

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* "camu camu" sobre *Pseudomonas aeruginosa*
resistente a carbapenémicos.

Área de Investigación:

Farmacognosia

Autor (es):

Br. Castillo Carranza, Beatriz María

Jurado Evaluador:

Presidente: Araujo Jiménez, Armando

Secretario: Ávila Vereau, Elio

Vocal: Mercado Martínez, Pedro

Asesor:

Mejía Delgado, Elva Manuela

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0296-2695>

Trujillo – Perú

2020

Fecha de sustentación: 2020/09/22

DEDICATORIA

A mis queridos padres, por su gran apoyo en cada etapa de mi vida y por ayudarme a crecer como persona

A mis hermanos, por ser mi guía y ejemplo a seguir en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y amigos por ser mi compañía en los momentos
difíciles.

A mi asesora por su tiempo y brindarme su más grande apoyo en el desarrollo
de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág. 01
ABSTRACT.....	Pág. 02
I. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 03
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág. 05
III. RESULTADOS.....	Pág. 15
IV. DISCUSIÓN.....	Pág. 21
V. CONCLUSIONES.....	Pág. 26
VI. RECOMENDACIONES.....	Pág. 27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág. 28
VIII. ANEXOS.....	Pág. 32

Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* “Camu camu” sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos

RESUMEN

Objetivo. Demostrar el efecto antimicrobiano de cuatro concentraciones de *Myrciaria dubia* “Camu camu” sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Métodos. Elaboramos extracto etanólico de cáscara de *Myrciaria dubia* en las siguientes concentraciones: 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750mg/ml y 1000 mg/ml. Para estimar su actividad antimicrobiana se usó el método de difusión en disco (Kirby Bauer). En cuanto al efecto bactericida, se determinó mediante el conteo de UFC y también determinamos la CMI, hallada mediante la absorbancia por espectrofotometría. Tuvimos tres grupos control, uno con gentamicina, con etanol de 70° y un grupo solo con el inóculo de bacterias. Se llevó a cabo 10 repeticiones en cada caso.

Resultados. Estadísticamente se determinó que había diferencia significativa entre las concentraciones del extracto etanólico de *Myrciaria dubia* contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Los resultados se consideraron como significativos si el valor-p < 0,05. Hubo sensibilidad a las cuatro concentraciones al medir los halos de inhibición y compararlos de acuerdo a la escala Duraffourd. La CMB fue la de 1000 mg/ml. En cuanto a la CMI, la absorbancia máxima fue de 0.83A a la concentración de 1000 mg/ml.

Conclusión. *Myrciaria dubia* “camu camu” tiene efecto inhibitorio in vitro contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Palabras clave: *Myrciaria dubia*, *Pseudomonas aeruginosa*, extracto etanólico

Antimicrobial effect of *Myrciaria dubia* "Camu camu" on *Pseudomonas aeruginosa* carbapenems resistant

ABSTRACT

Objective. Prove the antimicrobial effect of four concentrations of *Myrciaria dubia* "Camu camu" on "*Pseudomonas aeruginosa* carbapenems resistant.

Methods. We elaborate ethanolic extract of *Myrciaria dubia* husk in the following concentrations: 250 mg / mL, 500 mg / mL, 750mg / ml and 1000 mg / ml. The disk diffusion method (Kirby Bauer) was used to estimate its antimicrobial activity. As for the bactericidal effect, it was determined by the CFU count and we also determined the MIC, found by the absorbance by spectrophotometry. We had three control groups, one with gentamicin, with 70 ° ethanol and one group only with the bacteria inoculum. 10 repetitions were carried out in each case.

Results. Statistically it was determined that there was a significant difference between the concentrations of ethanol extract of *Myrciaria dubia* against *Pseudomonas aeruginosa* carbapenems resistant. The results were considered significant if the p-value <0.05. There was sensitivity to the four concentrations of said extract by measuring the inhibition halos and comparing them according as Duraffourd scale. The MBC was 1000 mg / ml. As for the MIC, the maximum absorbance was 0.83A at the concentration of 1000 mg / ml.

Conclusion. *Myrciaria dubia* "camu camu" has in vitro inhibitory effect against *Pseudomonas aeruginosa* carbapenems resistant.

Keywords: *Myrciaria dubia*, *Pseudomonas aeruginosa*, ethanolic extract

I. INTRODUCCIÓN

Pseudomona aeruginosa es una bacteria Gram negativa, aerobia facultativa, oportunista, responsable de gran cantidad de infecciones intrahospitalarias. Afecta principalmente pacientes quemados o que tienen fibrosis quística. Tratar infecciones que son causadas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* es un reto en la actualidad, ya que tiene diversos mecanismos de defensa. Debido a esto muchas veces es necesario el uso de medicamentos de amplio espectro como los carbapenémicos, que son considerados entre las últimas líneas de tratamiento. Sin embargo se ha demostrado distintos mecanismos como producción de β -lactamasas de espectro extendido, la inactivación de enzimas y la reducción de las concentraciones del medicamento en el lugar de acción, que ocasionan una resistencia adquirida a estos medicamentos.^{1,2} En los últimos años las cepas de CRPA (“*Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos”) han aumentado constantemente.^{3, 4} Además se ha demostrado que los pacientes con bacteriemia debido a CRPA, tienen más probabilidades de morir que aquellos pacientes que tienen bacteriemia debido a *Pseudomona aeruginosa* que es sensible a carbapenémicos.^{5, 6} Por esta razón la OMS publicó en el año 2017 una lista de las bacterias, que prioritariamente necesitaban nuevos antibióticos para su tratamiento, en la que fue incluida como prioridad crítica esta bacteria.⁷ Esto hace necesario seguir investigando el tratamiento de las infecciones producidas por dicha bacteria, así como también buscar formas de disminuir las tasas de aparición y diseminación de resistencias.^{8, 9}

Myrciaria dubia conocida comúnmente como “camu-camu”, sobresale entre los frutos propios de la Amazonia. Pertenece a la familia *Myrtaceae* y se desarrolla en las orillas de lagos y ríos en la Amazonia.^{10,11} Es un fruto que causa mucho interés ya que contiene grandes cantidades de vitamina C, especialmente la cascara que puede llegar a tener hasta 5g /100g.¹¹ Previa investigación han demostrado fuertes actividades antioxidantes en las porciones polares del extracto de la cascara y semillas, mientras que actividades antimicrobianas se

asocian a las porciones no polares de dichos extractos. En adición, tiene cantidades en proporción menor de riboflavina, niacina, hierro, tiamina, antocianinas, flavonoides y también carotenoides.^{12,13} Todas estas propiedades lo convierten en un poderoso antioxidante y antiinflamatorio, incluso usado para tratar el estrés y enfermedades autoinmunes.^{13,14}

La presencia de cepas que son resistentes frente a fármacos clásicos, genera la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento, regresando a costumbres ancestrales como el uso plantas. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) de los 4000 millones de habitantes en el mundo, el 50% hace uso de la llamada “medicina tradicional” de una manera rutinaria.^{15, 16} Perú posee aproximadamente el 8% de la cantidad total de plantas en el mundo, y gran cantidad de estas plantas poseen propiedades terapéuticas.¹⁷ La mayoría de la flora peruana es nativa o crece en la Amazonia peruana. A pesar de esto, probablemente menos del 1% de estas especies se han estudiado para determinar sus fitoquímicos con potencial medicinal o no han sido investigadas apropiadamente, como por ejemplo *Myrciaria dubia* o conocida comúnmente como “camu camu”.^{18, 19}

Antecedentes:

Pacci y col (2009) evaluaron el efecto de *Myrciaria dubia* en las quemaduras, comparando el efecto antibiótico que tenía la crema a base de *M. dubia* contra el efecto de la crema de sulfadiazina argéntica. Para la elaboración de la crema usaron extracto etanólico de la cáscara al 5%. Lo aplicaron en ratas por cinco días y encontraron una mayor reducción de la cicatriz en el grupo tratado con *M. dubia*.¹¹

Myoda y col (2010) investigaron la actividad antimicrobiana de camu camu sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Elaboraron extracto metanólico de la semilla y cáscara, demostrando que ambos extractos tenían actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y

Saccharomyces cerevisiae. La cáscara mostro sus efectos al 100%, mientras que la semilla lo hizo a una concentración menor, la cual fue de 75%.¹⁴

Mori y col (2010) determinaron el efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Cyperus luzulae* (piri piri) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Trabajaron con las hojas y la corteza de camu camu, obteniendo extractos hidroalcohólicos a las concentraciones de 500 mg/ml, 600 mg/ml, 700 mg/ml y 800 mg/ml. Se demostró su actividad contra *Staphylococcus aureus*, sin embargo, los otros patógenos fueron resistentes.¹⁶

Castillo y col (2013) demostraron el efecto inhibitorio de *Myrciaria dubia* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Elaboraron extracto etanólico a base de la cáscara de *M. dubia* en cuatro concentraciones, la cuales fueron: 25%, 50%, 75% y 100%. Demostraron su actividad antimicrobiana contra ambos microorganismos patógenos.²⁰

López y col (2017) evaluaron el efecto antibacteriano de del zumo de *Myrciaria dubia*, *Citrus grandis* y *Citrus reticulata*, sobre patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*. Concluyeron que tanto el zumo de *Myrciaria dubia* y *Citrus grandis* poseen efecto inhibitorio contra el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*. Sin embargo, no encontraron efecto antibacteriano que sea de importancia de *Citrus reticulata* contra estos microorganismos patógenos.²¹

Justificación:

Las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes frente a los fármacos usados para su tratamiento establecen un problema de salud importante en nuestro medio, por lo cual existe la necesidad de investigar productos naturales que tengan efecto antimicrobiano contra dicha bacteria. Este trabajo busca dar a conocer las propiedades antimicrobianas de *Myrciaria dubia* “Camu camu” sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y

de esta manera introducir este extracto de un fruto propio de nuestro país, con el fin dar a conocer su efectividad terapéutica, con una cantidad mínima de efectos secundarios y un menor costo al ser un producto natural.

1.1. Enunciado del problema: ¿Existe acción antimicrobiana in vitro de de *Myrciaria dubia* “Camu camu” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos?

1.2. Objetivos:

Objetivo general:

Demostrar que existe acción antimicrobiana in vitro de *Myrciaria dubia* “Camu camu” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Objetivo específico:

- ✓ Determinar la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* frente al extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “Camu camu”, usando el método de Kirby y Bauer (difusión en disco).
- ✓ Determinar la CMI (concentración mínima inhibitoria) del extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “Camu camu” utilizando las concentraciones de 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750mg/ml y 1000mg/ml sobre una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, usando la espectrofotometría.
- ✓ Determinar la acción bactericida del extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “camu camu” utilizando las concentraciones de 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750mg/ml y 1000mg/ml sobre una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, mediante el conteo de las UFC.

1.3. Hipótesis

Hipótesis nula (Ho). No existe efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Myrciaria dubia* sobre *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Hipótesis alterna (Ha). Existe efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Myrciaria dubia* sobre *Pseudomona aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Tipo y nivel de investigación:

Investigación de tipo experimental, básica, prospectiva, comparativa.

II.2. Población y muestra de estudio:

A. Población:

-Población objetivo: cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

-Población accesible: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente carbapenémicos que fueron identificadas y certificadas por el “Laboratorio clínico del Hospital Belén de Trujillo”.

-Criterios de selección:

Criterios de inclusión

- Cepas de PARC.
- Cultivos de PARC que no han sido contaminados por alguna otra bacteria u hongo durante el experimento.

Criterios de exclusión

- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles a los carbapenémicos.
- Cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos contaminados por alguna bacteria u hongo durante el experimento.

B. Muestra y muestreo

Unidad de análisis

La unidad de análisis la integro cada cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con medios de cultivo agar Müller Hinton, además del extracto etanólico de “Camu camu” (elaborado de la cáscara) en las concentraciones antes mencionadas, el control positivo y control negativo.

Muestreo

Este estuvo integrado por las UFC (“unidades formadoras de colonias”) de *Pseudomonas aeruginosa*, resultado del efecto antibacteriano.

Tamaño muestral²⁰:

Al tratarse de un trabajo experimental, encontramos en los antecedentes que los diferentes estudios similares a este, utilizaron como estándar un número de repeticiones igual a 10. Por lo que para darle validez y por la comodidad del investigador se harán un número de 10 aplicaciones (repeticiones)

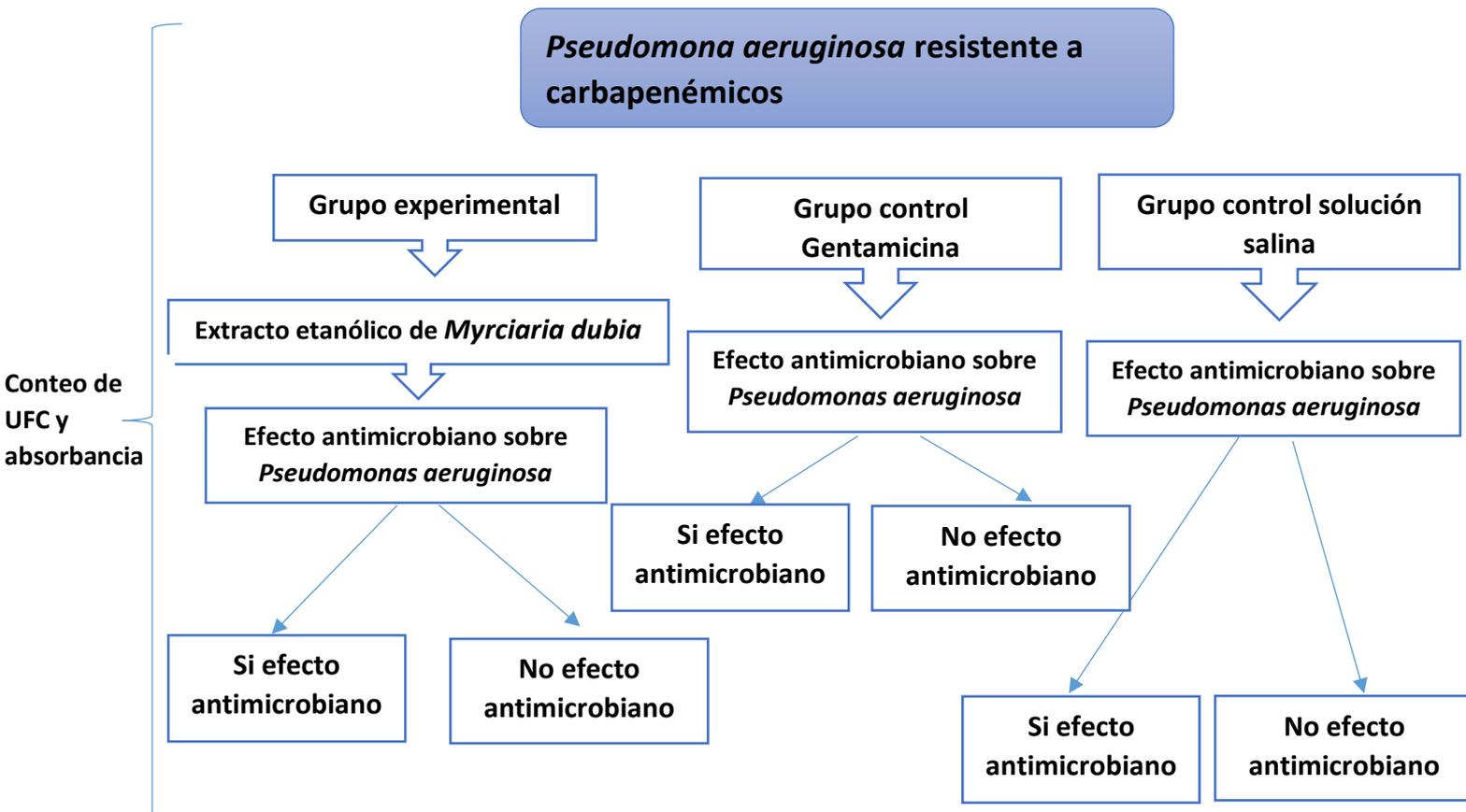
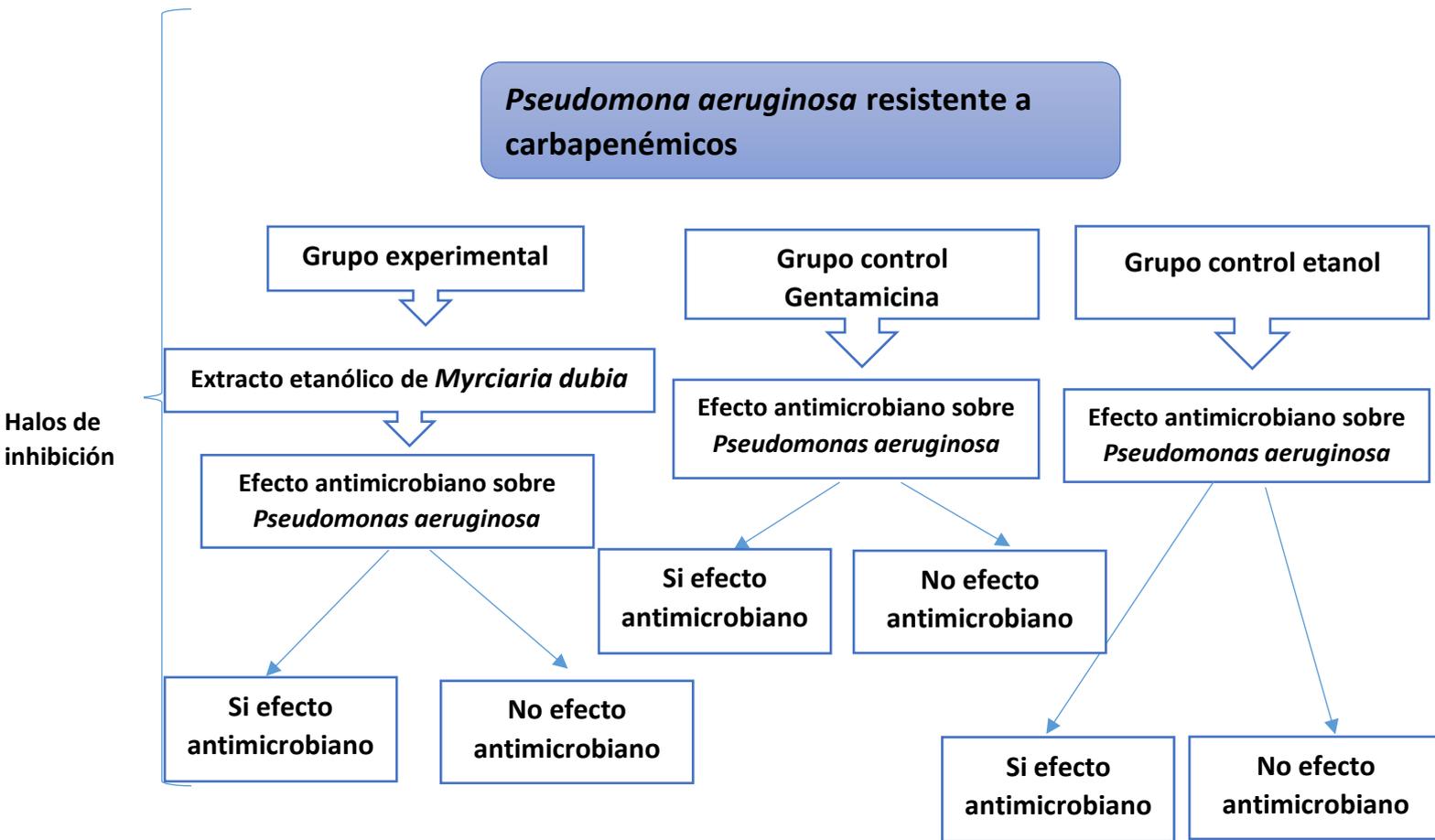
Myrciaria dubia 250 mg/ml: 10 aplicaciones (repeticiones)

Myrciaria dubia al 500 mg/ml: 10 aplicaciones (repeticiones)

Myrciaria dubia al 750 mg/ml: 10 aplicaciones (repeticiones)

Myrciaria dubia al 1000 mg/ml: 10 aplicaciones (repeticiones)

II.3. Diseño de investigación:



II.4. Variables

Variable	Tipo	Escala	Índice
Variable independiente Concentración del extracto etanólico de cáscara de <i>Myrciaria dubia</i> .	Cuantitativa	De razón	Concentración (mg/ml) <ul style="list-style-type: none"> • 250 mg/ml • 500 mg/ml • 750 mg/ml • 1000 mg/ml
Variable dependiente Efecto inhibitorio sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistencia a carbapenémicos.	Cuantitativa	De razón	Susceptibilidad-Halos inhibitorios: <ul style="list-style-type: none"> • Nula: Diámetro < 8 mm. • Sensibilidad límite: considerado como el “diámetro entre 8 - 14 mm”. • Muy sensible: considerado como el “diámetro entre 15 - 20 mm”. • Sumamente sensible: cuando es un “diámetro > 20 mm”
	Cuantitativa	De razón	CMI: Absorbancia, medida por espectrofotometría.
	Cuantitativa	De razón	CMB: Conteo de “unidades formadoras de colonias “(UFC)

Definición operacional de las variables

-Variable independiente

Extracto etanólico de cáscara de *Myrciaria Dubia*.

Extracto obtenido de la cáscara de *Myrciaria dubia* en concentraciones de 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml y 1000 mg/ml, luego de un proceso de maceración en etanol.

-Variables dependientes

➤ **Efecto inhibitorio in vitro**

Facultad para detener la multiplicación o producir la eliminación de una bacteria en circunstancias empíricas, el cual lo estipulamos luego de hacer las mediciones respectivas de los “halos inhibitorios”.

➤ **Halo de inhibición**

Diámetro en mm de la zona transparente alrededor del disco, que se valoró según la escala Duraffourd.

Escala de Duraffourd: escala cualitativa que determina el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición²²:

o **Nula:** Diámetro < 8 mm.

o **Sensibilidad límite:** considerado como el “diámetro entre 8 - 14 mm”.

o **Muy sensible:** considerado como el “diámetro entre 15 - 20 mm”.

o **Sumamente sensible:** considerado como el “diámetro > 20 mm”

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Menor concentración de un antimicrobiano, que inhibe el crecimiento visible, luego de 24 horas. Se determinó con la absorbancia, haciendo uso de la espectrofotometría.^{20,26}

Concentración mínima bactericida (CMB)

Ínfima dosis del antibiótico que puede exterminar las bacterias viables, luego de 24 horas de incubación. Fue determinada mediante el conteo de UFC^{20,26}

II.5. Procedimientos y técnicas

La preparación del extracto etanólico de *Myrciaria Dubia* “camu camu” (elaborado de la cáscara) se realizó con la colaboración de un experto en farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo.

A. Recolección de la muestra:

Los frutos frescos de *Myrciaria Dubia* fueron adquiridos en Nauta, Loreto. Además, se llevaron las hojas y flores al Herbario Antenor Orrego de la Universidad Privada Antenor Orrego, para su reconocimiento taxonómico.

B. Tratamiento del material vegetal:

Myrciaria dubia: los frutos se llevaron al laboratorio de farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo.

- **Lavado de muestra:** previa separación de cáscaras deterioradas, se lavaron los frutos con agua destilada y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por aproximadamente cinco o seis minutos. Se enjuagaron los frutos con agua destilada nuevamente. Finalmente se pelaron, para obtener la cáscara.
- **Secado:** después de la desinfección, las cáscaras se colocaron sobre papel Kraft. Luego se pusieron en la estufa donde permanecieron por 4 días aproximadamente a la temperatura de 40°.
- **Pulverización:** se pulverizó el material haciendo uso del molino de mano.
- **Almacenamiento:** guardamos el material pulverizado en un frasco ámbar con 1400 cc de etanol de 70° G.L por aproximadamente 10 días.²³

C. Preparación del extracto etanólico

Después el material que guardamos en el frasco se vertió en un cartucho de papel de filtro y se colocó en el “extractor del equipo de soxhlet”, de donde se extrajo 750 ml de etanol de 70° G.L. (el procedimiento duro 1 hora aproximadamente). Se hizo el filtrado del material, con los siguientes tipos de papel filtro: primero “Whatman N° 41”, luego “Whatman N°4” y finalmente “Whatmann N°2”. El resultado se llevó a secar a una cámara de secado a 40 grados centígrados. Pesamos el remanente seco y lo pusimos a refrigerar en un frasco de vidrio de color ámbar estéril a 2° centígrados. Posteriormente se prepararon en etanol de 70°G.L las concentraciones de 250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml. Se usaron dichas concentraciones en base a la eficacia de estudios previos.

Finalmente se separó en frascos de color ámbar rotulados para cada concentración (dichos frascos fueron previamente esterilizados a 121 grados centígrados en el autoclave, durante 15 minutos y con aproximadamente 15 libras de presión). Las 4 diluciones se conservaron a 4°C hasta su posterior uso.

D. Obtención de la cepa

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos fue obtenida en el laboratorio clínico del Hospital Belén de Trujillo.

E. Preparación de la cepa

Luego de obtener las cepas, fueron cultivadas en tubos de ensayo con tapa rosca en el medio TSA (agar soya tripticasa) con la finalidad de tener colonias jóvenes.

F. Preparación del inóculo

La cepa se diluyó con solución salina hasta una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml)

G. Determinar el efecto inhibitorio (prueba de susceptibilidad)

Sembrado

Usando un hisopo estéril, el cual fue embebido con el material del tubo de cultivo preparado, conservando una distancia de diez centímetros de la flama de un mechero, se sembró en placas Petri conteniendo Agar Müller Hinton para *Pseudomonas aeruginosa*, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando cada placa 60°, 3 veces aproximadamente.

Determinación:

Luego de realizar el sembrado, se realizó la prueba de sensibilidad empleando la técnica de difusión en Agar o “método de Kirby-Bauer”. Se prepararon discos de papel filtro estériles y se les sumergió en cada una de las concentraciones de extracto etanólico de camu camu previamente elaborado (se usó la misma cantidad del extracto, medido con la ayuda de una pipeta, e igual cantidad de tiempo para cada disco). Luego, con una aguja estéril, estos discos fueron colocados sobre los cultivos en las placas Petri preparadas previamente. Tuvimos un grupo control negativo con etanol y otro grupo control negativo con gentamicina. Posteriormente

las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se midieron los halos de inhibición en mm, incluyendo el área del disco de papel de filtro con una regla milimetrada. Se tuvo en cuenta la escala de Duraffourd.²⁴

H. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó la técnica de diluciones en tubos. Utilizamos 6 tubos de ensayo en total, a 4 de los cuales se inoculó 0.4 ml de la bacteria (en concentraciones semejantes al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland) en cada uno de los tubos correspondientes y 1,6 ml del extracto para cada concentración (250 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml y 1000 mg/ml respectivamente, no se consideró las variaciones en la concentración del extracto al hacer la dilución). El quinto tubo correspondió al control con gentamicina, se añadió 1,6 ml de gentamicina y 0.4 ml de la bacteria. Además, se tuvo un control negativo de la bacteria sola sin tratamiento, solo solución salina, e igualmente se añadió 0.4 ml de la bacteria y 1.6 ml de solución salina. Para uniformizar el material, se agitó. Luego se colocaron los tubos en la estufa a 37°C por 24 horas. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia mediante el espectrofotómetro.^{24, 25, 26}

I. Concentración mínima bactericida

Determinamos las cuentas viables sembrando 0.1 ml de solución de cada uno de los tubos en 10 placas Petri con Agar Müller Hinton, y se usó el asa de Driglasky para dispersar la muestra; estas placas se colocaron en estufa por 24 horas a 37°C y luego se observó el crecimiento de la bacteria, considerándose como concentración bactericida, a la menor concentración en la cual no observaremos UFC. El método se llevó a cabo conservando una distancia de diez centímetros de la flama de un mechero.²⁵

II.6. Plan de análisis de datos

Luego de la recopilación de datos, se almacenaron los resultados en “el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25” (base de datos). Se presentan en los anexos usando medias y desviaciones estándar. Estos resultados se obtuvieron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente

se utilizaron pruebas de conversiones múltiples (DUNCAN) para determinar las diferencias entre los grupos. Previamente se evaluó el supuesto de normalidad. Los resultados fueron considerados como significativos si el valor- $p < 0,05$.

II.7. Ética

Esta investigación tuvo en cuenta los principios de bioseguridad, además de tener el cuidado con algún elemento que pueda generar daño en el medio ambiente (Declaración de Helsinki).

Al realizarse un trabajo de investigación in vitro, no hay incumplimiento de normas éticas. Sin embargo, se respetó el reglamento ético admitido en el sexto capítulo del código ético del CMP (Colegio Médico del Perú titulado) el cual se titula: "Del trabajo de investigación", principalmente el 6 Art. 48°, el cual enuncia la fidelidad en la difusión de datos alcanzados en la investigación.²⁹

El estudio contó además con la autorización del comité de investigación y ética de la universidad Privada Antenor Orrego, con la resolución N°090-2019.

III. RESULTADOS

Una vez realizado los tratamientos in vitro de *M. dubia* sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos (PARC) determinamos:

En la tabla n°1 y grafica n°1, donde podemos apreciar que el mayor halo de inhibición (25.72 mm) se presentó con el disco que tenía el extracto con mayor concentración de 1000 mg/ml y el menor halo de inhibición (12.43 mm) con el disco que tenía la menor concentración de 250 mg/ml. El halo inhibitorio obtenido con el etanol fue nulo (6mm, tamaño del disco).

En la tabla n°2 (análisis de varianza según los halos de inhibición), y en la tabla de la prueba Duncan (anexos), encontramos que existe diferencia estadísticamente significativa entre los diámetros de los halos de acuerdo a la concentración del extracto etanólico de *M. dubia* utilizada ($P < 0,05$).

Con respecto a la CMI (tabla 3) observamos, con el uso de la espectrofotometría que la concentración 100% presentó mayor absorbancia (0,830 A). La CMI fue con la concentración al 75 %.

La CMB (tabla 4 y 5) del extracto etanólico de *M. dubia* sobre PARC fue del 100% (1000 mg/ml), concentración a la que no se produce ninguna UFC(0.0 UFC/ml).

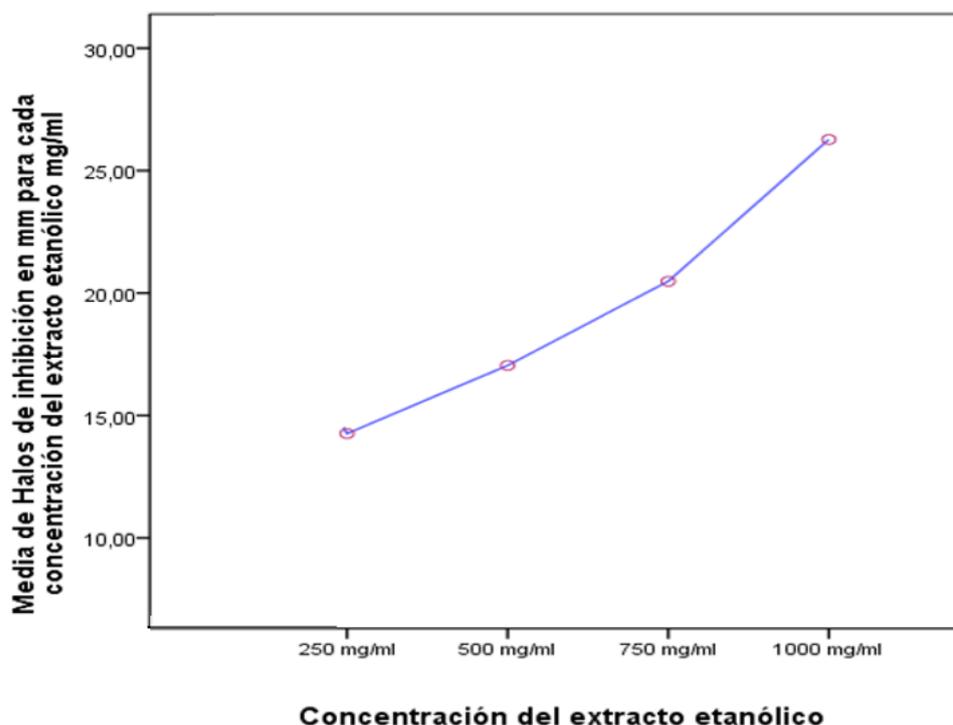
En la tabla nº 7 se observa el análisis de varianza de los bloques según el conteo de UFC encontrándose igualmente diferencias significativas.

TABLA 1: Análisis Descriptivo para el Efecto Antimicrobiano de *Myrciaria dubia* “camu camu” en las concentraciones de 250,500,750 y 1000 mg/ml, Control Gentamicina y Control etanol sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, según halos de Inhibición (mm).

<i>Halos de inhibición (mm) para cada concentración del extracto etanólico mg/ml</i>	<i>ni</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>
<i>Control etanol</i>	<i>10</i>	<i>6.00</i>	<i>0.00</i>
<i>Control Gentamicina</i>	<i>10</i>	<i>25.61</i>	<i>2.36</i>
<i>250 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>12.43</i>	<i>1.64</i>
<i>500 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>15.51</i>	<i>0.52</i>
<i>750 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>19.31</i>	<i>0.71</i>
<i>1000 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>25.72</i>	<i>2.10</i>

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

GRAFICO 1: Gráfico de Medias



Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

TABLA 2: Análisis de Varianza para el Efecto Antimicrobiano de *Myrciaria dubia* “camu camu” en las concentraciones de 250,500,750 y 1000 mg/ml, Control Gentamicina y Control etanol sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, según halos de Inhibición (mm).

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Entre grupos</i>	2985.96	5	597.19	265.71	0.0000
<i>Dentro de grupos</i>	121.37	54	2.25		
<i>Total</i>	3107.33	59			

FV: Fuente de varianza, **SC:** suma de cuadrados, **gl:** grados de libertad, **CM:** cuadrados medios, **F:** valor F, **P:** valor P

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

TABLA 3: Absorbancia determinada por espectrofotometría (CMI)

Concentración del extracto etanólico %	Absorbancia
25	0.19 A
50	0.232 A
75	0.535 A
100	0.83 A
Gentamicina	0.53 A
Solución salina	0.022 A

Longitud de onda: 530 nm

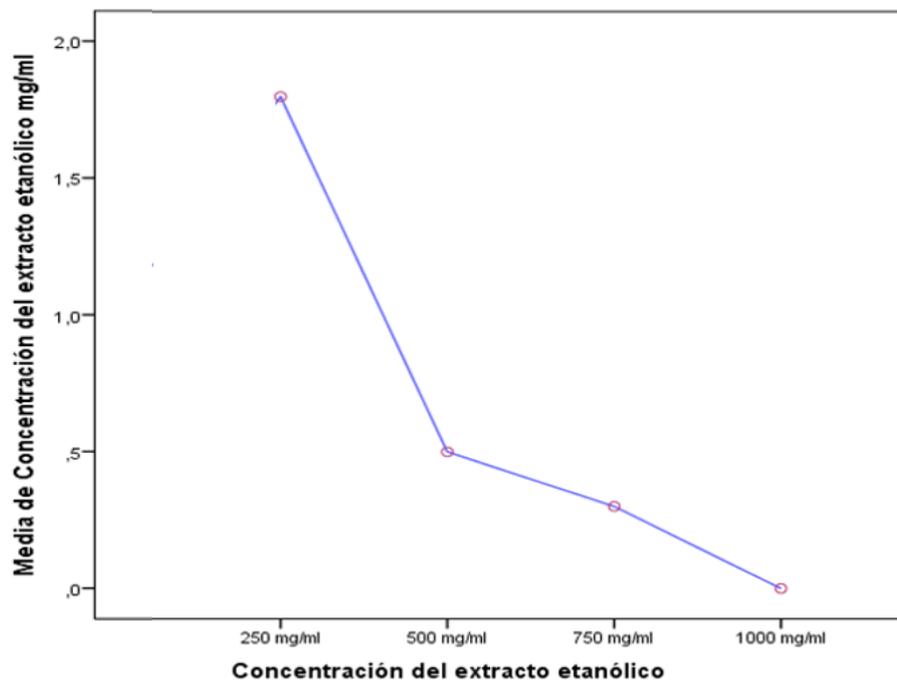
Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

TABLA 4: Análisis Descriptivo para el Efecto bactericida de *Myrciaria dubia* “camu camu” en las concentraciones de 250,500,750 y 1000 mg/ml, Control Gentamicina y Control etanol sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, según UFC.

<i>Concentración del extracto etanólico mg/ml</i>	<i>ni</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desv. Est.</i>
<i>Solución Salina</i>	10	1.0×10^9	0.00
<i>Control Gentamicina</i>	10	1.00	1.05
<i>250 mg/ml</i>	10	1.80	1.62
<i>500 mg/ml</i>	10	0.50	0.85
<i>750 mg/ml</i>	10	0.30	0.48
<i>1000 mg/ml</i>	10	0.00	0.00

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

GRAFICO N°2: Gráfico de Medias



Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

TABLA 5: Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de *Myrciaria dubia* “camu camu” sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos

Concentración del extracto etanólico	Promedio de UFC	Observaciones
250 mg/ml	1.80	
500 mg/ml	0.50	
750 mg/ml	0.30	
1000 mg/ml	0.00	CMB

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

TABLA 6: Análisis de Varianza para el Efecto Antimicrobiano de *Myrciaria dubia* “camu camu” en las concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 mg/ml, Control Gentamicina y Control etanol sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos, según UFC.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Entre grupos</i>	19.88	4	4.97	5.30	0.0014
<i>Dentro de grupos</i>	42.20	45	0.94		
<i>Total</i>	62.08	49			

*No se incluyó la solución salina

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

IV. DISCUSIÓN

La siguiente investigación demostró la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Myrciaria dubia* frente a *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en donde se usó el “método de Kirby y Bauer” (difusión en disco), determinando la CMI y su actividad bactericida.

Obtuvimos un efecto dosis- dependiente en la susceptibilidad *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos frente al extracto etanólico de *M. dubia* (tabla 1). El efecto fue significativamente mayor con los discos que tuvieron las concentraciones de 50%, 75% y 100%, comparando los halos de inhibición de las cuatro concentraciones de acuerdo a la “escala de Duraffourd”. Además, dicha diferencia fue significativa entre las dosis del extracto, ya que $p < 0,05$ datos mostrados en la tabla 2. Reafirmamos además el efecto antimicrobiano de la planta, al encontrarse efecto nulo con el control usando etanol puro, el cual fue usado para la elaboración del extracto. Estos resultados contrastan con los efectos encontrados por Mori y col (2010) quienes encontraron resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* no resistente a las concentraciones de 800 mg/ml, 700 mg/ml y 600 mg/ml del extracto hidroalcohólico de *Myrciaria dubia*, encontrándose 6mm como promedio de las medidas de los halos de inhibición, cabe recalcar que no se especifica el promedio para cada concentración, por lo que solo se hace una comparación del efecto antimicrobiano de una manera global contra *S. aureus* con el resultado obtenido contra *E. coli* y *P. aeruginosa*; en este trabajo se encontró un mínimo valor promedio de 12 mm para los halos de inhibición del extracto al 25% (250 mg/ml), mientras que se encontró un valor promedio máximo de 26 mm al 100%(1000mg/dl) que es homogéneo con el grupo control con gentamicina, es decir son estadísticamente semejantes ($p > 0,05$). Esto probablemente se debe a que existen diferencias en la elaboración del extracto, ya que estos autores utilizaron las hojas y corteza de *M. dubia*, mientras que en nuestro trabajo se usó la cáscara de este fruto. Además, en este trabajo se pesó 2,5 g de extracto liofilizado en 2,5 ml de agua destilada estéril para obtener la solución stock con una concentración de 1000 mg/ml a partir de la cual se prepararon las

concentraciones de: 500 mg/ml, 600 mg/ml, 700 mg/ml y 800 mg/ml, mientras que nosotros trabajamos con 300 gramos de material pulverizado, el cual se macero en 1400 ml de alcohol al 70°, a partir del cual se preparó las concentraciones de 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750mg/ml y 1000 mg/ml.¹⁶

En cuanto a la CMI (tabla 3), la concentración a 100% (1000 mg/ml), presentó mayor absorbancia (0,830 A) es decir presentó menor concentración de la bacteria en comparación de la lectura inicial del blanco (tubo con solución salina) que tuvo una absorbancia de 0,022 A es decir mayor concentración del patógeno. La CIM fue al 75% con respecto a la absorbancia obtenida en el tubo control con gentamicina. El método usado en nuestro estudio para la CMI contrasta con otros estudios que utilizan otros métodos para su determinación, como la medición visual. Sin embargo, el método que usamos sería más objetivo.²⁶

En cuanto a la CMB, como podemos apreciar en la tabla 4 y 5, fue al 100% (1000 mg/ml), ya que a esta concentración se obtuvo 0.0 UFC/ml, no obstante, con las cuatro concentraciones se demostró un buen efecto inhibitorio en comparación con el grupo control del inóculo con solución salina en el cual se obtuvo un recuento alto de 10^9 UFC/ml. Esto difiere de la investigación de Mori y col (2010), en la cual se encontró resistencia a las diferentes concentraciones, pero no especifican el conteo de UFC para cada concentración que usaron. Es importante tener en cuenta que estas diferencias se deben probablemente a que las hojas y la cáscara de *M. dubia* tienen diferentes concentraciones de compuestos fenólicos, además de ser estos distintos entre sí. Por otro lado, a pesar que el tipo de agar podría influir en la capacidad con la que difunden las sustancias e incluso podría haber una interacción con los principios activos del extracto o ser el pH de un medio diferente al otro, en la investigación realizada por Mori y col (2010) se usó el mismo agar que en nuestro trabajo. Además, en nuestro trabajo se usó una cepa de *Pseudomonas resistente* a carbapenémicos, una cepa de difícil tratamiento en comparación con la otra investigación quienes usaron una cepa simple.¹⁶

En cuanto a Flores y col (2017) evaluaron la actividad inhibitoria de extractos polifenólicos de cáscara de *Myrciaria dubia* frente a *Erwinia carotovora*

subsp *carotovora* y *Pseudomona cichorii*, usando la misma parte del fruto que nuestro estudio. Lo mantuvieron en maceración por tan solo tres días a diferencias de nuestro estudio en cual el proceso de maduración duro 10 días aproximadamente. Entre otras diferencias encontramos que en este estudio se utilizó para la maceración acetona, etanol y cloroformo, mientras que en nuestro estudio solo se utilizó etanol. Otra diferencia importante se encuentra en el Agar utilizado, ya que en ese estudio se utilizó agar nutritivo, mientras que en nuestro estudio se usó agar Müller Hinton. Por lo cual es preciso mencionar que el agar nutritivo es un medio simple comprado con el que usamos en este trabajo y como se mencionó en el párrafo anterior el tipo de agar puede influir en los principios activos de nuestro extracto. En dicho estudio además se elaboraron las concentraciones de 10%, 30% y 50%, las cuales también difieren de las concentraciones usadas en nuestro estudio, que como ya se mencionó se tomaron en cuenta por la efectividad encontrada en estudios previos. En cuanto a los resultados obtenidos con el extracto etanólico se encontraron halos de inhibición al 50% de 18 mm en promedio, los cuales fueron superiores a los de nuestro estudio, ya que obtuvimos un promedio de 15.51 mm (Tabla 1) a la misma concentración de 50%. Cabe mencionar que en dicho estudio no se hicieron otras pruebas como la concentración mínima inhibitorio o la concentración mínima bactericida para poder contrastar con nuestro estudio.³³

En cuanto a la actividad antimicrobiana de *Myrciaria dubia* ha sido demostrada en algunos trabajos previamente, pero no contra cepas de bacterias resistentes. Castillo y col (2013) demostró su actividad antimicrobiana contra sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Trabajaron con la cáscara de camu camu, y con las mismas concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. Determinaron su susceptibilidad y concentración mínima inhibitoria, pero no la concentración mínima bactericida a diferencia de nuestro estudio. Sin embargo, ellos determinaron que la concentración mínima inhibitoria fue del 75% contra la bacteria con el método del conteo de UFC, lo cual difiere de nuestro estudio, ya que, en nuestro caso, fue determinado por espectrofometría. En nuestro estudio se determinó la concentración mínima bactericida usando el conteo de UFC. En cuanto a los halos de inhibición, fueron máximos al 100% con un promedio de 23.69 mm, sin embargo, en nuestro estudio a la misma

concentración se encontraron halos de 25,72 mm a pesar de haber usado una cepa resistente. Esto posiblemente se diferencia en el método utilizado para la elaboración del extracto ya que ellos utilizaron tan solo 20 gr de cáscara pulverizada en 30ml de etanol al 96° y finalmente extrajeron 150 ml, mientras que en nuestro estudio utilizamos 300 gr de cáscara pulverizada con 1400 ml de etanol al 70° y extrajimos 750 ml para la elaboración de las diferentes concentraciones.²⁰

A pesar que no existen estudios previos de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales contra *Pseudomonas resistente* a carbapenémicos, si se han realizado estudios con otras bacterias resistentes. Tam y col (2015) determinó que *S. aureus metilino* resistente, fue sensible a las cuatro concentraciones del extracto etanólico de cascara de *Citrus limo* (limón), al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Sin embargo, no se determinaron la CMI, ni la CMB, a diferencia de nuestro estudio. Además, Castillo y col (2017) demostraron la actividad antimicrobiana de extracto total de hojas de *Cucurbita moschata*, encontrando que *S. aureus metilino* resistente fue sensible al extracto hexánico, pero se demostró que el extracto etanólico del mismo no obtuvo inhibición significativa frente a este patógeno.^{34, 35}

La actividad antibacteriana de camu camu, se puede explicar por su gran contenido de compuestos fenólicos, sobre todo flavonoides, los cuales son capaces de inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, en lo cual los autores sugieren que el anillo B de flavonoides sería el principal responsable de la inhibición de la síntesis del ADN y ARN. Es importante mencionar a las catequinas, un tipo de flavonoides, que son capaces de producir daños en la membrana celular bacteriana, lo cual puede explicarse por dos teorías: perturban la bicapa lipídica, al penetrar de una manera directa o también pueden producir una interrupción en la función de barrera, una vez ocurrido esto, van a ocasionar la salida de los componentes celulares. En cuanto a los licocalcones (también flavonoides), inhiben a la NADH-citocromo reductasa y de esta manera inhiben el metabolismo energético.³⁶

Los resultados encontrados en este trabajo apoyan con nueva evidencia en el campo de la investigación tanto clínica como farmacológica, lo cual

constituye alternativas eficientes de tratamiento con el beneficio de ser muy efectivas y de bajo costo, para poder tratar infecciones como las producidas por el patógeno estudiado en esta investigación. Incluso esto podría aplicarse en estudios in vivo que permitan desarrollar aún más las investigaciones farmacológicas de este fruto.

V. CONCLUSIONES

- ✓ El extracto etanólico de *Myrciaria dubia* “camu camu” si tiene efecto antimicrobiano in vitro contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.
- ✓ PARC es susceptible al extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “Camu camu” en las 4 concentraciones utilizadas.
- ✓ La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “Camu camu” contra cepas de PARC fue de 25%.
- ✓ La concentración bactericida del extracto etanólico de la cáscara de *Myrciaria dubia* “Camu camu” contra cepas de PARC fue de 100%

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere la realización de otros estudios para conocer más del espectro de actividad antimicrobiana de *Myrciaria dubia*.
- ✓ Sería conveniente realizar otro tipo de extractos de cáscara *Myrciaria dubia*, para poder comparar su efectividad antimicrobiana.
- ✓ Se recomienda el uso de *Myrciaria dubia* para un estudio in vivo donde se pueda evaluar la efectividad que puedan tener sus componentes activos, así como también poder determinar su dosis terapéutica en humanos.
- ✓ Se sugiere finalmente tener en cuenta que puede haber variaciones en la concentración del extracto etanólico, al hacer el método de dilución en tubos, lo cual no se tuvo en cuenta en nuestro estudio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santella G, Pollin S, Docquier J, Almuzara M, Gabriel G, Rossolini G, Radice M. Resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*: un ejemplo de interacción entre distintos mecanismos. *Rev Panam Salud Publica* [Internet] 2011 [consultado el 02 Oct 2019]; 30(6): 545-546. Disponible en: <https://www.scielo.org/pdf/rpsp/2011.v30n6/545-548/es>
2. Villa L, Cortés J, Leal A, Meneses A, Meléndez M. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos. *Rev Chilena Infectol* [Internet] 2013 [consultado el 02 Oct 2019]; 30 (6): 605-610. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n6/art05.pdf>
3. González AL, Leal AL, Cortés JA, Sánchez R, Barrero LI, Castillo JS, et al. Efecto del tratamiento antibiótico inicial adecuado sobre la mortalidad en pacientes en estado crítico con bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomédica*. [Internet] 2014 [Consultado el 02/03/19]; 34(1):58- 66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1691>
4. Jeong, S. J., Yoon, S. S., Bae, I. K., Jeong, S. H., Kim, J. M., & Lee, K. Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. [Internet] 2014. [consultado el: 03/08/18]; 80(2), 130–135. Disponible en: <http://dx.doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.003>
5. Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerg Microbes Infect.* [Internet] 2016; 5(3), 1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.22>
6. Orellana L. Mortalidad por bacteriemia causada por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en un hospital de Lima-Peru, 2010-2017. [Tesis de Bachiller en medicina]. Lima: Universidad Federico Villarreal; 2018
7. Organización Mundial de la Salud, “Centro de prensa. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos

8. Ossa A, Echeverri L, Margarita Z, García M, Agudelo Y, Ramírez F, Ospina S. Factores de riesgo para infección por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en un hospital de alta complejidad. *Revista Chilena de Infectología*. 2014; 31 (4): 393-399.
9. Bravo, L. Resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa*: situación epidemiología en España y alternativas de tratamiento. [Tesis de bachiller en farmacia]. Madrid: Universidad Complutense; 2018
10. Nascimento OV, Boleti AP, Yuyama LK, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh) fruit in rat model of diet-induced obesity. *An Acad Bras Cienc*. 2013; 12 (2): 1-9
11. Pacci K, Nuereña L, Vásquez J, Araujo G, Gálvez M. Eficacia tópica de *Myrciaria dubia* en la curación de quemaduras de segundo grado en ratas Holtzman. *CIMEL*. 2009; 14(1): 15-20.
12. Cassia M, Patrocinio JR, Silva RF, Lopes JP, Ozaki LK, Silva. Hypolipidemic effect of camu-camu juice in rats. *Rev Nutr Campinas*. 2012; 25(1):35-44.
13. Arellano E, Rojas I, Paucar L. Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. *Scientia Agropecuaria* 2016; 7 (4): 433 – 443.
14. Myoda T, Fujimura S, Park B, Nagashima T, Nakagawa J, Nishizawa M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010; 8 (2): 304 – 307.
15. Ulloa G, Aguilar M, De Lama L, Camarena J, Del Valle J. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(11): 928–931.
16. Mori T, Ruiz E., Bardales J, Garcia M, Tresierra A, Arevalo L. Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dubia* (camu camu) y *Cyperus luzulae* (piri piri) sobre microorganismos patógenos. 2013; 4(1): 49-57.
17. Cunha-Santos, E. C. E., Viganó, J., Neves, D. A., Martínez, J., & Godoy, H. T. (2018). *Vitamin C in camu-camu [Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods*. *Food Research International*. [Internet] 2018 [Consultado 01 Ene 2019]; 115(1): 160-166. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.031>.

18. Tai Kaneshima, Takao Myoda, Kazuki Toeda, Takane Fujimori & Makoto Nishizawa. Antimicrobial constituents of peel and seeds of camu-camu (*Myrciaria dubia*), Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. [Internet] 2017 [Consultado: 06 Agosto 2018]; 81(8): 1461-1465. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1320517>
19. Rengifo, E. Camu camu – *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. Lima, Perú: Perúbiodiverso. 2009.
20. Castillo, C. Efecto inhibitorio in vitro de *Myrciaria dubia* “Camu-camu” sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. [Tesis de bachiller en medicina]. Trujillo: Universidad Nacional De Trujillo; 2013.
21. López, A. Efecto antibacteriano del zumo de *Myrciaria dubia*, *Citrus grandis* y *Citrus reticula* sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Cientifi-k 2017; 5(1): 88-92.
22. Duraffourd C, D’Hervicourt, L Lapraz J. Cuaderno de fitoterapia clínica. Barcelona: Masson, 1987.
23. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles- an antimicrobial study. Sci technol. Adv. Mater, 2008.
24. Gonzales L, Morales L, Armas L, Fernandez G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. [internet]. 2014. [citado el 07/12/18]; 62(2): 41-67. Disponible en: DOI: 10.15381/anales.v62i2.4167
25. Benites C Efecto inhibitorio In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (“tara”) sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028. [Tesis de Bachiller en Medicina]. Trujillo: Universidad Nacional De Trujillo; 2016.
26. Rodriguez J. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Fragaria ananassa* “fresa” sobre *Microsporum gypseum*. [Tesis de bachiller en medicina]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2019.
27. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007.
28. Zarate M. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* “Tara” sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo en el año 2014. Pueblo cont. 2015; 26(1): 16-23

29. Cassia M, Patrocinio JR, Silva RF, Lopes JP, Ozaki LK, Silva. Hypolipidemic effect of camu-camu juice in rats. *Rev Nutr Campinas*. 2012; 25(1):35-44.
30. Rojas J, Velasco J, Buitrago A, Mender T, Rojas J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar. *Rev Fac Farm*. [Internet] 2016[consultado 02 oct 2019]; 58(1): 2-10. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/312941237>
31. Bernal R, Rodriguez I, Salazar M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* "in vitro". *REBIOLEST* [Internet] 2014[consultado en 03 oct 2019]; 2(1): e22 Rodríguez C, Zarate A, Sánchez L. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*. [Internet] 2017[consultado el 03 oct del 2019]; 15 (27): 119-129. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>
32. Basilio AL, Simas MF, Araujo VM, Cristo OC, De Barros GS, Martin A. Screening of Amazonian plants from Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(1): 31-38.
33. Flores M, Naupari N. Inhibición de bacterias fitopatógenas (*Erwinia carotovora* subsp *carotovora* y *Pseudomonas cichorii*) a partir de extractos polifenólicos de cáscaras de Camu camu y carambola para la agricultura orgánica. [Tesis de bachiller en medicina]. Callao, Lima: Universidad Nacional Del Callao; 2017.
34. Tam M. Efecto inhibitorio in vitro de cáscara de *Citrus limon* (limón) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. [Tesis de bachiller en medicina]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2015.
35. Castillo A, Molineras P, Campo M, Bettin A. Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* Duchesne (Ahuyama). *Rev Cubana Plant Med*. [Internet] 2017[consultado el 03 oct del 2019]; 22(1): 1-13.
36. Tim TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antrimicrob Ag* 2005;26: 343-56.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Diámetros de halos de inhibición en mm del extracto etanólico de *M. dubia* en cuatro concentraciones sobre *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Control: Gentamicina

Halos de inhibición en mm del efecto inhibitorio in vitro de Concentración del extracto etanólico %		25	50	75	100	Control vancomicina	Control etanol
Número de repeticiones	1	15.01	15.99	18.54	25.01	25.01	6.00
	2	11.02	16.01	20.01	25.09	24.02	6.00
	3	13.02	16.01	19.46	23.59	25.01	6.00
	4	15.01	14.98	20.02	23.53	25.01	6.00
	5	11.03	15.99	19.98	25.01	30.01	6.00
	6	11.04	15.03	18.02	29.95	24.02	6.00
	7	13.05	16.01	19.01	25.09	24.02	6.00
	8	13.02	14.94	20.01	25.98	30.01	6.00
	9	11.03	15.03	19.21	28.92	24.02	6.00
	10	11.02	15.06	18.82	25.01	25.01	6.00
Promedio		12.43	15.51	19.31	25.72	25.61	6.00

Fuente: Datos obtenido por el investigador, año 2019

ANEXO 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

UFC del extracto etanólico de *M. dubia* en cuatro concentraciones sobre *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos. Control: Gentamicina

Concentración del extracto etanólico %		25	50	75	100	Control gentamicina	Control solución salina
Número de repeticiones	1	3	2	1	0	0	1.0×10^9
	2	2	1	0	0	0	1.0×10^9
	3	2	0	0	0	2	1.0×10^9
	4	0	0	0	0	0	1.0×10^9
	5	0	0	1	0	2	1.0×10^9
	6	5	0	0	0	0	1.0×10^9
	7	0	2	0	0	2	1.0×10^9
	8	1	0	0	0	0	1.0×10^9
	9	2	0	0	0	2	1.0×10^9
	10	3	0	1	0	2	1.0×10^9
Promedio		1.8	0.5	0.3	0	1	1.0×10^9

Fuente: Datos obtenido por el investigador, año 2019

ANEXO 3

Prueba de Duncan, halos de inhibicion

<i>Concentración de extracto etanólico mg/ml</i>	<i>ni</i>	<i>Grupos para alfa = 0.05</i>				
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>
<i>Control etanol</i>	<i>10</i>	<i>6.00</i>				
<i>250 mg/ml</i>	<i>10</i>		<i>12.43</i>			
<i>500 mg/ml</i>	<i>10</i>			<i>15.51</i>		
<i>750 mg/ml</i>	<i>10</i>				<i>19.31</i>	
<i>Control Gentamicina</i>	<i>10</i>					<i>25.61</i>
<i>1000 mg/ml</i>	<i>10</i>					<i>25.72</i>

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

Prueba de Duncan, UFC

<i>Concentración de extracto etanólico mg/ml</i>	<i>ni</i>	<i>Grupos para alfa = 0.05</i>		
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
<i>1000 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>0.00</i>		
<i>750 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>0.30</i>	<i>0.30</i>	
<i>500 mg/ml</i>	<i>10</i>	<i>0.50</i>	<i>0.50</i>	
<i>Control Gentamicina</i>	<i>10</i>		<i>1.00</i>	<i>1.00</i>
<i>250 mg/ml</i>	<i>10</i>			<i>1.80</i>

**No se incluyó la solución salina*

Fuente: Datos obtenido por el investigador, UPAO año 2019

ANEXO 4

FASE 1: ELABORACIÓN DEL EXTRACTO

PESADO DE LAS CÁSCARAS (3KG)



SECADO EN LA ESTUFA A 40°

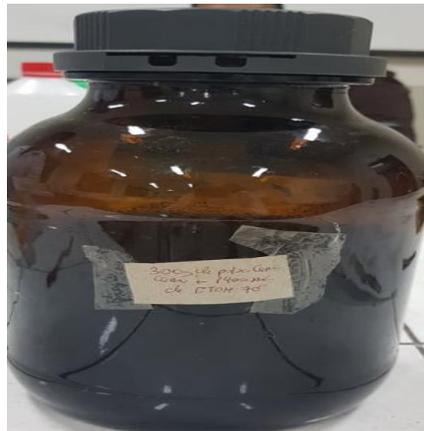


PULVERIZACIÓN Y PESADO DEL MATERIAL



PREPARACIÓN DEL MACERADO



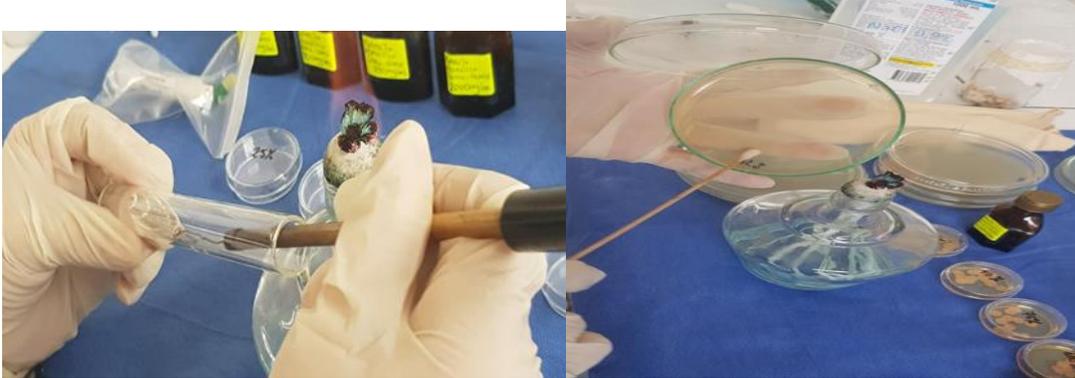


FILTRADO



FASE 2: DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

Sembrado



Método de Kirby-Bauer

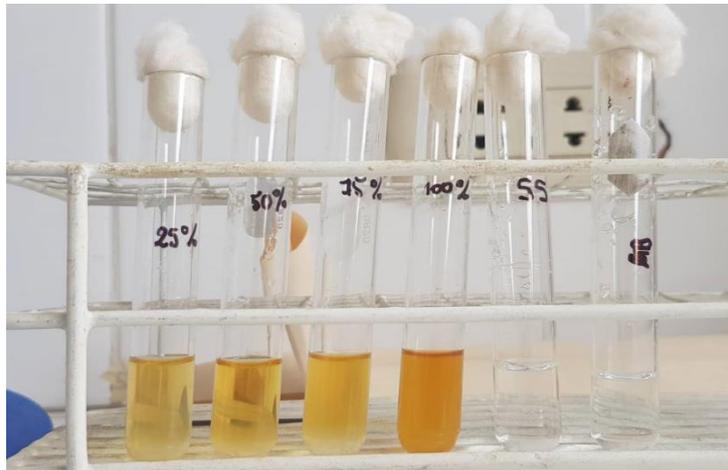


PASADAS 24 HORAS:



Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Técnica de diluciones en tubos



Determinar la concentración mínima bactericida (CMB)



CONTEO DE UFC

