

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Laurus nobilis* “LAUREL” SOBRE
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

AUTOR: JHONATAN ALEXIS, CENTURION PAREDES

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO ZARATE ARCE

TRUJILLO - PERÚ

2017

ASESOR:

DR. MARCO ANTONIO ZARATE ARCE

DEDICATORIA

A Dios, por ser el artífice de todo este sueño
que día a día se concreta y vuelve realidad
gracias por los triunfos y por no dejarme
solo en la adversidad.

A mis padres, por la dedicación, paciencia
y esfuerzo constante, por creer en mí y en mis
ideales, sin ustedes siendo partícipes de este sueño
nada hubiera sido posible, no existen palabras y si las hay
quedan cortas para agradecer su amor, esfuerzo y confianza.

.

A mis abuelos por haber sido parte de crianza
y apoyo en momentos difíciles, gracias Pascualita
sabes eres mi brazo derecho, paño de lágrimas y al mismo
tiempo mi talón de Aquiles. Ahora ya tienes tu doctor como dices.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi luz, guía y porque a veces
cuando tiro la toalla al piso Él la toma y la
coloca en mis manos y me dice “no olvides
que esta lucha es de los dos”

A mis padres, por ser mi sustento y ejemplo,
gracias por todo el apoyo a lo largo de mi vida
y en la realización de mi tesis.

Al Dr. Marco Zarate Arce, maestro y amigo
por su apoyo, tiempo y compromiso en la
realización de esta investigación

INDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRAC.....	7
I. INTRODUCCION.....	8
II. MATERIAL Y METODO.....	15
III. RESULTADOS.....	23
IV. DISCUSION.....	29
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. RECOMENDACIONES.....	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
ANEXOS.....	39

RESUMEN

Antecedentes: Hoy en día las infecciones nosocomiales son un gran desafío debido a la resistencia desarrollada por los agentes patógenos hacia un número de fármacos ampliamente utilizados y actualmente la industria farmacéutica no tiene nuevas drogas en el mercado, se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevos principios activos en productos naturales este es el caso de *Laurus nobilis* (laurel).

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Material y método: investigación tipo experimental *in vitro*, para lo cual se empleó cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mantenida en el cepario de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Resultados: se demostró el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se realizó el estudio con tres concentraciones 25%, 50%, 100%.

El aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) posee efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En base a los resultados obtenidos durante la investigación, los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 100% tuvieron una media de 15.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es muy sensible para esta concentración, así como los halos de inhibición obtenidos a la concentración de 50% tuvieron una media de 10.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible para esta concentración mientras que los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 25% tuvieron una media de 5.1 mm comparado con la escala de Duraffourd esta es nula.

En conclusión si existe efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

ABSTRACT

Background: Nowadays pharmaceutical industry doesn't have new drugs on the market. Considerable research work has been undertaken to the search of new active substances in natural products this is the case of *Laurus nobilis* (laurel).

Objective: To demonstrate the in vitro antibacterial effect of *Laurus nobilis* "laurel" essential oil on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Materials and method: In vitro experimental investigation, for which strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used, this infections have become a big challenge due to the resistance developed by the pathogens to a big number of widely used drugs , unfortunately at this time the

strain was in the stump's cultivation of the National University of Trujillo's Medical School at the Microbiological department.

Results: The antibacterial effect of *Laurus nobilis* "laurel" essential oil on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was demonstrated, for which the research was made with three concentrations 25%, 50%, and 100%.

The *Laurus nobilis* (laurel) essential oil has in vitro antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Based on the results obtained in the investigation, aura inhibitors obtained with the concentration of 100% had a media of 15.1 mm compared to the Duraffourd scale *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is too sensitive for this concentration, as well as aura inhibitors obtained with the concentration of 50% had a media of 10.1 mm compared to the Duraffourd scale *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 is sensitive to this concentration, while aura inhibitors obtained with the concentration of 25% had a media of 5.1 mm compared to the Duraffourd scale this is null.

In conclusion, it does exist in vitro antibacterial effect of the *Laurus nobilis* "laurel" essential oil on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

I. INTRODUCCION

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 general¹.

Staphylococcus aureus son microorganismos Gram positivos y son de los patógenos más importante que afectan al ser humano. Produce un amplio espectro de infecciones, desde leves, que involucran la piel, hasta graves, como bacteriemia y sepsis que pueden llevar a la muerte, forma parte de la flora residente de manos, periné y nariz, convirtiendo a la persona en portadora².

La prevalencia de este patógeno ha sido estudiada en diferentes medios y en Latinoamérica³ la tasa de portadores nasales alcanza los 28,6%, así mismo otros trabajos han reportado la prevalencia de portadores de este microorganismo en los estudiantes de medicina. Rodríguez C, et al⁴ (2013) quien recolectó muestras nasales de estudiantes medicina de la Universidad Complutense de Madrid, que se encontraban en la facultad antes de iniciar sus prácticas en Hospitales, luego de 3 años se volvió a tomar muestras nasales a la misma promoción, encontrando una tasa del 27% en alumnos de preclínicas.

López S, et al⁵ (2013), realizó un estudio transversal de colonización nasal por *S. aureus* en estudiantes de medicina de tercero y sexto curso adscritos a un Hospital español, en total tomó muestras en 140 estudiantes de medicina, encontrando un 39,3% de estudiantes colonizados por *S. aureus* y de ellos, el 2,1% fueron meticilino resistentes⁵.

Weidenmaier C, et al⁶, realizó una revisión bibliográfica de artículos epidemiológicos alemanes respecto a la colonización nasal por *S. aureus*, concluye que aproximadamente el 20% de la población humana sana está colonizada persistentemente en la cavidad nasal con *Staphylococcus aureus*, y un 30% presenta colonización intermitentemente.

Este problema se transporta hacia el ambiente de labores, es así que las infecciones intrahospitalarias por *S. aureus* han sobrepasado el 50% de prevalencia en la mayoría de

los países de Latinoamérica y, el número de infecciones adquiridas en la comunidad está en aumento⁷.

Montalvo R⁷, et al (2009), realizaron un estudio descriptivo transversal sobre trabajadores de salud asistenciales de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima-Perú, reportando un 17.1% de aislamientos positivos para *S. aureus* siendo más frecuente en médicos y la prevalencia de SARM fue de 7.3%, pero fue superior en enfermeras.

Arteaga, L, et al⁸ (2016), realizaron un estudio descriptivo, con muestras nasales y frotis de piel a 30 trabajadores de salud de un hospital colombiano, ellos descubrieron que el 26,7 % de trabajadores estuvieron colonizados por *S. aureus*.

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. Si bien el reporte de resistencia a meticilina en Perú, ocurre principalmente en el ambiente intrahospitalario⁹.

Ante ello, la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas 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.

Diversos ensayos han mostrado que los extractos y aceites obtenidos de plantas tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas, entre otros¹⁰. Ejemplos como *Tropaeolum majus* (Mastuerzo), que mostró actividad antiviral, antimicrobiana y actividad antitumoral¹¹. De forma similar, los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/ml causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*¹², otros trabajos se centraron en otras especies botánicas, hallando diferentes efectos como el de *M. charantia* (achochilla) que ejerció actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*¹³, el extracto etanólico de *A. absinthium*¹⁴ demostró ser antibacteriano frente a *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. Incluso agentes pro-bióticos como el *Lactobacillus spp*, han mostrado efecto bactericida frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923^{15,16}.

Dentro de esta gran lista, se encuentra *Laurus nobilis* o Laurel, que es un árbol de hoja perenne cultivado en muchas regiones cálidas del mundo, particularmente en los países mediterráneos. Las hojas secas y su aceite destilado con vapor poseen un sabor picante y se usan ampliamente para condimentar muchos productos alimenticios, tales como carnes, sopas, embutidos y confesionarios^{17, 18}. *Laurus nobilis* es un arbusto grande o pequeño árbol de hasta 5-10 mts de alt.; copa densa; con varios troncos lisos; ramillas glabras y lustrosas. Hojas aromáticas; pecíolos de 5-13 mm long, usualmente purpúreos; lámina 4-13 x 1,5-4,5 cm, lanceolada o elípticolanceolada, entera, verde oscuro en el haz, algo más pálida en el envés; base cuneada; ápice agudo, cuspidado o acuminado¹⁷.

Se han dedicado muchos estudios a la composición química del aceite de hoja de laurel y en algunos de ellos se ha afirmado que existe una cierta cantidad de varianza natural en su composición química dependiendo del origen geográfico de la especie¹⁹. El “laurel”, es una especie muy cultivada desde la más remota antigüedad, como ornamental, planta culinaria y perfumífera; además presenta un valor mitológico en los pueblos del Mediterráneo²⁰.

La utilidad botánica de esta especie es muy variable, depende de la parte de la planta utilizada, de la concentración y del método de extracción de sus componentes. Su actividad de cicatrización de la herida, fue ensayado por Nayak S, et al²¹ (2006), mediante extractos acuosos en ratas, creación de modelos de herida, encontrando que en los animales tratados con *Laurus nobilis*, la tasa de contracción de la herida y el peso del tejido de granulación fueron moderadamente altos, además en la histología se observaron mayor número de células inflamatorias²¹.

También se ha observado que posee actividad neuroprotectora, Ham A, et al²² (2011), investigaron los efectos de la fracción de n-hexano de las hojas de *Laurus nobilis* sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por dopamina y la apoptosis en células en líneas celulares humanas, demostrando que la fracción de hexano y sus compuestos principales inhibieron significativamente la generación de ROS y mostró ser neuroprotectora, mediante un mecanismo antioxidativo²².

Su actividad antioxidante fue evaluada por un equipo de investigadores dirigidos por Simic M, quienes en el 2003 estudiaron la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de frutos, corteza y hojas de *Laurus nobilis* encontrando que este efecto es posiblemente al componente terpénico y al n-hexano de la planta²³

Elmastas M, en el 2006 utilizó el extracto acuoso y etanólico del laurel reportando que ambos extractos mostraron una fuerte actividad antioxidante mediante la inhibición de la peroxidación de lípidos, además demostraron que posee efecto reductor, captador de radicales libres y una moderada actividad de eliminación de quelantes²⁴.

Estos trabajos son la secuela de lo aportado en la utilización del laurel como antiulceroso, para ello Afifi F, et al, utilizó extracto acuoso de las semillas de *Laurus nobilis* en un modelo experimental de úlcera gástrica inducida por etanol en ratas, demostrando efecto protector con extractos acuosos al 20 y 40 por ciento²⁵.

El aceite esencial de hoja de *Laurus nobilis* ha mostrado un efecto analgésico y un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis en el edema inducido por formalina en las dosis antiinflamatorias²⁶. El extracto etanólico y acuoso obtenido de hojas y semillas de *Laurus nobilis*, también se estudiaron utilizando un modelo de edema en ratones, y sin inducir ningún daño gástrico para actividad antiinflamatoria, el extracto de etanol mostró actividad antiinflamatoria prominente²⁷, así mismo también ha demostrado su efecto inmunoestimulante en ratas, mediante el aumento de la actividad fagocítica²⁸.

Los ensayos antimicrobianos de esta planta, son escasos, sin embargo se le ha probado desde hace varias décadas. Loizzo M, et al²⁹ (2008), determinó la actividad antiviral del aceite esencial de *Laurus nobilis in vitro* frente a Virus Herpes simple, el aceite mostró actividad viricida a una concentración de 120 µg/ml, encontrándose principalmente beta-o-cimeno, cineol, alfa-pineno y beta-pineno como los principales constituyentes²⁹.

La hoja de laurel se ha utilizado como medicina herbaria y tiene actividad farmacológica³⁰.

Por otro lado, la actividad antifúngica de *Laurus nobilis* fue evaluada por Corato D, et al³⁰, mediante la realización de un modelo *in vitro* con cepas de hongos patógenos,

ensayando aceite esencial a concentraciones diferentes (50, 125 y 250 µg/ml), observándose que la mayor actividad antifúngica para el extracto obtenido de *L. nobilis* contra el hongo *Botrytis cinerea* Persse fue a una concentración de 250 µg/ml³⁰.

Su actividad antibacteriana se ha ensayado con aceite esencial de sus hojas, aceite de semilla³² y extracto etanólico de sus semillas^{33, 34}. Ozcan B, et al (2010), comparó el aceite esencial y el extracto etanólico de semillas de *Laurus nobilis*, obteniendo como resultado que el extracto etanólico de semilla fue la que demostró una actividad antibacteriana más eficaz comparado con el resto³⁵.

Ensayos más recientes, presentan a las hojas como el principal agente antimicrobiano, Días M, et al³⁶ (2014), utilizó extracto etanólico y acuoso de hojas de laurel procedentes de Portugal, mostrando actividad bactericida a 4mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, y 12 mg/mL frente a *E. coli*, siendo el extracto etanólico frente al acuoso el que presentó mayor actividad bactericida frente a ambas bacterias³⁶.

Fukuyama N, et al³⁷ (2011), aisló sesquiterpenos de extractos acuosos de hojas de *Laurus nobilis* L, quienes mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias oportunistas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) y hongos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*). Obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias a 31 ng/ml.

Julianti E, et al³⁸ (2012), aislaron diez sesquiterpenoides de hojas de *Laurus nobilis* L., mediante análisis espectroscópico, en este trabajo se reporta que 8 de los 10 sesquiterpenoides de *Laurus nobilis* muestran actividad antimicrobiana mediante el aumento en la actividad fagocítica y antioxidante, así mismo *in vitro*, las concentraciones mínimas inhibitorias frente a *S. aureus* variaron entre 40 a 1000 ng/mL. , utilizando concentraciones inhibitorias mínimas de 31 hasta 1000 g/ml.

Finalmente, otros autores han centrado su estudio en la comprensión de los metabolitos encargados de las diversas acciones del laurel. Kovacevic N³⁹, et al, evaluaron el aceite esencial de plantas de Suecia y está presentó linalol como su principal constituyente, seguido de cineol, alpha acetato y terpenos³⁹.

Por su parte, Lira D, et al⁴⁰ (2009) encontraron cineol como el componente principal del aceite esencial de hojas de laurel, procedente de Argentina, obtenidos en diferentes meses del año, también encontraron linalol, sabineno y alpha de etilo.

Días M, et al, (2014) sostienen que en el análisis de aceite volátil de hojas frescas de *nobilis L.* presentan cineol (40,91%) además de otros monoterpenos como α -pineno (5,82%), β -pineno (4,55%), sabineno (6,92%), limoneno (2,10%), linalol (1,29%), entre otros⁴¹.

En nuestro país, *Staphylococcus aureus* representa un grupo de patógenos con alto potencial dañino para la salud, sobretodo porque se encuentra colonizando al personal de salud de los hospitales, estudiantes de medicina y otros profesionales de la salud, Ante esto, tener nuevas alternativas naturales es tarea de los profesionales de la salud, para ello resulta importante realizar estudios básicos y preliminares que puedan determinar la existencia de posibles efectos antimicrobianos de cierta especie botánica.

1. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus aureus causa infecciones importantes en el ser humano y estas conllevan riesgos potencialmente peligrosos para la vida humana. Además este agente presenta una alta prevalencia como colonizador en personas comunes y quienes están en contacto con hospitales, como enfermeras, trabajadores de salud, médicos y estudiantes. En los últimos años, esta cifra es cada vez mayor, lo que puede significar un aumento en las enfermedades por este agente.

Hoy en día existe un creciente campo en cuanto a la investigación de productos naturales y la actividad que estos presenten frente a distintos microorganismos.

Siendo necesario el continuar la búsqueda de diferentes formas de prevención y tratamiento de las enfermedades, para lo cual se propone este estudio experimental que analizará el efecto antimicrobiano del aceite esencial *Laurus nobilis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* con el fin de brindar información a posteriores trabajos y así se puedan desarrollar mejores alternativas en cuanto al tratamiento de las enfermedades que este agente pueda causar, para lo cual se realiza la siguiente pregunta ¿Existe efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

2. PROBLEMA

Existe efecto antibacteriano *in vitro* el aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina y vancomicina?

3. HIPÓTESIS

H₀. El aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” no tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina y vancomicina.

H₁. El aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina y vancomicina.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* de las concentraciones del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la susceptibilidad *in vitro* por halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Comparar el efecto antibacterino *in vitro* del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” frente a oxacilina y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 POBLACIÓN

- **POBLACIÓN OBJETIVO:** cepa de *Staphylococcus aureus*.
- **POBLACIÓN ACCESIBLE:** cepa de *Staphylococcus aureus*.

2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 viable conservada entre 0 a 5 °C

2.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no viable.

2.4 MUESTRA

2.4.1 UNIDAD DE ANÁLISIS

Halo de inhibición con cepa de *Staphylococcus aureus* y *Laurus nobilis*.

2.4.2 UNIDAD DE MUESTREO

Cepa de *Staphylococcus aureus*, obtenida del laboratorio de microbiología de la universidad nacional de Trujillo.

2.4.3 TAMAÑO MUESTRAL

El número de muestra se calcula con la siguiente fórmula estadística:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

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

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ para $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$ para $\beta = 0.20$

$S = 0.8 (X1 - X2)$, valor asumido por haber escasos estudios previos

Siendo “n” el número de repeticiones a efectuar en cada investigación, por lo tanto se requieren 10 repeticiones para cada concentración del aceite esencial de hojas de *Laurus nobilis*; Igual número de repeticiones para cada grupo control.

10 Repeticiones a una concentración de 25%.

10 Repeticiones a una concentración de 50%.

10 Repeticiones a una concentración de 100%.

2.6 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio será de tipo experimental.

2.6.1 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Independiente: Concentración de aceite esencial de *Laurus nobilis*:

Será el aceite esencial de *Laurus nobilis*, expresado en mg/mL y colocado en placas mediante la forma de discos de inhibición a concentraciones de 25, 50 y 100%.

Dependiente: Efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus*:

Capacidad para evitar la reproducción o producir la muerte del organismo en condiciones experimentales, determinado mediante la medición del crecimiento del microorganismo en placas Petri y comparado por halos de inhibición.

2.7 DEFINICIONES OPERACIONALES DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	Tipo y Escala
INDEPENDIENTE			
Concentración del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	Aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> al 25, 50 y 100%, obtenido en el laboratorio.	Concentración al 25, 50 y 100%. SI: logra efecto. No: Sin efecto	Cualitativa Nominal dicotómica
DEPENDIENTE			
Efecto inhibitorio sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	Efecto evidenciado mediante halo de inhibición en los cultivos de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Diámetros de Halo inhibitorio. 3 Sensible 4 Intermedio 5 Resistente	Cualitativa Ordinal.

2.8 PROCEDIMIENTO

Se solicitó la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego para ejecutar el proyecto y utilizar el Laboratorio de Microbiología y Parasitología (ANEXO 01).

El aceite esencial de *Laurus nobilis* fue comprado de la empresa FITO PERÚ ® (ANEXO 9) a concentración de 100% obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua. almacenado en frasco ámbar y refrigerado a 4°C hasta su uso. La preparación de las concentraciones se realizó en el laboratorio de farmacia de la Universidad Nacional de Trujillo para estas se utilizó aceite Tween estandarizado.

Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Laurus nobilis* “Laurel”

Las concentraciones se prepararon según el siguiente cuadro:

Volumen de aceite	Volumen de Tween 80	Volumen final	Concentración (%)	Concentración (mg/mL)
0.75mL	2.25mL	3.0 mL	25	230 mg/mL
1.50 mL	1.50mL	3.0 mL	50	460 mg/mL
3.0 mL	-	3.0 mL	100	920 mg/mL

Luego, se colocaron cada una de las concentraciones en frascos de vidrio cubiertos con papel de aluminio para protegerlos de la luz. Posteriormente fueron colocados a refrigeración a 4 °C, hasta la realización del análisis microbiológico.

La cepa de *Staphylococcus aureus* se obtuvo del cepario de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo (cepa aparentemente procedente y estandarizada como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Una vez obtenida la cepa, se la reactivó utilizando caldo nutritivo y luego se conservó en agar soya tripticasa, hasta la realización del trabajo experimental.

Se preparó el inóculo en solución salina (NaCl 0.9%) de las colonias aisladas seleccionadas de una placa de agar después de 24 horas de incubación (en un medio enriquecido, el agar soya tripticasa). Se ajustó la turbidez de la suspensión al equivalente 1.5×10^8 UFC/ml al tubo estándar 0,5 de la escala de McFarland.

Para la preparación de los discos de inhibición se utilizó papel whatman, el que fue cortado con perforador, todos los discos fueron esterilizados en una placa Petri, luego fueron embebidos en las distintas concentraciones por un tiempo de 2 horas tras el cual se los seco en el horno a 37°C por 8 horas.

En la determinación del **antibiograma** se preparó el medio Mueller Hinton que se distribuyó en placas petri con una altura de 4 mm. Y fueron dejadas por 24 h en refrigeración, tras este tiempo se las seco en el horno a 37°C por 10 minutos, luego en cada placa se realizó el sembrado con un hisopo estéril, el cual fue embebido en el tubo del inóculo y a una distancia de 10cm de la llama del mechero, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando cada placa 30° se sembraron 15 placas petri, Luego se colocaron los discos de Vancomicina 30ug, oxacilina 10ug y con una pinza estéril los discos embebidos en aceite esencial de *laurus nobilis* a distintas concentraciones, cada uno colocado a distancia de 25mm entre discos y de los bordes de las placas, sobre la superficie de las placas sembradas con *S. aureus* en un tiempo menor de 15 minutos.

Estas placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, para luego realizar la lectura de las mismas y la medición del diámetro de cada uno de los halos en (mm) colocando una regla sobre el reverso de la placa, cada diámetro de los controles fue comparando con las tablas estandarizadas (Anexo 02).

Mientras que cada diámetro obtenido de los halos de inhibición de *laurus nobilis* fue clasificado según la escala de Duraffourd: escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio, según el tamaño del diámetro de cada halo. (ANEXO 03)

Para determinar la **concentración mínima inhibitoria (CMI)** se prepararon 3 tubos por cada dilución del aceite esencial de *Laurus nobilis* a las concentraciones de 25 (230mg/ml), 50 (460mg/ml) y 100% (920mg/ml). A su vez, se utilizó un grupo control; el grupo control con 0.2 ml de inóculo y 0.8 ml de caldo peptonado, al 100% 0.2 ml de inóculo y 0.8 ml de aceite esencial al 100%, al 50% 0.2 ml de inóculo más 0.4 ml de caldo peptonado y 0.4 ml de aceite al 50%, al 25% 0.2 ml de inóculo más 0.6 ml de caldo peptonado y 0.2 ml de aceite al 25%. Luego los tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas. Tomándose lectura visual según ausencia o presencia de la turbidez.

Para determinar la **concentración mínima bactericida (CMB)** se tomó 0.1 ml de un tubo por cada concentración y se sembró en agar Mueller Hinton y dejó incubar a 37°C por 24 h posteriormente se hizo la lectura de las placas haciendo conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Considerando como CMB a la menor concentración en la que no se logre observar UFC. Sin poder determinar la CMB debido al crecimiento de UFC en las placas Petri con las concentraciones de 25 y 50% de aceite esencial de *laurus nobilis* (laurel).

2.9 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Luego la recolección de datos (ANEXO 05), estos fueron ordenados en Excel 2013 siendo luego analizados con el programa SPSS versión 22.

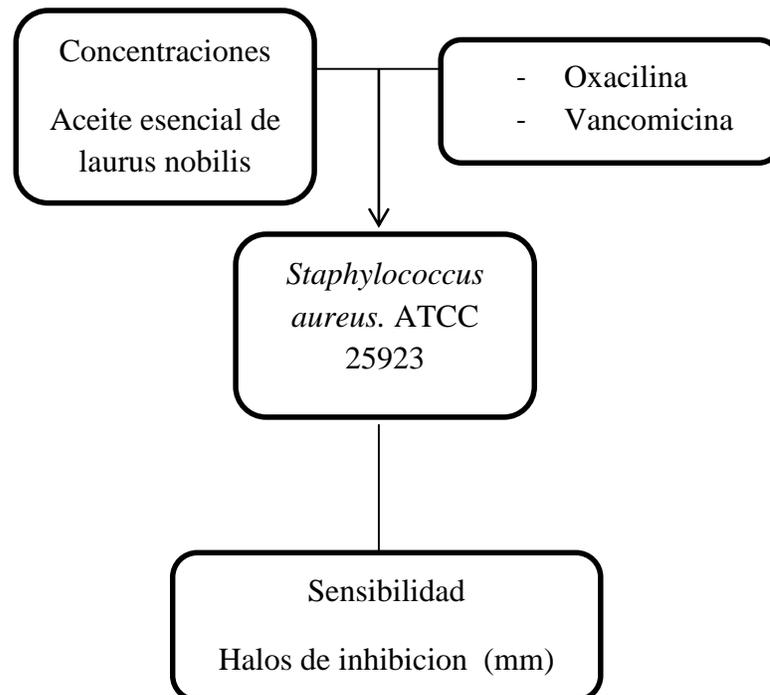
Estadística descriptiva: para analizar la información se construyó tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.

Estadística analítica: para determinar el efecto in vitro (Antibiograma) del aceite esencial de *laurus nobilis*, se utilizó el análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto antibacteriano analizado por el halo de inhibición, luego se hizo una prueba de comparaciones múltiples: prueba de Duncan, ambas con un nivel de significancia alfa 0.05%. Para evaluar la comparación del promedio de las UFC, por la falta de cumplimiento de requisitos para la prueba F del Análisis de varianza, se hizo uso de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y como prueba post análisis de

comparación por parejas de grupos a la prueba de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni, con el mismo criterio de significación.

Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS versión 22.0.

Estadígrafo propio del estudio:



2.10 ASPECTOS ÉTICOS

Se solicitó aprobación previa para la ejecución del proyecto de investigación por parte de la autoridad competente de la Universidad Privada Antenor Orrego, así mismo se solicitó los permisos para el uso de las instalaciones de dicha institución en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, Finlandia, junio 1964 y modificada por la Asamblea Medica Mundial en Tokio, enero 2004.⁴³ Para la realización de la investigación se tuvo en cuenta las medidas de bioseguridad de los investigadores y se mantuvieron los principios éticos y deontológicos internacionales y nacionales⁴⁴.

En el presente trabajo se respetó el principio ético adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú titulado: “Del trabajo de investigación”, específicamente el 6 Art. 48° donde habla de la veracidad en la publicación de los resultados obtenidos en el estudio.⁴⁵

III. RESULTADOS

Tabla 1

Diámetro del halo obtenido in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” (ANTIBIOGRAMA) a concentraciones del 25%, 50% y 100% sobre *Staphylococcus aureus*.

Indicador	Grupo de estudio: Concentración		
	Laurus nobilis 25 %	Laurus nobilis 50%	Laurus nobilis 100 %
Media (mm)	5.1	10.1	15.1
Desviación estándar (mm)	0.9	1.4	0.9
Prueba para medias+	F = 219.9 p < 0.05		
Comparación entre grupos++	A	B	C

+ : Prueba F del análisis de varianza

+ +: Dos grupos con la misma letra no difieren estadísticamente según prueba de Duncan.

Tabla 1A

Escala de Duraffourd comparada con el efecto in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” a concentraciones del 25%, 50% y 100% sobre *Staphylococcus aureus*.

Escala Duraffourd	Grupo de estudio: Concentración					
	Laurus nobilis 25 %		Laurus nobilis 50 %		Laurus nobilis 100 %	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Nula (N)	10	100.0	0	0.0	0	0
Sensible (S)	0	0.0	10	100.0	3	30.0
Muy sensible (MS)	0	0.0	0	0.0	7	70.0
Sumamente sensible (SS)	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Total</i>	10	100.0	10	100.0	10	100.0

- ❖ Según el promedio de los diámetros obtenidos de los halos de inhibición, *Staphylococcus aureus*.es (MS) a la concentración de 100%, (S) a la concentración de 50% y de respuesta (N) a la concentración de 25%

Tabla 2

Diámetro de halo in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” a concentraciones del 25%, 50%, 100%, oxacilina, y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*.

Indicador	Grupo de estudio: Concentración				
	Laurus nobilis 25 %	Laurus nobilis 50%	Laurus nobilis 100 %	Oxacilina 10 ug	Vancomicina 30 ug
Media (mm)	5.1	10.1	15.1	22.8	19.0
Desviación estándar (mm)	0.9	1.4	0.9	1.0	2.4
Prueba F para medias+	F = 509.1 p < 0.05				
Comparación entre grupos++	a	b	c	d	e

+ : Prueba F del análisis de varianza

++: Dos grupos con la misma letra no difieren estadísticamente según prueba de Duncan.

Tabla 2A

Escala de Duraffourd comparada con el efecto in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” a concentraciones del 25%, 50% 100%, oxacilina y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Escala Duraffourd	Grupo de estudio: Concentración									
	Laurus nobilis 25 %		Laurus nobilis 50%		Laurus nobilis 100 %		Oxacilina		Vancomicina	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Nula (N)	10	100.0	0	0.0	0	0	0	0.0	0	0.0
Sensible (S)	0	0.0	10	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Muy sensible (MS)	0	0.0	0	0.0	10	100.0	0	0.0	5	50.0
Sumamente sensible (SS)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	10	100.0	5	50.0
<i>Total</i>	10	100.0	10	100.0	10	100.0	10	100.0	10	100.0

- ❖ De acuerdo a la sensibilidad obtenida según la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* es (MS) a concentración de 100%, a oxacilina es (SS), mientras que a vancomicina el 50% fue (MS) y 50% (SS).

Tabla 3

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Aceite Esencial de *Laurus nobilis* sobre *Staphylococcus aureus*.

Concentración del aceite de <i>Laurus nobilis</i>	Turbidez		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
25 %	Si	Si	Si
50 %	Si	Si	Si
100 %	No	No	No
Control	Si		

- ❖ No se pudo determinar la (CMI) debido a la presencia de turbidez en los tubos de ensayo a las concentraciones de 25 y 50%.

Grafico 1

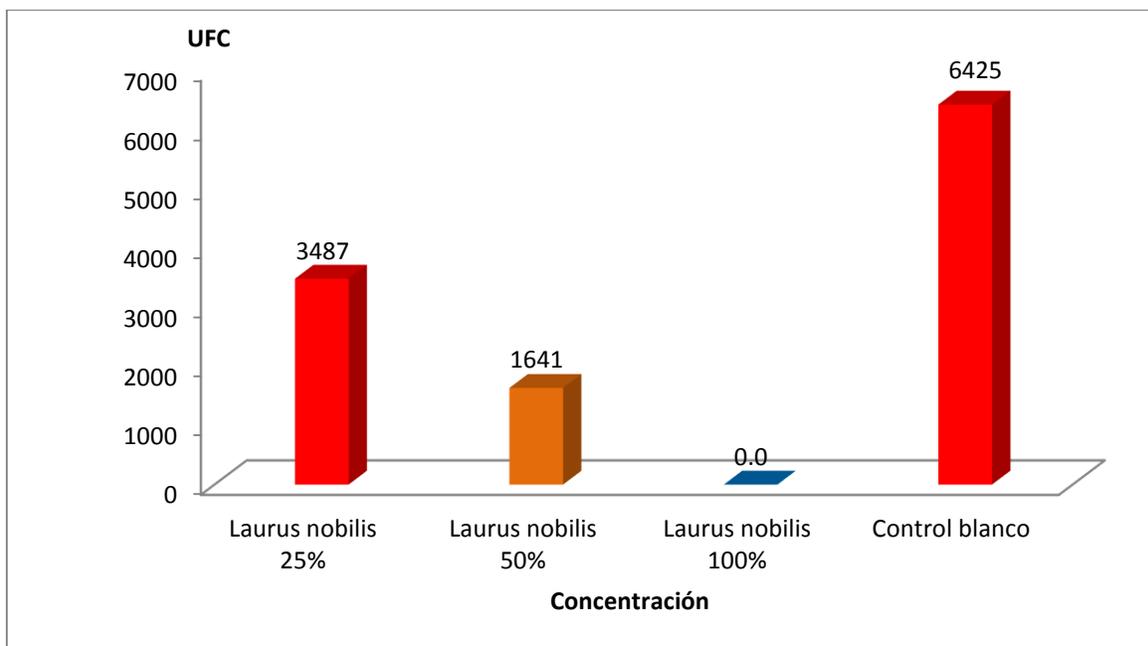


Figura 1. Concentración mínima bactericida in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” a concentraciones del 25%, 50%, 100% y Grupo control en blanco, sobre *Staphylococcus aureus* medido en unidades formadoras de colonias.

- ❖ No se puede determinar la (CMB) ya que hay crecimiento de UFC a las concentraciones de 25 y 50%.

IV. DISCUSION

Dentro de la práctica médica uno de los más grandes desafíos al que no solo se enfrenta el medico sino también las drogas del mercado es el abordaje terapéutico de las infecciones nosocomiales debido a la resistencia desarrollada por los agentes patógenos hacia un número de fármacos amplia y frecuentemente utilizados. Ante la ausencia de nuevas drogas en el mercado en los últimos años múltiples investigaciones han apuntado al estudio de productos naturales y su efecto antibacteriano sobre distintos patógenos, tal como el uso de aceites esenciales. En el presente trabajo se evaluó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La resistencia antimicrobiana genera mayor morbimortalidad así como una elevación en los costos de salud, por lo cual es considerada un problema serio en todo el mundo. 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 contención⁹.

Debido a esta problemática diversas especies de plantas tradicionales empleadas en la medicina herbal como una posible alternativa para el manejo de problemas infecciosos¹².

El Perú posee una gran diversidad de plantas con uso medicinal con un escaso conocimiento científico, de ahí que en este estudio se seleccionó una planta para la determinación de su efecto antibacteriano y así contribuir a su conocimiento y en el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos que sean tanto eficaces como seguros.

Sumados en la búsqueda de nuevos compuestos de productos naturales y su utilización para combatir procesos infecciosos buscamos demostrar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Siendo este uno de los patógenos más frecuente encontrado en infecciones y uno de los que más ha desarrollado mecanismos de resistencia.

Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente proveniente de la comunidad (SAMR) 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.¹ El 50 % de los *S. aureus* aislados de hemocultivos de varios hospitales de Lima en el periodo 2008-2009 fueron resistentes a meticilina (García, datos no publicados)⁹.

Además, son resistentes a múltiples antibióticos, lo que deja como alternativas terapéuticas el empleo de antibióticos de espectro más reducido como la vancomicina, teicoplanina y el linezolid.⁸ En la última década, la prevalencia de este organismo ha aumentado considerablemente en la población general¹.

De las distintas formas de obtención de productos naturales una de las que ha ido ganando popularidad en su estudio es el uso de aceites esenciales, motivo por el que hemos probado el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos. Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida¹¹.

Los ensayos antimicrobianos de esta planta, son escasos, sin embargo se le ha probado desde hace varias décadas. Loizzo M, et al²⁹ (2008), determinó la actividad antiviral del aceite esencial de *Laurus nobilis in vitro* frente a Virus Herpes simple, el aceite mostró actividad viricida a una concentración de 120 µg/ml, encontrándose principalmente beta-o-cimeno, cineol, alfa-pineno y beta-pineno como los principales constituyentes²⁹.

Su actividad antibacteriana se ha ensayado con aceite esencial de sus hojas, aceite de semilla³² y extracto metanólico de sus semillas^{33, 34}. Ozcan B, et al (2010), comparó el aceite esencial y el extracto etanólico de semillas de *Laurus nobilis*, obteniendo como resultado que el extracto etanólico de semilla fue la que demostró una actividad antibacteriana más eficaz comparado con el resto³⁵.

En el estudio realizado hemos demostrado que el aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) posee efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En base a nuestros resultados obtenidos durante la investigación, los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 100% tuvieron una media de 15.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es muy sensible para esta concentración, así como los halos de inhibición obtenidos a la concentración de 50% tuvieron una media de 10.1 mm comparado con la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible para esta concentración mientras que los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 25% tuvieron una media de 5.1 mm comparado con la escala de Duraffourd esta es nula. A través de las pruebas estadísticas se obtuvo un valor de $p < 0.05$ lo que da validez y significancia estadística a los resultados. Al 25% tiene una concentración de 230 mg/dl, concentración sin efecto antibacteriano in vitro. Siendo al 50%, 100% con concentraciones de 460 mg/dl y 920 mg/dl respectivamente concentraciones a las que se encontró efecto antibacteriano in vitro.

No se pudo determinar la (CMI) debido a la presencia de turbidez tomado de la lectura visual de los tubos de ensayo a las concentraciones de 25 y 50%.

La concentración mínima bactericida (CMB) in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis* "laurel" a concentraciones del 25%, 50%, 100% y Grupo control en blanco, sobre *Staphylococcus aureus* medido en unidades formadoras de colonias. No se pudo ya que hay crecimiento de UFC a las concentraciones de 25 y 50%.

Ensayos recientes, presentan a las hojas como el principal agente antimicrobiano, Días M, et al³⁶ (2014), utilizó extracto etanólico y acuoso de hojas de laurel procedentes de Portugal, mostrando actividad bactericida a 4mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, y 12 mg/mL frente a *E. coli*, siendo el extracto etanólico el que presentó mayor actividad bactericida frente a ambas bacterias³⁶.

El efecto antibacteriano in vitro demostrado en la presente investigación se fundamenta en la presencia de los distintos principios activos que posee *Laurus nobilis* (laurel) principios que poseen actividad antimicrobiana, como sesquiterpenoides compuestos no

saturados formados por carbono, hidrogeno y oxigeno de estructura no aromatica, uno de los principales encontrados en el aceite esencial *Laurus nobilis* (laurel) el cineol cuyo mecanismo de acción aún no está bien descrito pero está relacionado por inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no especificas con proteínas.

Días M, et al, (2014) sostienen que en el análisis de aceite volátil de hojas frescas de *nobilis L.* presentan cineol (40,91%) además de otros monoterpenos como α -pineno (5,82%), β -pineno (4,55%), sabineno (6,92%), limoneno (2,10%), linalol (1,29%), entre otros⁴¹.

El efecto antibacteriano demostrado en el estudio se compara con los resultados obtenidos por otros como el realizado por Fukuyama N, et al³⁷ (2011), aisló sesquiterpenos de extractos acuosos de hojas de *Laurus nobilis*, quienes mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias oportunistas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) y hongos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*). Obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias a 31 ng/ml³⁷.

El efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Laurus nobilis*, De acuerdo a la sensibilidad obtenida según la escala de Duraffourd *Staphylococcus aureus* es (MS) a concentración de 100% comparado con oxacilina es (SS), mientras que a vancomicina el 50% fue (MS) y 50% (SS).

El presente estudio es de interés y relevancia ya que se ha demostrado in vitro que el aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) tiene efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Siendo las concentraciones de 50% y 100% las que tuvieron mayor efecto, por lo que el uso de este aceite podría ser una alternativa a los problemas asociados a la aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. El aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) tuvo efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las concentraciones de 50 % y 100%.
3. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) no se pudo determinar ya que a las concentraciones de 25% y 50% existe turbidez en los tubos de ensayo.
4. El aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) a concentración de 100% tuvo efecto (MS) comparado con oxacilina (SS) este es menor, mientras que a vancomicina el 50% fue (MS) y 50% (SS).

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto antibacteriano de *Laurus nobilis* (laurel) frente a otras bacterias así como su efecto anti fúngico.
2. Determinar el efecto antibacteriano de *Laurus nobilis* (laurel) al 75% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
3. Ampliar el estudio para la determinación de la (CMI) y (CMB) del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel).
4. Realizar más proyectos de investigación que busquen el descubrir nuevas especies naturales con efecto antibacteriano, antiviral o anti fúngico.
5. Realizar estudios in vivo utilizando el aceite esencial de *Lurus nobilis* (laurel) frente a *Staphylococcus aureus* en infecciones experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ves J, Graziano A, De-Abreu M, Blanco M, Frutos L, Tula L, et al. . Infecciones graves por *Staphylococcus aureus*: características clínicas, sensibilidad antibiótica y uso de antimicrobianos. Serie de casos. Arch. argent. pediatr. 2014; 112(4): e152-5.
2. Córdova R, Cavero P, Huaranga J, Pachas C. Portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus* en trabajadores del Hospital Regional de Ica, Perú 2011. Rev. méd. panacea 2011; 1(3): 59-66.
3. Mediavilla J, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Cur Op Microbiol. 2012; 15(5): 588-95.
4. Rodríguez C, Álvarez A, Losa A, Picazo J. Aumento significativo de la colonización por *Staphylococcus aureus* entre los estudiantes de medicina durante la realización de las prácticas en el hospital. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(8): 516-9
5. López S, Goñi M, Barrado L, González M, Otero J, Chavez F. Colonización nasal por *Staphylococcus aureus* en estudiantes de medicina: importancia en la transmisión hospitalaria. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(8): 500-5.
6. Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. Trends Microbiol. 2012; 20: 243-50.
7. Montalvo R, Huaroto L, Álvarezcano J, Ticona E, García Y. Prevalencia de portadores nasales por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en personal de salud del servicio de cuidados intensivos, Hospital Nacional Dos de Mayo. Rev Peruana Epi. 2009; 13(2): 1-5.
8. Arteaga L, Espinoza Y, Chavez M. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* que coloniza el personal de salud de un hospital de la ciudad de Cali Rev Cienc Salud. 2016; 14(1): 9-19.
9. García A. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta Med Per. 2012; 29(2): 99-103.
10. Butnariu M, Bostan C. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium). Afr. J. Biotechnol. 2011; 10(31): 5900-9.
11. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales Fac Med San Marcos. 2001; 62(2): 156-61.

12. Cordova I, Aragón O, Diaz L, franco S, Serafin N, Pozos A, et al. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*. 2016; 48(3): 217-21.
13. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli A, Crisafi G, Germanò P, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimic Ag*. 2001; 17(6): 517- 20.
14. Ochoa A, Loeza H, Sagrero E, Villagómez E, Lara L, López J. Antibacterial activity of thionin Thi2. 1 from *Arabidopsis thaliana* expressed by bovine endothelial cells against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2008; 127(3): 425-30.
15. Sánchez L, Peña J. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. *Rev Salud Anim*. 2016; 32(8): 85-92
16. Geetha R, Sathian C, Prasad V, Gleeja V. Efficacy of purified antimicrobial peptides from lactic acid bacteria against bovine mastitis pathogens. *Asian Journal of Dairy and Food Research*. 2015; 34(4): 259-64.
17. Delucchi G, Farina E, Torres S. *Laurus nobilis* (Lauraceae) especie naturalizada en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot*. 2007; 42(4): 15-22
18. Patrakar R, Mansuriya M, Patil P. Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus Nobilis*. *IJCPS*. 2012; 1(2): 595-602.
19. Quijano C, Pino J. Characterization of the leaf essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.) grown in Colombia. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2007; 38(3): 371-4.
20. Steibel P, Troiani Y, Williamson F. Agregados al catálogo de las plantas naturalizadas y adventicias de la provincia de La Pampa , Argentina . *Rev. Fac. Agronomía UNLPam*. 2000; 11: 75-90.
21. Nayak S, Nalabothu P, Sandiford S, Bhogadi V, Adogwa A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats. *Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 6: 12
22. Ham A, Shin J, Oh K, Lee S, Nam K, Koo U, et al. Neuroprotective effect of the nHexane Extracts of *Laurus nobilis* L. in Models of Parkinson's Disease. *Biomol Ther*. 2011; 19(1): 118-125.
23. Elmastas M, Gulcin I, Isildak O, Kufrevioglu O, Ibaoglu K, Aboul-Enein H. Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2006;3(3): 258-66.
24. Simic M, Kundakovic T, Kovacevic N. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitot*. 2003; 74(6): 613-6.
25. Afifi F, Khalil E, Tamimi S, Disi A. Evaluation of the gastroprotective effect of *Laurus nobilis* seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1997; 58: 9-14.

26. Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. Analgesic and antiinflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*. 2003; 17(7):733-6.
27. Esra K, Ilkay O, Erdem Y. Evaluation of Some Plants Used in Turkish Folk Medicine for Their Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities. *Pharmaceutical biology*.2007; 45(7): 547-55.
28. Bilen S, Bulut M. Effect of Laurel (*Laurus nobilis*) on the non-Specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Animal and Veterinary Advances*.2010; 9(8):1275-7.
29. Loizzo M, Saab A, Tundis R, Statti G, Menichini F, Lampronti I, et al. Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chem Biodivers*. 2008; 5(3): 461-70.
30. Corato D, Trupo M, Leone G, Sanzo D, Zingarelli G, Adami M. Antifungal activity of the leaf extracts of laurel (*Laurus nobilis* L.), orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and olive (*Olea europaea* L.) obtained by means of supercritical carbon dioxide technique. *Journal of Plant Pathology*. 2007; 89 (3): 83-91.
31. El Malti J, Amarouch H. Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract. *Journal of Food Quality*. 2009; 32(2):190-208.
32. Millezi A, Caixeta D, Rossoni D, Cardoso M, Piccoli R. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2012; 32: 167-72.
33. Liu M, Otsuka N, Noyori K. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009; 32(3): 489-92.
34. Otsuka N, Liu M, Shiota S. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008; 31(9): 1794-7.
35. Ozcan B, Esen M, Sangun M, Coleri A, Caliskan M. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*. 2010; 31(5): 637-64.
36. Dias M, Barreira J, Calhelha R, Queiroz M, Oliveira M, Soković M. Two-dimensional PCA highlights the differentiated antitumor and antimicrobial activity of methanolic and aqueous extracts of *Laurus nobilis* L. from different origins. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 520-7.
37. Fukuyama N, Ino C, Suzuki Y. Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. *Natural Product Research*. 2011; 25(14): 1295-1303.
38. Julianti E, Jang K, Lee S. Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. *Phytochemistry*. 2012; 80: 70-6.
39. Kovacevic N. Essential oil of *Laurus nobilis* from Montenegro. *Chemistry of Natural Compounds*. 2007; 43(4): 408-11
40. Lira D, Retta D, Tkacik E, Ringuet J, Coussio J, Van;Baren C. Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Industrial Crops and Products*. 2009; 30(2): 259-64.
41. Al-Kalaldeh J, Abu R, Afifi F. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutr Res*. 2010 Apr;30(4):271-8

42. Dias M, Barros L, Dueñas M. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chemistry*. 2014; 156: 339-346.
43. Mazzanti M. Declaración de Helsinki. *Revista Colombiana de Bioética* 2001;6:1.
44. Ley que establece los Derechos de las personas usuarias de los servicios de la salud Ley N° 29414. Perú 2009.
45. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima – Perú: CMP; 2007.

ANEXOS

ANEXO 01

SOLICITUD DE PERMISO DE USO DE LABORATORIO

Trujillo, 09 de Febrero del 2017

Universidad Privada Antenor Orrego

Dr Ramel Ulloa Deza, Decano de la Facultad de Medicina Humana

ASUNTO:

Solicito permiso para utilizar laboratorio de microbiología y parasitología

De mi mayor consideración, me dirijo a usted para saludarle cordialmente y solicitarle la autorización para la ejecución del Proyecto de Investigación: “**Efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**” de mi autoría, dentro del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana que usted dignamente dirige.

Agradeciendo su gentil atención, quedo a espera de su respuesta

Atentamente:

Centurión Paredes, Jhonatan

ID: 000079105 ,DNI: 72478103

Se adjunta: Proyecto de Investigació

ANEXO 02

Patrones estándar del halo de inhibición para *Staphylococcus* spp, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetros del halo de inhibición para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		S. aureus ATCC 25923 intervalo ^a
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29	β-lactamasa ^b	≤0.1	26-37
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
	(<i>Estafilococos coagulasa -</i>)	1	≤17	--	≥18	>0.5	<0.25	--
B	Vancomicina ^d	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Teicoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	21-26
	Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	>8/152	<2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	25-30
	Cloranfenicol ^e	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^{e,1}	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^{1g}	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Cuadro elaborado con datos del NCCLS.

J Antimicrob Chemother (2010) 65 (9): 1955-1958.

ANEXO 03

Escala de Duraffourd	
Sensibilidad	Halo de inhibición (mm)
Nula (N)	< 8mm
Sensible (S)	8 – 14 mm
Muy Sensible (MS)	14 – 20 mm
Sumamente Sensible (SS)	<20 mm

ANEXO 04

Efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Laurus nobilis* “laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

REACTIVACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.

Siembra en Medio diferencial y selectivo:

Agar sangre: Características de las colonias. ___ colonia cremosa, amarillenta de bordes libres. _____

Colonia Manitol Positiva (x)

Colonia Manitol Negativa ()

Prueba de Catalasa:

Positiva (x)

Negativa ()

Prueba de Coagulasa

Positiva (x)

Negativa ()

Prueba de Susceptibilidad antibacteriana: Medio Agar Mueller Hinton

Germen asociado: *Staphylococcus aureus*

ANTIBIOGRAMA	Sensible	Intermedio	Resistente
Vancomicina 30ug	x		
Oxacilina 10ug	x		
Aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> 25%			x
Aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> 50%		x	
Aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> 100%	x		

ANEXO 05.

Ficha de recolección de datos

Determinación del efecto antibacteriano

repeticiones	Antibiograma de aceite esencial en (%) y por controles (mm)				
	Oxacilina	Vancomicina	25 %	50%	100 %
1	24mm	18mm	5mm	11mm	14mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
2	23mm	20mm	4mm	11mm	15mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
3	21mm	17mm	6mm	9mm	16mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
4	22mm	19mm	4mm	11mm	15mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
5	22mm	18mm	5mm	10mm	16mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
6	23mm	21mm	5mm	11mm	15mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	SS			
7	24mm	20mm	6mm	9mm	14mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
8	23mm	20mm	5mm	10mm	15mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
9	22mm	19mm	6mm	9mm	16mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
10	24mm	18mm	5mm	10mm	15mm
NCCLS	S	S			
duraffourd	SS	MS			
PROMEDIO	22.8mm	19mm	5.1mm	10.1mm	15.1mm

ANEXO 06.

Ficha de recolección de datos

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Concentracion del aceite de <i>Laurus nobilis</i>	Turbidez		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
25 %	Si	Si	Si
50 %	Si	Si	Si
100 %	No	No	No
Control	Si		

ANEXO 07.

Ficha de recolección de datos

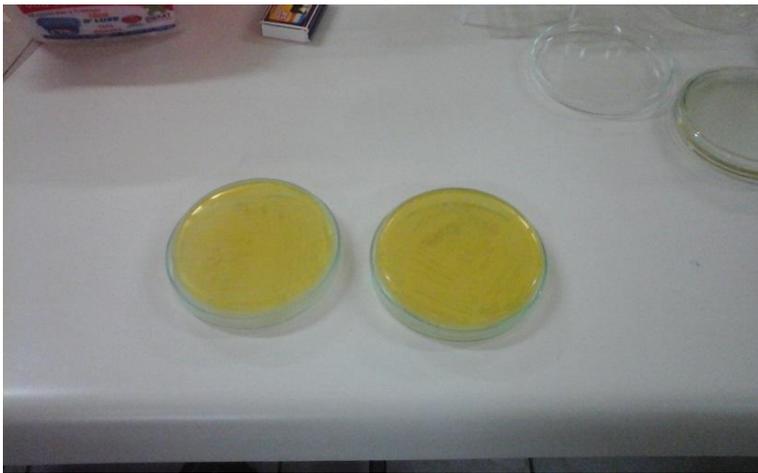
Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

repeticiones	Unidades formadoras de colonias (UFC) por Concentración de aceite esencial en (%) y por controles			
	25 %	50%	100 %	Cultivo sin tratar
1	3530 UFC	1540 UFC	0 UFC	6580 UFC
2	3470 UFC	1620 UFC	0 UFC	6070 UFC
3	3650 UFC	1680 UFC	0 UFC	7220 UFC
4	3510 UFC	1710 UFC	0 UFC	6530 UFC
5	3540 UFC	1590 UFC	0 UFC	6120 UFC
6	3440 UFC	1630 UFC	0 UFC	6340 UFC
7	3880 UFC	1700 UFC	0 UFC	7160 UFC
8	3230 UFC	1620 UFC	0 UFC	6010 UFC
9	3240 UFC	1580 UFC	0 UFC	6260 UFC
10	3380 UFC	1740 UFC	0 UFC	5960 UFC
PPROMEDI O	3487 UFC	1641 UFC	0 UFC	6425 UFC

CEPA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.



COLONIAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS



PREPARACION DEL INOCULO



INOCULO COMPARADO CON ESPECTRÓMETRO DE MCFARLAND



PREPARACION DE AGAR MUELLER HINTON



SERVIDO DE AGAR MUELLER HINTON EN PLACAS PETRI

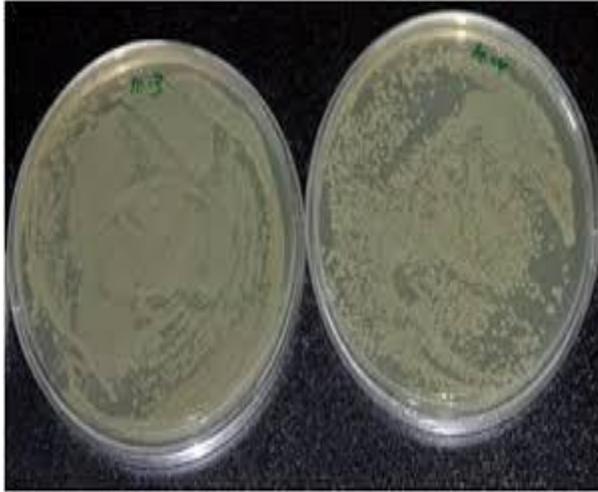


DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA



LECTURA DE PLACAS DE (CMB)

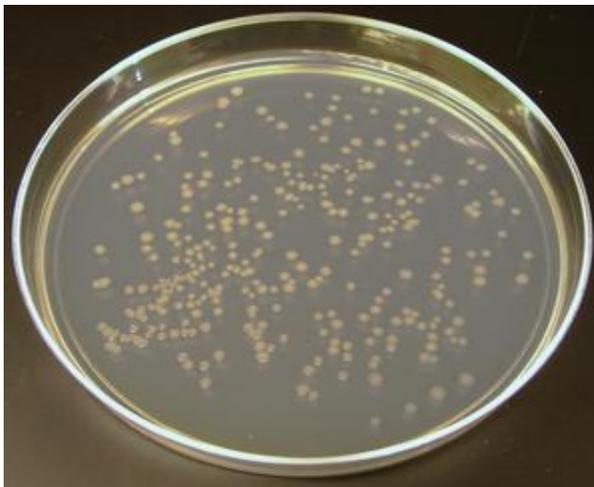
CONTROL



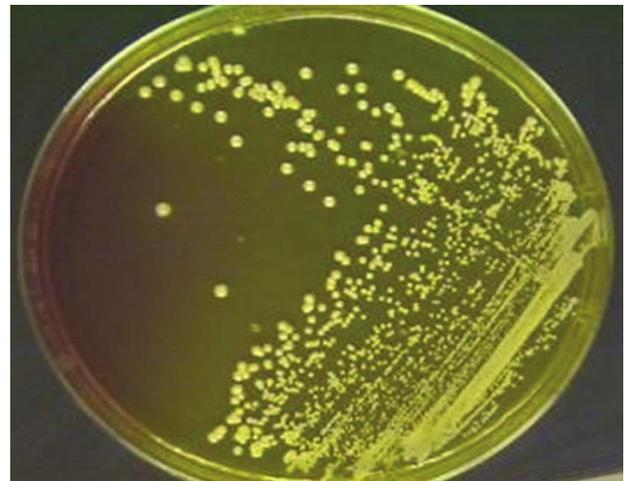
100%



50%



25%



DETERMINACIÓN DE EL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO



LECTURA DE HALOS E INHIBICION

