of The Methanol Extracts From Pummelo (Citrus Grandis Osbek) Fruit Albedo Tissues*. 2006. Eur Food Res Technol. 6, 217-232
44. Waller, G.R., Magiafico, S. Ritchey, C.R., *A Chemical Investigation Of Aloe Barbadensis Miller*. Proc. Okla. Acad. Sci. 1978, 58, 69-79
45. Speranza G.; Dada G.; Lunazzi L.; Gramatica P.; Manitto P., *Ac-glycosylated 5-methylchromone From Kenya Aloe*. 1986, Phytochem. 25 (9), 2210-2222
46. Fite, A.; Dukhuizen, R.; Litterick, A.; Golden, M.; Leifert, C., *Effects Of Ascorbic Acid, Glutathione, Thiocyanate And Iodide On Antimicrobial Activity Of Acidified Nitrite*. 2003, Antimicrob. Agents. Chemother. 48 (2), 655-658
47. Frazier, W.C.; Westhoff, D.C., Food-borne Illness. 1995. En: *Food Microbiology*, 4ed, Tata Mcgraw Hill Publications. New York, America. 24, 434-435.
48. Matthew K., Abramowitz, Thomas H. Hostetter, *The Pathophysiology Of Uremia*. En: Chronic Kidney Disease, Dialysis And Transplantation, 3ed, 2010.
49. Mounyr B, Moulay S, Saad K, *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*, Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016, (6)2:71-79.
50. Prado V., *Conceptos Microbiológicos De Streptococcus Pneumoniae*. Rev Chil Infect (2001); 18 (Supl.1): 6-9

ANEXOS

ANEXO 01

SOLICITA APROBACIÓN DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO DE TESIS Y ASESOR

Señor Ms,
JORGE LUIS JARA MORILLO
Presidente del Comité de Investigación de Facultad de Medicina

Yo, Anthony Joel Neira Lázaro, identificado con ID: 000077359, alumno de la Escuela de Medicina, con el debido respeto me presento y expongo:

Que, siendo requisito indispensable para poder optar el Título Profesional de Médico Cirujano, recorro a su digno despacho a fin de que se apruebe e inscriba mi proyecto de tesis titulado “*ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE ALOE VERA COMPARADA CON CIPROFLOXACINO EN UN SEROTIPO DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*”

Así mismo informo que el docente, ZARATE ARCE, MARCO ANTONIO, será mi Asesor, por lo que solicito se sirva tomar conocimiento para los fines pertinentes.

Por lo expuesto es justicia la que espero alcanzar

Trujillo, 28 de Junio de 2016

Anthony Joel Neira Lázaro
ID: 000077359

Adjunto: Derecho de Trámite

ANEXO N° 02
CONSTANCIA DE PERMISO PARA UTILIZAR EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO



El que suscribe la presente; Coordinador del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología del Departamento de Ciencias, de la Facultad de Ciencias de la Salud; emite la siguiente:

CONSTANCIA

que el Sr. Anthony Joel Neira Lázaro, alumno de la Facultad de Medicina; ha realizado la fase experimental de su tesis titulada: **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL GEL DE *Aloe vera*, en una cepa de *Streptococcus pneumoniae***, en nuestras instalaciones del Pabellón J-307, contando con el consentimiento del coordinador, durante el periodo de Noviembre del 2016, a Enero del 2018.

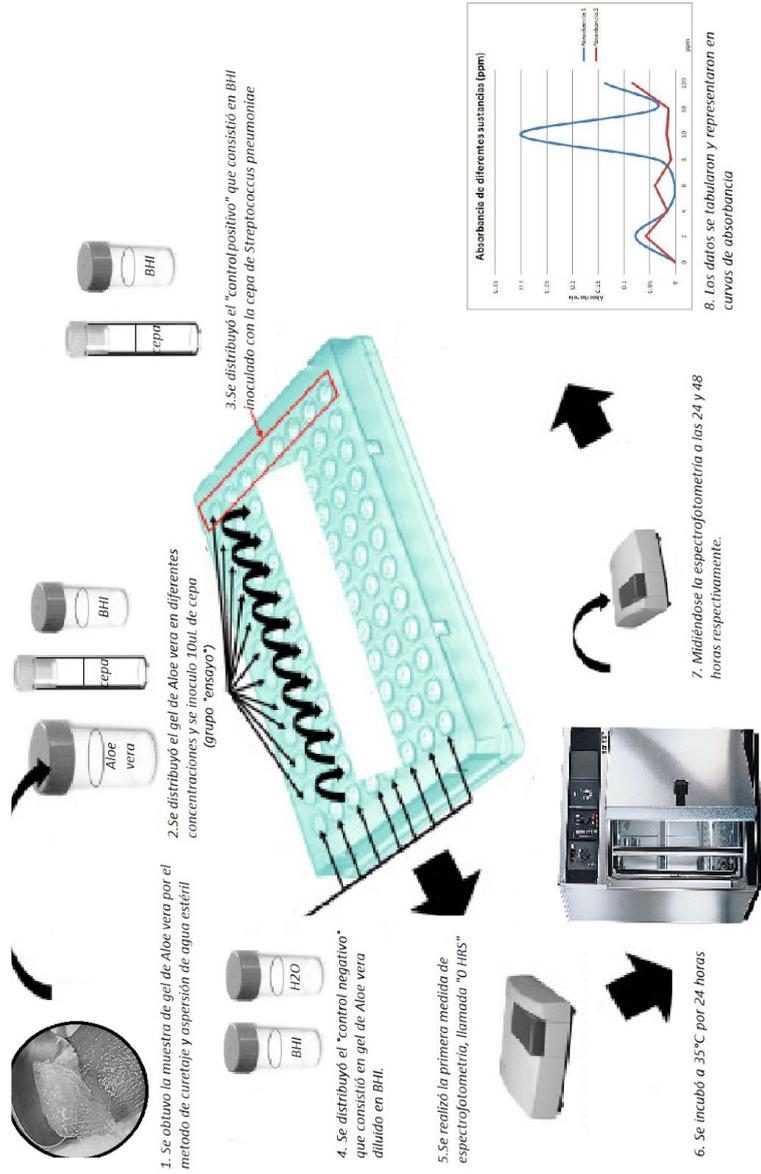
Se emite el siguiente documento, para fines que el interesado crea conveniente

Trujillo, 22 de Enero del 2018


Dr. José Guillermo Gonzales Cabeza
JEFE
UNIDAD DE CENTROS DE INVESTIGACIÓN



ANEXO N° 03 PROCEDIMIENTOS



Modificado de "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review"⁴⁹

ANEXO N° 04

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se anotarán los niveles de absorbancia, medidos 3 veces. Se usará la ficha para las medidas a las 0 y 24 horas. Grupo “control positivo” (verde), “control negativo” (celeste) y “ensayo”(morado).

BHI + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 50% 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% 1. 2. 3.
BHI + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 50% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% + CEPA 1. 2. 3.
	BHI + GEL 50% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% + CEPA 1. 2. 3.
	BHI + GEL 50% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% + CEPA 1. 2. 3.
	BHI + GEL 50% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% + CEPA 1. 2. 3.
	BHI + GEL 50% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 12.5% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 6.25% + CEPA 1. 2. 3.	BHI + GEL 3.125% + CEPA 1. 2. 3.

ANEXO N° 05
VALORES DE ABSORBANCIA A LONGITUD DE ONDA 600 NM, MEDIDOS A
LAS 0 HRS DE INCUBACIÓN DE LOS MICROTUBOS EN ESTUDIO

0.243	0.205	0.241	0.244	0.242	0.261
0.243	0.205	0.24	0.245	0.242	0.261
0.243	0.206	0.239	0.245	0.242	0.261
0.334	0.219	0.242	0.248	0.252	0.259
0.334	0.221	0.243	0.247	0.252	0.259
0.335	0.223	0.241	0.247	0.252	0.256
	0.228	0.234	0.254	0.251	0.254
	0.229	0.234	0.253	0.251	0.253
	0.23	0.234	0.253	0.25	0.253
	0.226	0.249	0.253	0.262	0.261
	0.228	0.249	0.254	0.262	0.262
	0.228	0.256	0.253	0.261	0.262
	0.231	0.235	0.245	0.262	0.265
	0.232	0.235	0.245	0.261	0.265
	0.231	0.235	0.244	0.258	0.264
	0.226	0.237	0.255	0.277	0.253
	0.228	0.237	0.256	0.276	0.254
	0.227	0.239	0.254	0.279	0.252

ANEXO N° 06
VALORES DE ABSORBANCIA A LONGITUD DE ONDA 600 NM, MEDIDOS A
LAS 24 HRS DE INCUBACIÓN A 35°C DE LOS MICROTUBOS EN ESTUDIO

0.716	0.364	0.275	0.388	0.283	0.256
0.739	0.372	0.275	0.412	0.276	0.258
0.745	0.302	0.235	0.254	0.235	0.285
0.868	0.533	0.914	0.807	0.856	0.862
0.869	0.532	0.913	0.823	0.863	0.787
0.885	0.497	0.901	0.796	0.842	0.766
	0.575	0.96	0.723	0.883	0.823
	0.579	0.958	0.725	0.885	0.784
	0.567	0.938	0.728	0.86	0.755
	0.741	0.684	0.645	0.658	0.851
	0.727	0.705	0.656	0.655	0.813
	0.703	0.695	0.668	0.67	0.783
	0.768	0.853	0.768	0.692	0.742
	0.761	0.865	0.79	0.704	0.752
	0.746	0.845	0.783	0.703	0.757
	0.567	0.84	0.674	0.728	0.74
	0.531	0.841	0.664	0.702	0.75
	0.522	0.812	0.632	0.698	0.752

ANEXO N° 07
RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN



UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

RESOLUCIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA N°009-2018-UPAO

Trujillo, 12 de Enero de 2018

VISTO, el oficio de fecha 11 de Enero del 2018 presentado por el alumno NEIRA LÁZARO, ANTHONY JOEL quien solicita autorización para realización de investigación

CONSIDERANDO:

Que por oficio, el alumno NEIRA LÁZARO, ANTHONY JOEL solicita se le de conformidad a su proyecto de investigación, de conformidad con el Reglamento del Comité de Bioética en Investigación de la UPAO.

Que en virtud de la Resolución Rectoral N° 3335-2016-R-UPAO de fecha 7 de julio de 2016, se aprueba el Reglamento del Comité de Bioética que se encuentra en la página web de la universidad, que tiene por objetivo su aplicación obligatoria en las investigaciones que comprometan a seres humanos y otros seres vivos dentro de estudios que son patrocinados por la UPAO y sean conducidos por algún docente o investigador de las Facultades, Escuela de Posgrado, Centros de Investigación y Establecimiento de Salud administrados por la UPAO

Que en el presente caso, después de la evaluación del expediente presentado por el alumno, el Comité Considera que el mencionado proyecto no contraviene las disposiciones del mencionado Reglamento de Bioética, por tal motivo es procedente su aprobación.

Estando a las razones expuestas y de conformidad con el Reglamento de Bioética de Investigación:

PRIMERO: APROBAR el proyecto de investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL GEL DE Aloe vera EN UNA CEPA DE *Streptococcus pneumoniae*"

SEGUNDO: dar cuenta al Vice Rectorado de Investigación.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.



Dr. Víctor Hugo Chanduvi Cornejo

Presidente



Dr. José González Cabeza

Secretario

ANEXO N° 08
CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN DE MATERIAL VEGETAL
HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)



UPAO Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 02-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que **Anthony Joel Neira Lázaro**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

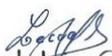
Aloe vera (L.) Burm. f. (Asphodelaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Actividad antimicrobiana *in vitro* del gel de *Aloe vera* en una cepa de *Streptococcus pneumoniae*". La muestra ha sido signada con el código HAO n° 20003.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 18 de enero de 2018

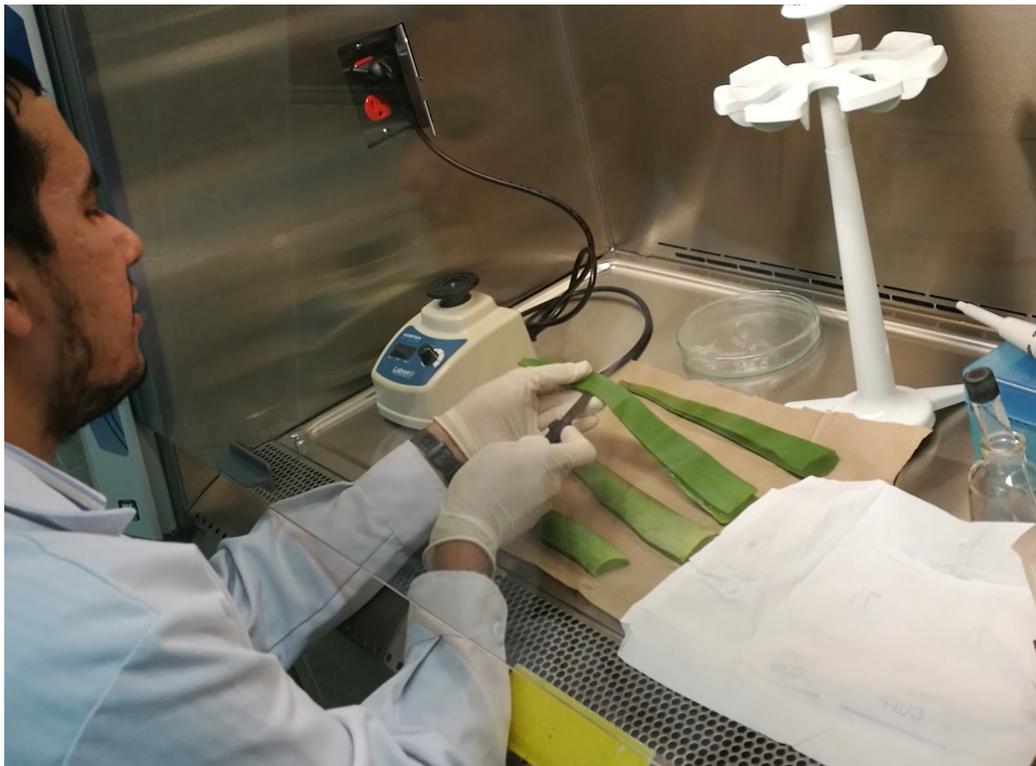


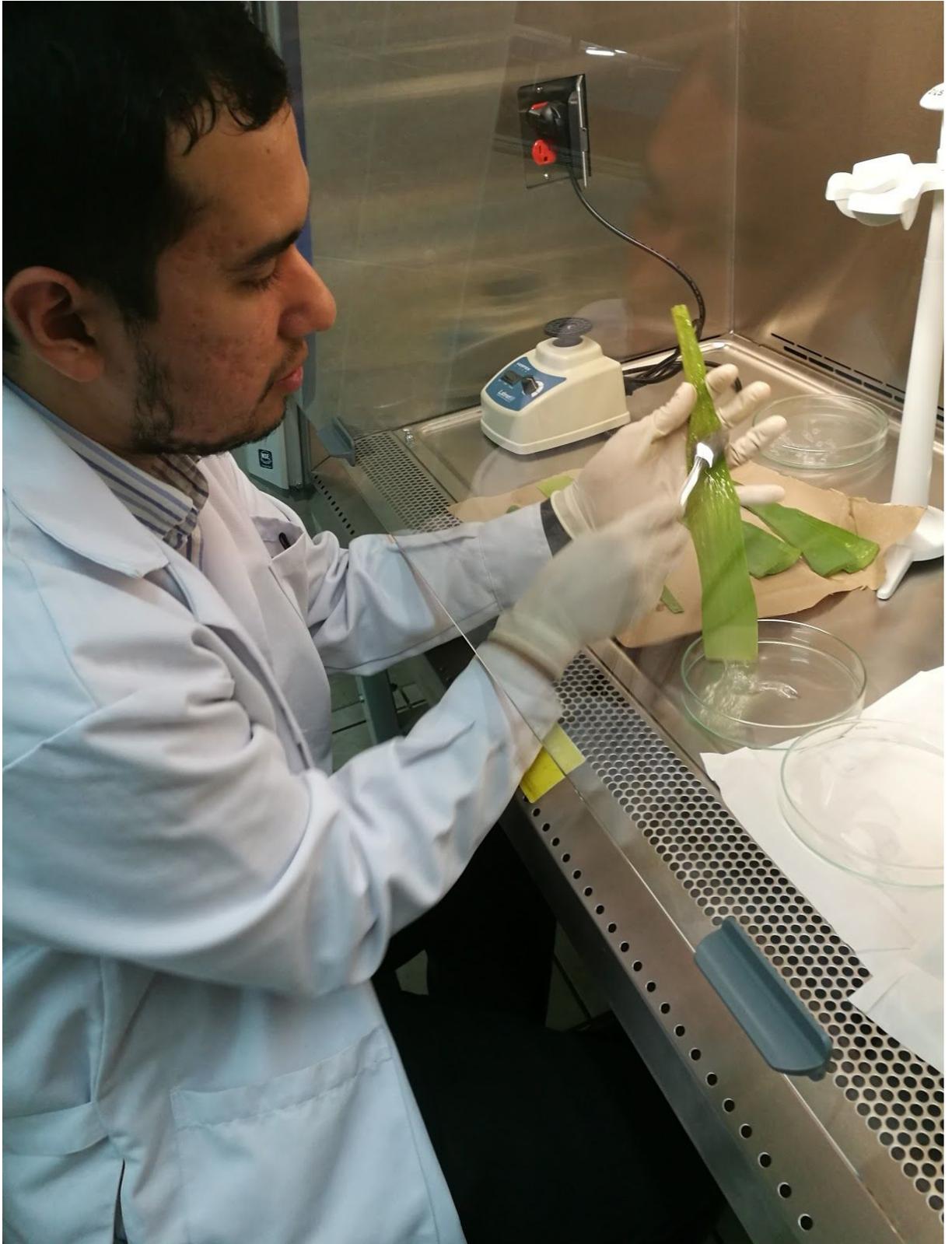

Segundo Leiva González
DIRECTOR
MUSEO DE HISTORIA NATURAL Y CULTURAL

ANEXO N° 09
PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL GEL DE ALOE VERA



1. En una cabina de UV estéril con succión de aire, se procedió a cortar los bordes espiculados de la hoja de *Aloe vera*, y luego, tangencialmente, la pulpa.



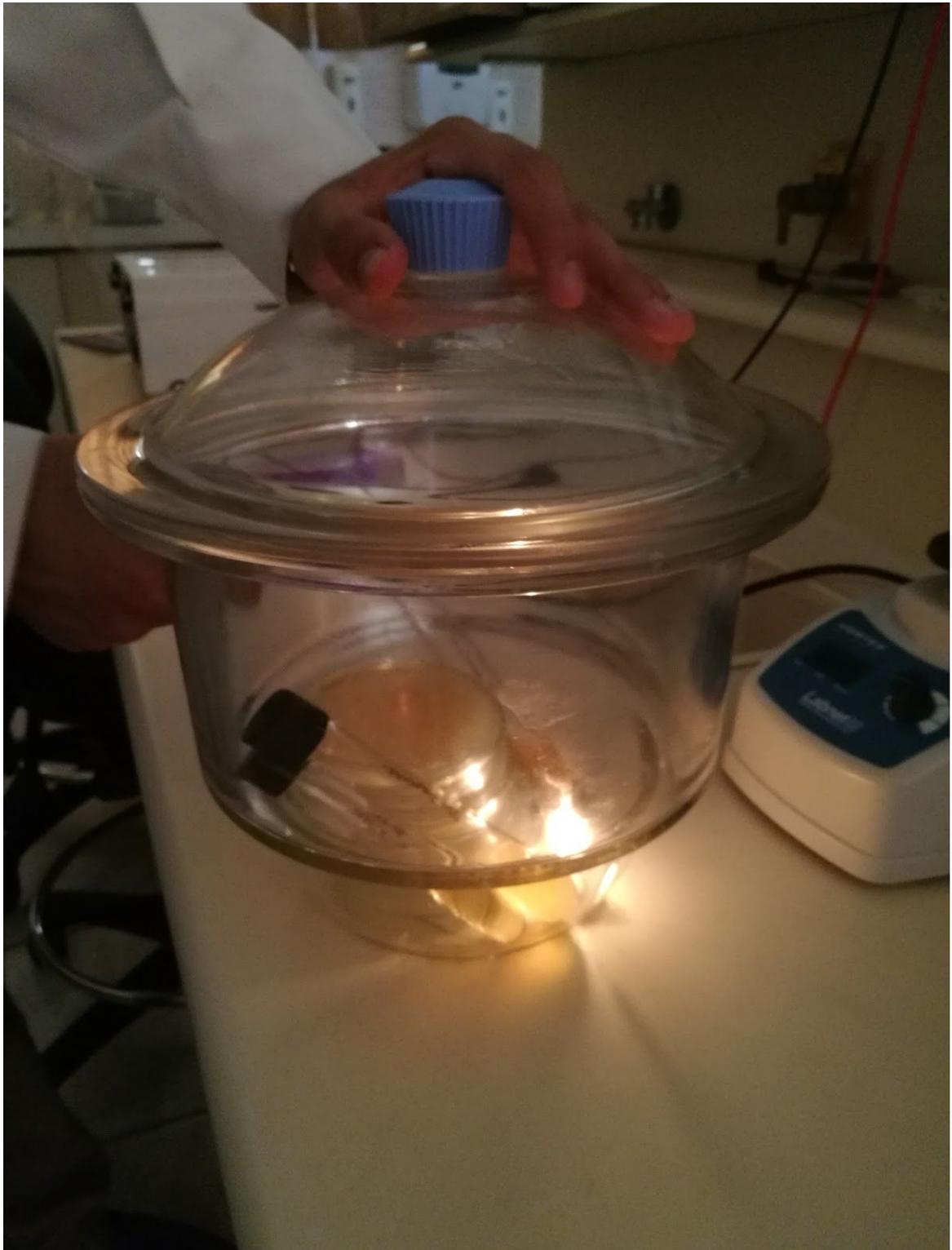


2. Usando una cuchara estéril, se obtuvo el gel de *Aloe vera* por el método de curetaje.

ANEXO N° 10
PROCEDIMIENTO PARA LA REPLICACIÓN DE LA CEPA DE
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE



1. Desde un master que consiste en un caldo Brain-Heart infusion con la cepa bacteriana, se sembró usando la técnica del estriado en agar Muller-Hinton para obtener cepas jóvenes (24 horas).



2. Se incubaron en un sistema anaerobio, debido al crecimiento facilitado del *Streptococcus pneumoniae* en 8 a 10 % de CO₂.⁵⁰