

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de
Psilocybe cubensis sobre el crecimiento de
Staphylococcus aureus ATCC 43300**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

AUTOR

CABOS ZA VALETA, CARLO FEDERICO

ORCID: 0000-0002-6811-3277

ASESORA

HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA

ORCID: 0000-0003-0723-3491

TRUJILLO-PERÚ

2020

1. Título de la tesis

Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

2. Equipo de Trabajo

AUTOR

Cabos Zavaleta, Carlo Federico

ORCID: 0000-0002-6811-3277

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante de Pregrado,
Trujillo, Perú

ASESORA

Honores Solano, Tammy Margarita

ORCID: 0000-0003-0723-3491

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de
la Salud, Escuela Profesional de Odontología, Trujillo, Perú

JURADO

Pairazamán García, Juan Luis

ORCID: 000-0001-822-8009

Morón Cabrera, Edwar Richard

ORCID: 000-0002-4666-8810

Córdova Salinas, Imer Duverli

ORCID: 000-0002-0678-0162

3. Hoja de firma del jurado y asesor

Mgtr. Pairazamán García, Juan Luis

PRESIDENTE

Mgtr. Morón Cabrera, Edwar Richard

MIEMBRO

Mgtr. Córdova Salinas, Imer Duverli

MIEMBRO

Mgtr. Honores Solano, Tammy Margarita

ASESORA

4. Hoja de agradecimiento

Agradezco a mi familia y mis padres por su apoyo incondicional sin cada uno de ustedes no estaría cerca de ser la persona que soy ahora y de la persona en que todavía estoy trabajando por convertirme, y de verdad yo creo que no existen suficientes palabras en este mundo para expresarles todo mi agradecimiento por lo que hicieron.

Gracias a mi tía quien me acompañó en todas las etapas de mi vida hasta este momento, por darme el apoyo que necesitaba para construir un sueño que perseguir. A medida que crezco, me doy cuenta de cuánto hiciste por mí y por eso necesito realmente agradecerte algo que no creo que haya hecho adecuadamente hasta la fecha.

Agradezco a mis amigos que forman Idharia, y a mis amigos Brayan y Pierre, mis amistades que estuvieron siempre conmigo, gracias por los momentos inolvidables, las risas, las salidas y su ayuda, siempre me hicieron sentir como un hermano más. A ti Denis hermano te doy las gracias porque estuviste a mi lado apoyándome y brindándome tus conocimientos, incluso en los momentos más difíciles me estuviste apoyando y confiaste en mí, me ofreciste tu tiempo sin nada a cambio, gracias amigo.

Gracias a mis docentes y co-asesores por sus consejos, sus sabias palabras y por darme su apoyo incondicional para realizar este proyecto.

5. Resumen

En este estudio se determinó el efecto del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml y 40 µg/ml. Se tomó un tamaño de muestra de 14 repeticiones por cada concentración, se determinó la prueba de sensibilidad antibiótica mediante el método de difusión en agar o Kirby – Bauer, las placas con la bacteria fueron cultivados por 24 horas a 36 grados. En donde se evidenció un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 20 µg/ml en adelante, resultando en la presencia de halos con valores de 10.7 mm, 16.0 mm, 36.7 mm respectivamente, en comparación con el antibiótico control que presentó un halo de 37.3 mm y además se demostró que si existe diferencia significativa a través de las pruebas estadísticas de ANOVA por lo que se concluyó que el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* tiene mejor actividad antimicrobiana frente a los *Staphylococcus aureus*, a mayor concentración, demostrando el potencial que tiene esta seta.

Palabras claves: infección, inhibitorio, metanol, *Psilocybe*, *Staphylococcus*

Abstract

In this study, the effect of the *Psilocybe cubensis* methanolic extract on the growth of *Staphylococcus aureus* at concentrations of 10 µg / ml, 20 µg / ml, 30 µg / ml and 40 µg / ml was determined. A sample size of 14 repetitions was taken for each concentration, the antibiotic sensitivity test was determined by the agar diffusion method or Kirby-Bauer, the plates with the bacteria were grown for 24 hours at 36 degrees. Where an inhibitory effect of bacterial growth was evidenced from the concentration of 20 µg / ml onwards resulting in the presence of halos with values of 10.7 mm, 16.0 mm, 36.7 mm respectively, compared to the control antibiotic that presented a 37.3 mm respectively and it was also shown that if there is a significant difference through the ANOVA statistical tests, it was concluded that the methanolic extract of *Psilocybe cubensis* has better antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, at a higher concentration, demonstrating the potential of this mushroom

Keywords: infection, inhibitory, methanol, *Psilocybe*, *Staphylococcus*

6. Contenido

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de Trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor	iv
4. Hoja de agradecimiento y/o dedicatoria.....	v
5. Resumen y abstract	vi
6. Contenido	viii
7.Índice de gráficos, tablas y cuadros	ix
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura	3
III. Hipótesis	21
IV. Metodología.....	22
4.1 Diseño de la investigación.....	22
4.2 Población y muestra.....	23
4.3 Definición y operacionalización de variables.....	24
4.4 Técnicas e instrumento de recolección de datos.....	25
4.5 Plan de análisis	28
4.6 Matriz de consistencia.....	29
4.7 Principio éticos	30
V. Resultados.....	31
5.1 Resultados	31
5.2 Análisis de resultados.....	33
VI. Conclusiones	36
Aspectos complementarios	36
Referencias bibliográficas	37
Anexos.....	46

7. Índice de gráficos, tablas y cuadros

Tabla 1. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300.....	32
Tabla 2. Comparación del Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 con la prueba de DUNCAN	33

I. Introducción

Con el transcurrir de los años, los avances de la biotecnología han permitido clasificar e identificar aproximadamente 700 microorganismos que colonizan la cavidad oral, entre las cuales tenemos bacterias comensales y algunos patógenos como el género *Staphylococcus* que se les asocia con la presencia de afecciones orales.¹

El microambiente que ofrece la cavidad oral, permite el desarrollo de los microorganismos, porque las condiciones como: temperatura, humedad y nutrientes, contribuyen de forma natural a la colonización de bacterias y hongos sobre los tejidos orales². Por ello entender el microbioma oral, es una tarea compleja que debe tratarse desde un enfoque científico, debido a la gran variedad de especies de bacterias que se encuentran allí y que originan los procesos infecciosos en la boca para proponer nuevos métodos y estrategias preventivas.³

Los alcaloides han sido considerados como nuevos compuestos antibacterianos⁴, dentro de los alcaloides tenemos heterocíclicos aromáticos como es el caso de la psilocibina una triptamina, que es producido por hongos del género *Psilocybe*.⁵

La psilocibina es considerada un alcaloide indólico que conserva en gran parte el esqueleto del aminoácido que le da origen, guardando gran similitud estructural con el aminoácido triptófano.⁵

La interacción entre algunos alcaloides y las bacterias puede resultar en efecto favorable en la inhibición del crecimiento. Algunas especies como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* han sido enfrentadas a compuestos indólicos puros y sintetizados, demostrando estos compuestos su eficacia contra estos patógenos.⁶

El papel del *Staphylococcus aureus* en la mayoría de las infecciones orales es virulenta, tiene la capacidad para evolucionar y crear genes que la vuelven resistente a los antibióticos actuales como la penicilina, eritromicina, estreptomina, y tetraciclinas además este microorganismo está considerado como modelo para los enfoques biotecnológicos por su potencial patógeno.⁸

Por ello el objetivo de esta investigación fue determinar, si existe efecto inhibitorio, *in vitro* del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* a concentraciones de 10, 20, 30, 40 µg/ml sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Esta investigación logró evidenciar un efecto inhibitorio del crecimiento a partir del extracto metanólico de *P. cubensis* sobre cepas de *S. aureus*, que pueden ser encontradas como bacterias oportunistas en la cavidad bucal, los principios activos contenidos en este extracto servirían como un aporte en el diseño de nuevos fármacos y tratamientos contra las infecciones en donde está presente esta bacteria oportunista, logrando así eliminar las infecciones en menor tiempo y darle una mejor calidad de salud al paciente.

Los resultados de esta investigación han demostrado un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 20 µg/ml en adelante, resultando en la presencia de halos con valores de 10.7 mm, 16.0 mm, 36.7 mm respectivamente, en comparación con el antibiótico control que presentó un halo de 37.3 mm y además se demostró que si existe diferencia significativa a través de las pruebas estadísticas de ANOVA y se concluyó que el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* tiene mejor actividad antimicrobiana frente a los *Staphylococcus aureus*, a mayor concentración, demostrando el potencial que tiene esta seta.

II. Revisión de la Literatura

2.1 Antecedentes

Ragupathi V.⁹ (India, 2018) En su estudio “Antibacterial activity, *in vitro* antioxidant potential and gc-ms characterization of methanolic extract of *gymnopilus junonius*, a wild mushroom from southern western ghats, India” tuvo como objetivo demostrar la actividad antibacteriana, del hongo de la risa por poseer fitocomponentes similares al *Psilocybe cubensis*. El tipo de investigación que realizó fue cuantitativa experimental. El estudio especifica que los hongos fueron cosechados del mismo ambiente silvestre, fueron lavados y conservados a 4°C, de allí se deshidrataron y fueron pulverizados en un mortero, luego este resultado se diluyó en metanol y se filtró la mezcla para obtener el extracto metanólico, las concentraciones que se usaron para determinar el efecto antibacteriano fue de 20, 40, 60 y 100ug/ml mediante difusión de disco “Kirby -Bauer” y se usó amoxicilina como control positivo frente a una especie de bacterias Gram positiva, como el *E. faecalis*, la cual la tomamos como referencia para este estudio por ser Gram positiva como el *Staphylococcus aureus*. Los resultados demostraron un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 20 µg/ml en adelante, resultando en la presencia de halos con valores de 12 mm, 15 mm, 16 mm y 18 mm respectivamente, en comparación con el antibiótico control que presentó un halo de 14 mm. Concluyó que a medida que se incrementaba la concentración era mayor el efecto inhibitorio.

McCormack M.¹⁰ (Reino Unido, 2015) En su estudio “*Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection?”, Tuvo como objetivo demostrar la incidencia de *Staphylococcus aureus* MRSA y MSSA en múltiples patologías orales. Su estudio fue de tipo cuantitativo, no experimental, realizó un análisis comparativo de informes de 10 años de antigüedad de laboratorios que informaban sobre el aislamiento de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras clínicas orales y periorales infectadas. El resultado demostró que de 11312 muestras enviadas al laboratorio se han aislado 1986 especímenes (18%). Del cuál el 90% eran *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina y el 10% eran *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Concluyó que los *Staphylococcus* son microorganismos constituyentes del microbioma oral y que tienen un papel importante en la patogenia infecciones orales.

Nowacka N, et al.¹¹ (Irlanda, 2015) En su estudio “Antibacterial, Antiradical Potential and Phenolic Compounds of Thirty-One Polish Mushrooms”. Tuvieron como objetivo determinar el efecto antibacteriano de 31 especies de hongos silvestres de Polonia. Su estudio fue cuantitativo y experimental, se recolectaron de forma silvestre 5 gramos de cada hongo entre ellos *Psilocybe fascicularis*, fueron lavados y de allí se liofilizaron y se molieron en un mortero, luego el polvo del hongo se mezcló con 50 ml de metanol en un matraz y se dejó reposar por 24 horas de allí se filtró para obtener un extracto puro libre de pedazos de los cuerpos fructíferos del hongo. La actividad antibacteriana se

realizó concentraciones que oscilaban entre 0,078 y 5 mg/ml mediante la prueba de Kirby- Bauer contra cepas Gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, El resultado del estudio demostró que la concentración inhibitoria mínima del extracto (MIC) de *Psilocybe fascicularis* tuvo un halo de 2.5 mm y la concentración bactericida mínima (MBC) tuvo un halo de 5.5 mm para *Staphylococcus epidermidis*, y que para *Staphylococcus aureus* la concentración inhibitoria mínima (MIC) fue de 2 mm y la concentración bactericida mínima (MBC) fue de 2.5 mm. Concluyó que los hongos silvestres constituyen una gran fuente de agentes antibacterianos

Tyls F.¹² (Chequia, 2014) En su estudio “Psilocybin, summary of knowledge and new perspectives” Tuvo como objeto demostrar que el *Psilocybe cubensis* posee una gran variedad de fitocomponentes que le atribuyen efectos etnofarmacológicos en especial su principio activo la psilocibina. Su estudio fue cuantitativo, no experimental realizó un análisis retrospectivo de casos clínicos donde se empleó psilocibina pura y las dosis que se describieron como seguras. El resultado de su estudio dio a conocer que la dosis de psilocibina en personas adultas es de 0.045-0.429 mg/kg vía oral y 1-2 mg por vía intravenosa. Y que los efectos secundarios solo se observan a dosis mayores de 15 mg vía oral o a niveles plasmáticos de 4-6 ng/ml. Estas medidas son necesarias para justificar este estudio ya que no se empleó psilocibina pura si no el cuerpo fructífero del hongo *Psilocybe cubensis* y todos sus fitocomponentes extraídos por el metanol. En conclusión, estas medidas se deben tomar en cuenta como

parámetros para realizar estudios *in vitro* ya que un 1 Kg de hongo seco produce 6.4 mg de psilocibina pura, por lo que las dosis para estudios deben ser inferiores.

Karaman M, et al.¹³ (Reino Unido, 2014) En su estudio “Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials” tuvieron como objetivo determinar el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de dos especies de hongos lignícolas: *Meripilus giganteus*, *Agrocybe aegerita*, que crecen de manera silvestre en Serbia. El tipo de investigación fue cuantitativo y experimental, se recolectaron 100 gramos de hongos y se limpiaron de allí se trituraron en un mortero, luego en un matraz se diluyó con 50 ml de metanol y con un filtro de papel se obtuvo el extracto metanólico a unas concentraciones de 20, 40 y 60 ug/ml. Luego se determinó el efecto antibacteriano mediante la prueba de difusión en agar “Kirby-Bauer” contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Los resultados demostraron que el extracto metanólico tuvo un efecto inhibitorio mayor a la concentración de 60 ug/ml con un halo igual a 2.3 mm. Concluyeron que los hongos silvestres poseen efecto inhibitorio ante *Staphylococcus aureus*.

Mahmood Z.¹⁴ (Inglaterra, 2013) En su estudio " Bioactive Alkaloids from Fungi: Psilocybin." tuvo como objetivo determinar los fitocomponentes del *Psilocybe* considerándolo una especie de hongo con efectos etnofarmacológicos

positivos. Su estudio fue cuantitativo, y experimental, empleó un análisis retrospectivo acerca del uso del *Psilocybe* y cultivó 100 gramos del hongo en condiciones de laboratorio para luego analizar sus fitocomponentes mediante una columna de cromatografía. Los resultados dieron a conocer que el *Psilocybe* contiene una variedad de alcaloides entre ellos la psilocibina que es una triptamina químicamente muy similar a la serotonina del cuerpo humano que solo en concentraciones mayores a 10 mg serían las iniciadoras del efecto alucinógeno, también halló lípidos, proteínas, compuestos antioxidantes y grupos indólicos, que son de interés para este estudio ya que se quiere demostrar que este hongo posee efecto antibacteriano atribuidos a estos componentes. Concluyó que se sugiere realizar estudios *in vitro* a nivel celular para determinar sus efectos ya que pueden ser útil y de gran interés médico.

Mohammed T.¹⁵ (Bélgica, 2012) En su estudio “Tryptamine-derived compounds as antibacterial agents”, tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano de los compuestos indólicos de la triptamina mediante la elaboración de un fármaco. Su estudio fue cuantitativo y experimental, desarrollo de una fórmula química para unir los compuesto indólicos extraídos de la triptamina un alcaloide que es un compuesto que contienen los *Psilocybes* de este estudio, a un fármaco con concentración de 4 ug/ml que sometió a una prueba de sensibilidad antibiótica frente a *Staphylococcus aureus* mediante un cultivo en agar Müller Hinton. El resultado demostró que hubo un efecto bactericida ya que el fármaco destruyó más del 63% de las colonias. Concluyó

que los compuestos indólicos extraídos de la triptamina poseen efectos inhibitorios frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*.

Jean N, et al. ¹⁶ (Francia, 2012) En su estudio “Novel indole derivatives, methods for preparing same, and use thereof particularly as antibacterial agents” Tuvo como objetivo demostrar el efecto antibacteriano de los compuestos indólicos, aclarando que ha sido extraído de una triptamina, mismo compuesto que contienen los *Psilocybes* de este estudio. Su estudio fue cuantitativo y experimental. Aplicó una fórmula química para sintetizar un fármaco que contenga estos compuestos indólicos, para aplicarlo mediante difusión por agar Müller-Hinton contra cepas de *Staphylococcus aureus* en la concentración de 10 ug/ml. Y como control positivo utilizó un fármaco conocido como ampicilina. Los resultados demostraron que sí hubo inhibición a la concentración de 10 µg/ml, correspondiente a un halo de 15 mm, siendo mayor que el halo del fármaco control. Concluyó que los compuestos indólicos poseen efecto antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Infección oral

Es una enfermedad común de etiología polimicrobiana que afecta y destruye los tejidos de la boca ya sean dentarios, de soporte y epitelial.¹⁷

Las infecciones orales se pueden presentar en forma de caries o absceso; por lo que puede ser clasificada en odontógenas y/o no odontógenas.

Sabemos que la infección comprende el desequilibrio del microbioma

oral; y que siempre hay que pensar en una posible bacteriemia por parte de los patógenos que albergan la boca, ya que las consecuencias podrían ser una infección ósea aguda y destrucción en los casos más graves.¹⁸ Afortunadamente las infecciones orales son controladas mediante la higiene oral y la prescripción de medicamentos.¹⁹

Las infecciones orales más conocidas de manera general son: infección de los tejidos blandos como estomatitis aftosas, estomatitis subprotésica, verrugas, infecciones víricas, osteomielitis de la mandíbula, problemas periodontales, infecciones periapicales e infecciones supurativas de las glándulas.²⁰

2.2.2. Origen de las infecciones orales

2.2.2.1. Odontógenas

Se describe como la infección biodinámica mixta en donde las bacterias anaerobias facultativas como *Staphylococcus aureus* son predominantes en abscesos periapicales, periodontitis, pericoronaritis, y osteomielitis.²¹

Para que estos microorganismos lleguen a colonizar la región ósea es necesario que exista antecedentes de infección, como una necrosis del tejido pulpar, de allí estas se desplazan hacia la región periapical y abarcan tejido circundante.²²

El tratamiento quirúrgico es el indicado en estos casos avanzados de infección ya que el hueso se encuentra comprometido, y la

administración de antibióticos debe ser gradual a medida que se observe una evolución favorable o desfavorable. Los antibióticos comúnmente usados son: penicilinas, como amoxicilina más ácido clavulánico y clindamicina.^{23, 24}

2.2.2.2. No odontógenas

Las lesiones no odontógenas están más asociadas con la formación de quistes, tumores mandibulares, que infecciones inflamatorias.²⁵ Cuando la patología se da sobre la mucosa y estructuras extradentales como: glándulas salivares, lengua, labio, paladar, y sus consecuencias puedan ser obstrucción de los conductos salivales; aparición de hongos clínicamente dando origen a mucormicosis y aspergilosis que se diseminan clínicamente permitiendo observar partes estructurales de la cara comprometidos con la infección.²⁶

2.2.2.3. Infecciones más comunes de la cavidad oral

Las infecciones orales más comunes son las infecciones periapicales, que inician como una lesión pulpar a causa de una caries no tratada a tiempo, su etiología es la mala higiene oral y la dieta enriquecida en hidratos de carbono, que permite la adhesión de microorganismos acidofílicos en el esmalte del diente, y que metabolizan y fermentan los azúcares creando un ambiente propicio para su desarrollo mientras desintegran los cristales de hidroxapatita del primer tejido dentario.

Algunas especies de bacterias oportunistas logran unirse en este grupo de bacterias acidofílicas para sobrevivir.^{27, 28}

Luego está la osteomielitis, que también es una infección de origen bacteriano, está principalmente asociado con *Staphylococcus aureus* MRS. Esta infección se extiende por los espacios medulares del hueso. Los signos y síntomas más relevantes son fiebre, dolor localizado y pérdida de sensibilidad local.²⁹

2.2.3. Microorganismos más frecuentes en las infecciones orales

El microbioma oral contiene más de 300 especies de bacterias conocidas, además de organismos no cultivables que han sido descubiertos con técnicas moleculares, destacándose recientemente estudios del microbioma bucal, por pirosecuenciación.³⁰

Streptococcus mutans, estas bacterias son cocos Gram positivos, que se disponen en cadenas cortas de 4 a 6 cocos o largas, los cuales miden de 0,5 a 0,8 µm de diámetro, anaerobios facultativos, forman parte de la flora microbiana de cavidad oral y también de las vías respiratorias altas, se les denomina también como patógenos oportunistas que producen enfermedades como la caries dental y la endocarditis bacteriana. Este microorganismo produce ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos se transportan a través de la placa dental hacia el esmalte, liberando hidrogeniones, los cuales

disuelven con rapidez los minerales del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, salen fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización.³⁰

Candida albicans, este género comensal es el más representativo en la cavidad bucal, aparece principalmente en la lengua y el paladar. Este hongo presenta características similares a *Enterococcus faecalis*, puede invadir los túbulos dentinarios debido a sus enzimas colagenolíticas que le permite degradar la matriz orgánica y producir en ella biopelículas que pueden resistir a los ataques de los monocitos y a varios agentes antifúngicos.³¹

Enterococcus faecalis, es la bacteria más representativa que se encuentran en la mayoría de fracasos endodónticos, se caracteriza por sobrevivir en condiciones que son comúnmente letales para otros microorganismos, como crecer en ambientes con bajo contenido de nutrientes, tener un alto potencial redox, poseer resistencia en condiciones anaeróbicas, establecerse en un amplio rango de temperatura, pH y concentraciones de sal, como el hidróxido de calcio. Además, tienen la capacidad de invadir el túbulo dentinal, utilizar el colágeno de la dentina para formar una biopelícula.³²

Staphylococcus aureus, es la bacteria resistente más representativa de las infecciones orales con resistencia a los antibióticos, esta especie son cocos Gram positivos de 0,5 a 1.5 µm de diámetro, su agrupación es irregular parecido a un racimo de uvas, si bien es un microorganismo

inmóvil y no esporulado, figura dentro de los microbios no esporulados con más resistencia. Este microorganismo puede tolerar bastante los cambios de temperatura ya sea el calor, la desecación e incluso algunos antisépticos y concentraciones salinas.³³

Esta es la especie patógena coagulasa-positivo más aislada de las infecciones orales y es muy temido por ser responsable de altas tasas de morbimortalidad.³³

En otras palabras, este microorganismo es capaz de producir infecciones tanto localizadas como diseminadas que afectan a cualquier órgano o tejido con diferente gravedad llegando a causar la muerte.³³

En los cultivos *Staphylococcus aureus* es muy fácil de identificar por la producción de un pigmento amarillo dorado que le da el nombre a la especie, además la capacidad de fermentar manitol y segregar una enzima que coagula el plasma (coagulasa), permite su reconocimiento.³³

2.2.4. *Staphylococcus aureus* y sus factores virulentos

Los *Staphylococcus aureus* poseen un antígeno específico ubicado en la pared celular “proteína A”, unido a un mucopéptido que está ahí presente, este se une a la región Fc de la IgG, para dar paso a la actividad antifagocítica. También la ayuda a aumentar su capacidad para adherirse sobre las demás células del huésped y sobre las superficies protéticas. El péptidoglucano que posee en la pared, actúa como una endotoxina, atrae

leucocitos PMN y activa la lisozima, podría decirse que contribuye a la respuesta inflamatoria.³³

Los ácidos teicoicos que posee la bacteria, favorecen la adhesión, al igual que la capa de limo, constituida por hidratos de carbono y proteínas extracelulares, esta capa facilita la adhesión e inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis.³³

Entre las enzimas que posee, una de las más conocidas es la coagulasa o factor clumping, de la cual existen hasta ocho tipos. La coagulasa formaría un coágulo que internalizaría el microorganismo haciéndolo más difícil de fagocitar. Claro está que este no es el único factor de patogenicidad.³³

La hemolisina estafilocócica o toxina alfa, beta, gamma y fi se diferencian por el tipo de eritrocitos que lisan. Estas toxinas también actúan sobre otras células y son auténticas del género *Staphylococcus*.³³

Los productos que producen son: penicilinasas o B-lactamasas que destruye la penicilina; catalasa que interfiere sobre mecanismo de defensa dependientes del oxígeno; Hialuronidasa; fosfodiesterasa que cliva el ácido nucleico; lipasa; fibrinolisisina o estafilocinasas: que es muy semejante a la estreptoquinasa.³³

Se han encontrado infecciones endodónticas, abscesos periapicales, infecciones de las glándulas salivales, hasta casos de osteomielitis de los

huesos maxilares que han sido causadas por microorganismos de este género.³³

2.2.4.1. *Staphylococcus aureus* y medicamentos resistentes

Todos los microorganismos cuando se exponen a cualquier sustancia natural o química buscan sobrevivir mediante una capacidad llamada adaptación. En este caso las cepas de *Staphylococcus aureus* son conocidos porque tienen la capacidad de mutar cromosómicamente y adquirir resistencia a todos los antibióticos desarrollados.³⁴

Los *Staphylococcus aureus* producen B- lactámicos que los hacen resistentes contra las penicilinas, debido a que poseen el gen *mecA* que produce una proteína de unión llamada PBP (penicillin-binding protein), PBP 2A que tiene muy poca afinidad por los B- lactámicos.³⁴

Por otro lado, el engrosamiento de la pared celular le permite la disminución del entrecruzamiento, por lo que es más posible que las moléculas de los antibióticos sean atrapadas en la pared externa antes de llegar a la membrana plasmática donde actúan las transglucosilasas, a este mecanismo se le conoce como “atrapamiento por afinidad” la cual retiene la estructura y actividad biológica de los antibióticos.³⁴

La mutación es sumamente importante es una gran ventaja que tienen las bacterias después de sufrir algún déficit, porque llegan a superar sus contrapartes sensibles estando expuestas hasta en un medio libre de antibióticos.³⁴

2.2.4.2. ATCC del *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ATCC 43300 es una cepa de control para pruebas de susceptibilidad y como cepa de control de calidad para productos comerciales. Este ATCC es un aislado clínico con la designación Seattle 1945 que se utiliza como cepa de control de pruebas de laboratorio estándar. Es sensible a una variedad de antibióticos, incluida la meticilina.³⁵

El ATCC con microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental. Sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo y al tener esta documentación, el laboratorio evitará realizar pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos.³⁵

Tipos de cepas:

Cepas de referencia: Son cepas cultivadas una sola vez.³⁵

Cepas de reserva: Son unas copias idénticas logradas de las cepas de referencias mediante un subcultivo único y se mantienen en liofilización, ultra congelación rápida, entre otros métodos.³⁵

Cepas de trabajo: Se obtienen por subcultivo de las cepas de reservas y contienen indicaciones sobre su tiempo y manipulación para uso rutinario.³⁵

Las bacterias obtenidas por este medio tienen certificado de control de calidad de pureza y viabilidad por cada vez que se realice la réplica de la bacteria no perderá sus propiedades y mantendrá sus caracteres bioquímicos.³⁵

2.2.5. *Psilocybe cubensis* (seta)

2.2.5.1. Origen

Según estudios realizados por Giorgio Samorini, estas setas existen desde hace más de 6000 años a. C. en el desierto de Argelia, debido a que perduran grabados en piedra que datan entre los 5000 y 7000 años a. C. los datos antropológicos en latino américa descubrieron que hace menos de 1000 años la cultura maya y azteca consumía setas alucinógenas con fines psicoactivos, y estaban asociados a usos principalmente sagrados. Estas las representaban mediante esculturas denominadas piedras-hongo.^{36,37}

Los estudios sobre localidades que contienen setas alucinógenas son; en América desde Estados Unidos hasta México, en Asia en, India, Tailandia. Los lugares con más recolección de setas son España, que en épocas de otoño y primavera se aprecian setas alucinógenas de tipo *Psilocybe*; y México que es el país que contiene más especies de hongos alucinógenos a escala mundial gracias al tipo de suelo y clima adecuado para que se desarrolle y se reproduzcan.^{38,39}

Con respecto al Perú, no se ha detallado oficialmente la presencia de alguna especie en concreto perteneciente al género *Psilocybe*, sin embargo, la literatura refiere que durante el periodo comprendido entre los años 800 – 100 a. C. la cultura Paracas tiene predominantemente representaciones de hongos en sus finos textiles, al punto de representar un proceso de volar como chaman, con dos estructuras como setas en sus dos manos. La interpretación que esta cultura le daba era que uno podía adquirir visiones con la ingesta de hongos enteógenos del género *Psilocybe*.⁴⁰

De igual forma se encuentra la cultura Moche durante los años 100 a. C. – 800 d. C. quienes han producido cerámicas con las representaciones más realísticas del Perú. Sus obras muestran en forma clara que los hongos jugaron un rol importante en el antiguo Perú. Con el arte Moche es posible tener una oportunidad única de entender la mente y los rituales en esta época. Los Moche representaron los hongos con tal precisión que en algunos casos es posible asociar e identificar las especies hasta el género sin conocer ni haber encontrado el hongo en el campo. En una imagen el ‘curandero’ está atendiendo una persona evidentemente enferma, sobre su cabeza, una seta de un hongo muy prominente. Es una manifestación del uso medicinal de hongos en el antiguo Perú. Otra imagen contiene una seta tan en detalle que es posible identificarlo hasta por grupos específicos: láminas blancas, separados del tallo, con una bifurcación al fin, y su estípote (tallo) de color marrón

claro muy similar al género *Psilocybe*. En una cerámica el sombrero de la seta, de color rojo con puntos blancos, es sin duda la Amanita muscaria, un hongo muy bien conocido y sagrado en México, Asia y Europa, además, asociado con muchos cuentos folclóricos. Estas cerámicas solas muestran sin duda que las setas de hongos jugaron un rol importante en la vida social Moche y en diversos pueblos peruanos Pre Hispánicos.⁴⁰

Existen 31 especie y variedades de *Psilocybe* de las cuales 27 son alucinógenas, los principales hábitats son: estiércol; jardines y tierras removidas, bosques, pastos. Y la especie *Psilocybe cubensis* es una seta que crece directamente sobre excremento de vacuno, equino; por lo que su corta vida, tarda lo que demora el excremento en descomponerse. El género *Psilocybe* posee un cuerpo fructífero, a excepción de las laminillas, se torna azul-verdoso al tocarlas y presenta un olor y sabor semejantes a los de la harina fermentada.⁴⁰

2.2.5.2. Componentes de los basidiocarpos de *Psilocybe cubensis*,

Posee psilocibina, este alcaloide pertenece al grupo de las triptaminas, se propone su empleo debido a la similitud estructural referenciadas en antecedentes en donde alcaloides de este grupo lograron un efecto antibacteriano contra bacterias del género *Staphylococcus*.⁴¹

Este alcaloide es producido de manera natural por hongos del género *Psilocybe*, entre ellos la especie *Psilocybe cubensis* la cual, se basa en

el aminoácido triptófano para realizar la síntesis de este alcaloide, conservando en gran parte la estructura indólica.⁴¹

2.2.5.3. Principios activos del hongo género *Psilocybe*

Hoffman y Mandrile refieren que la cantidad de psilocibina que posee a la seta varía de 0,01% cuando el cultivo se encuentra en fase micelial, hasta 0,6 % cuando se han formado basidiocarpos inmaduros, mientras que la de psilocina es sensiblemente menor (0,05%), por otro lado, se encuentra la baeocistina y norbaeocistina en cantidades trazas. Hofmann³⁹ y sus colaboradores dilucidaron las estructuras de psilocibina y baeocistina en 1959. Más tarde, se describieron los análogos de demetilo baeocystin y norbaeocystin. El orden de los eventos biosintéticos que llevan a la formación de psilocibina con su exclusivo grupo 4-fosforiloxi en el núcleo del indol se publicó en 1968. Se propuso que el L-triptófano primero sufre una descarboxilación para producir triptamina, seguido de N, N-dimetilación sucesiva, hidroxilación C-4 y 4-O-fosforilación.⁴²

Las triptaminas están formadas por compuestos indólicos, y una base nitrogenada, se le otorga propiedades, farmacéuticas y antibacterianas, ³⁹ se ha demostrado que se puede obtener nuevos antibacterianos a base de esos compuestos, con diferentes resultados y altas concentraciones inhibitorias sobre bacterias sensibles y resistentes del tipo Gram positivo como *Staphylococcus aureus*.⁴²

2.2.6. Enfrentamiento entre *Staphylococcus aureus* y *Psilocybe cubensis*

Staphylococcus aureus tiene la capacidad de generar genes resistentes a los antibacterianos. La estructura química del alcaloide psilocibina, intervendría en el desarrollo de esta bacteria dando paso a la acción antibacteriana, inhibiendo la pared celular del *Staphylococcus aureus*.⁴²

III. Hipótesis

A medida que se incrementa la concentración del extracto metanólico a 10, 20, 30, 40 µg/ml, disminuirá el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en condiciones de laboratorio.

IV. Metodología

4.1. Diseño de la investigación

Es de diseño **experimental**, porque las variables han sido manipuladas, de tal manera que existe una variable dependiente y una variable independiente, para determinar una respuesta mediante el fenómeno de causa y efecto.⁴¹

Tipo de la investigación: Según el enfoque el estudio, es cuantitativo, porque buscó establecer una cantidad de elementos en relación al tamaño de muestra.

41

Transversal porque, la recolección de los datos se midió solo una vez en el tiempo.⁴¹

Prospectivo porque, se preparó todo en un tiempo determinado y luego se analizaron transcurrido un determinado tiempo.⁴¹

Nivel de la investigación: El presente trabajo es una investigación de nivel explicativo, porque se contestó el por qué o la causa del comportamiento de una variable sobre la otra, buscando una explicación mediante los antecedentes de este estudio.⁴¹

4.2. Población y muestra

La población estuvo conformada por las placas petri con inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Muestra:

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

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 * 2(0.95 * (\bar{x}_1 - \bar{x}_2))^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

$$n = 14.15$$

$$n = 14$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$; coeficiente de la distribución normal para un $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$; coeficiente de la distribución normal para un $\beta = 0.20$

$S = 0.95 (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ el cual es un valor asumido por no haber información sobre los valores paramétricos en estudios similares.

Criterios de inclusión

Basidiocarpos inmaduros

Criterios exclusión

Basidiocarpos con contaminación

Basidiocarpos adultos

Basidiocarpos con malformaciones

Placas Petri con inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 contaminadas

4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Valor final	Tipo	Escala de medición
Extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> (Independiente)	Sustancia activa vegetal del hongo <i>Psilocybe cubensis</i> elaborado a base de metanol, que tiene propiedades fitofarmacológicas. ¹⁵	Concentrado obtenido, mediante la maceración.	Tiempo de maceración	µg /ml	Categórica	Ordinal
Efecto inhibitorio sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (dependiente)	Capacidad de una sustancia para alterar y bloquear el proceso de desarrollo y crecimiento celular. ¹¹	Tamaño del diámetro del halo de inhibición.	Halo de inhibición	mm	Cuantitativo	De razón

4.4. Técnicas e instrumento de recolección de datos

Técnica: La presente investigación utilizó la técnica de observación.

Instrumento: Para medir el efecto antibacteriano se utilizó un vernier digital calibrado de acuerdo a la norma ISO 9001 - 17025.

Procedimientos:

Método cultivo de la seta

El micelio de *Psilocybe cubensis*, fue proporcionado por el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo.

Subcultivo de *Psilocybe cubensis*

En el laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo se sembró *P. cubensis* en un medio de Agar papa dextrosa (PDA) a una temperatura de 27 °C por un periodo de 5 días hasta obtener micelio listo para propagar.⁹

Figura 1

Propagación de micelio de *Psilocybe cubensis*

Se colocó trozos del medio de cultivo de PDA que contenía micelio sobre arroz integral cocido y pasteurizado, y se dejó incubar a 27 ° C por 12 días. El arroz estuvo guardado en 12 frascos de polietileno de 1L de capacidad.⁹

Producción de basidiocarpos de *Psilocybe cubensis*

Se realizó el sustrato a base de abono de vaca y arroz integral en proporciones 2:1 en condiciones estériles; en una caja de plástico con orificios y se sometió a

oscuridad por 3 días, para verificar que la superficie haya colonizado uniformemente. En cuanto a la humedad se verificó con un tergo higrómetro que llegue a 90%.⁹ Figura 2

El tiempo de incubación para obtener los basidiocarpos inmaduros demoró alrededor de 3 semanas.⁹

Método de preparación del extracto metanólico

Selección de basidiocarpos

Se seleccionaron basidiocarpos inmaduros, para no obtener esporas en el proceso, y luego se colocaron en una placa Petri para su secado.¹² Figura 3

Desecado y pulverización

Se llevó a desecar a una temperatura de 40 ° C por 24 horas en la estufa, luego se llevaron a pesar a la balanza de gramos digital y se obtuvo 16 gramos de hongos secos, que fue colocado en un mortero y pilón y fueron pulverizarlos y vaciados en un recipiente de pírex.¹² Figura 5

Extracción y filtrado

Los 16 gramos de *Psilocybe cubensis* pulverizados, se mezclaron con 100 ml de metanol dentro de un envase color ámbar y se dejó reposar por 24 horas. Figura 7 y Figura 8

Se filtró la mezcla con un papel whatman N°1 (Figura 10) colocado en la boca de un embudo marca pírex, una vez que se obtuvo el extracto purificado, se conservó en refrigeración en un envase color ámbar. Para determinar las

concentraciones, se extrajeron 10 ug/ml; 20 ug/ml; 30 ug/ml y 40 ug/ml con una micropipeta. Figura 11 y Figura 12

Obtención de la cepa de *Staphylococcus aureus*

Se adquirió la cepa de ATCC (Figura 13), y se reactivó mediante caldo de BHI.

Conservación y mantenimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus*

El cultivo puro de *Staphylococcus aureus* se mantuvo en caldo BHI y medio Agar Tripticasa Soya (TSA) hasta su utilización.¹³

Evaluación de la susceptibilidad antibacteriana

La evaluación del efecto antibacteriano del extracto metanólico sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar. Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Estandarización del inóculo de *Staphylococcus aureus*

El cultivo puro de *Staphylococcus aureus* mantenido en Caldo BHI se cultivó en medio Agar TSA y fue llevado a incubación a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener colonias jóvenes.¹³

Luego, de 24 horas cada colonia de *Staphylococcus aureus*, se colocó en caldo BHI y se hicieron suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bact./mL).¹³ Figura 16.

Inoculación

Luego de 15 minutos al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con una jeringa de tuberculina estéril sumergido en la suspensión, luego se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa con un asa de digralsky. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.¹³ Figura 18

Preparación de los discos con extracto metanólico

Se prepararon 56 discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con cada una de las concentraciones de 10, 20,30, 40 ug/mL del extracto metanólico. Luego, con una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre las placas de Müeller Hinton inoculadas con *Staphylococcus aureus*.¹³ Después de 24 horas de midieron los resultados con vernier digital. Figura 19

4.5. Plan de análisis

Para la presente investigación se utilizó tablas de resumen de una entrada, con sus valores absolutos, promedio y desviación estándar; así como gráficos adecuados para presentar los resultados de la investigación. Además, se usó análisis de varianza para la determinación de diferencia en los efectos inhibitorios y se usó la prueba de Duncan para la comparación de grupos. Todas las estadísticas tuvieron un nivel de significancia del 5%. Se contó con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el programa statgraphics centurión.

4.6. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES
¿Existe efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> , del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> en sus tres concentraciones distintas sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>OBJETIVO GENERAL Determinar, si existe efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> a concentraciones de 10, 20, 30, 40 µg/ml sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p>OBJETIVOS ESPECIFICOS Evaluar el efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> en la concentración 10 µg/ml sobre cepas de <i>S. aureus</i>. Evaluar el efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> en la concentración 20 µg/ml sobre cepas de <i>S. aureus</i>. Evaluar el efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> en la concentración 30 µg/ml sobre cepas de <i>S. aureus</i>. Evaluar el efecto inhibitorio, <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> en la concentración 40 µg/ml sobre cepas de <i>S. aureus</i></p>	A medida que se incrementa la concentración del extracto metanólico a 10,20, 30, 40ug/ml, disminuirá el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en condiciones de laboratorio	extracto metanólico de <i>Psilocybe cubensis</i> Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<p>Unidad de medida del extracto en ug/ml</p> <p>Unidad de medida del tamaño del halo de inhibición (mm)</p> <p>Unidad de medida del crecimiento de las bacterias (UFC/ml)</p>

4.7. Principios éticos

Según el Código de Ética, aprobado por el consejo Universitario con Resolución N° 0973-2019-CU-ULADECH Católica, de fecha 16 de agosto del 2019.⁴⁴

Cuidado del medio ambiente y la biodiversidad: El fin de este estudio involucró el medio ambiente y se tomaron medidas de bioseguridad para evitar daños con los desechos de los líquidos y reactivos empleados en su ejecución.⁴⁴

Beneficencia no maleficencia: Los resultados de la investigación respondieron a las reglas generales de no causar daño, y disminuir los posibles efectos adversos al igual que maximizar los beneficios, con los nuevos datos adquiridos después de la ejecución.⁴⁴

Integridad científica: Bajo la función de las normas deontológicas de la profesión se aclaró y se evaluó los riesgos, daños y beneficios de la investigación, asimismo se aclaró los conflictos de interés de este manteniendo la integridad científica de la investigación.⁴⁴

Manejo de material contaminante: Las placas Petri con cultivos utilizados fueron expuestas a 121° C y 1 Bar de presión para ser inactivadas en autoclave a fin de desechar el material biológico contaminado aplicando las normas hospitalarias⁴⁵ y de manejo de desechos de la UNT.

V. Resultados

5.1 Resultados

Tabla 1. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Grupo de tratamiento	n	Promedio	Desv. Estándar	P*
10 ug/ml	14	0	0	
20 ug/ml	14	10.7	0.73	
30 ug/ml	14	15.5	0.40	0.0000
40 ug/ml	14	36.7	0.25	
Control positivo	14	37.4	0.25	

Fuente: Datos propios obtenidos de la medición**

*Prueba ANOVA (Nivel de significancia 0.05)

Interpretación: Se observa que el mayor efecto inhibitorio se obtiene con la concentración de 40 ug/ml (36.7mm) y con Amoxicilina + Ac. Clavulánico (37.4mm) y además se observa que si existen diferencias muy significativas entre los tratamientos probados ($p < 0.001$)

Se excluyó del ANOVA a la concentración del 10% por no presentar valores.

Tabla 2. Comparación del Efecto inhibitorio in vitro del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre *Staphylococcus aureus*. ATCC 43300 con la prueba de DUNCAN

Grupos de Tratamiento	n	Subconjunto para $\alpha= 0.05$				
		1	2	3	4	5
10 ug/ml	14	0				
20 ug/ml	14		10.7			
30 ug/ml	14			15.5		
40 ug/ml	14				36.7	
Control positivo	14					37.4

Fuente: Datos propios obtenidos de la medición**

Interpretación: la prueba de Duncan muestra que existen diferencias entre todos los tratamientos ($p < 0.05$)

5.2. Análisis de resultados

Los resultados de esta investigación demostraron que el extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* presentó efecto inhibitorio del crecimiento sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* presente en cavidades bucales. Se determinó que a partir de 20ug/ml hay efecto inhibitorio con un diámetro de 10.7 mm, en simultáneo durante la evaluación dos concentraciones adicionales de 30ug/ml y 40 ug/ml presentaron halos de inhibición con diámetros de 15.5 mm y 36.7 mm correspondientemente, esto concuerda con la hipótesis planteada en donde se sugiere un mayor diámetro que indicaría disminución del crecimiento con respecto a una mayor concentración. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Mohammed T.¹⁵ en donde evaluó el efecto antibacteriano sobre *S. aureus* y demás bacterias de un nuevo compuesto derivado de la triptamina que conserva como característica principal su estructura cíclica al igual que los alcaloides presentes en el extracto de esta investigación, obteniendo así un resultado favorable que el autor resume básicamente en la capacidad de estos compuestos para actuar sobre la pared voluminosa de peptidoglicano de *S. aureus*, desnaturalizándola sin activar la acción de betalactamasas características del mecanismo de resistencia en esta bacteria, además reporta la aplicación del método de difusión en medio Muller Hinton con una concentración mínima inhibitoria de 4ug/ml en lo cual difiere de este estudio debido a que el autor utilizó el compuesto en calidad de químicamente puro a diferencia del extracto metanólico que arrastra diferentes proteínas, azúcares y alcaloides, predominando entre estos la psilocibina. Ragupathi V⁹ obtuvo resultados

similares al evaluar el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Gymnopilus junonius* un hongo perteneciente a la familia *Strophariaceae*, a la cual pertenece también el hongo empleado en esta investigación, en concreto este autor demostró el efecto inhibitorio del crecimiento sobre *S. aureus* empleando una concentración de 20ug/ml con la cual obtuvo un diámetro de 12 mm en el halo de inhibición. Estos resultados se aproximan a los obtenidos en esta investigación en cuanto a los halos obtenidos, el menor diámetro podría explicarse debido a la menor cantidad de alcaloides en la especie *Gymnopilus junonius* dado que de forma complementaria este autor realizó un análisis de los compuestos presentes en el extracto, encontrando flavonoides, polifenoles¹¹ pero en menor cantidad alcaloides presentes en el extracto de esta investigación, tanto en grupos metilo como también en anillos cíclicos. Investigaciones realizadas por Jean N, et al¹⁶ también demostraron la efectividad de compuestos indólicos, triptaminas y alcaloides con similitud estructural a los presentes en basidiocarpos de *P. cubensis* arrastrados en el extracto metanólico, en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* dentro de los grupos iV- hidroxilaminas indólicas, β - amino indol V-hidroxilaminas, obteniendo halos de 15 mm para la concentración de 10 ug/ml evaluada, esto concuerda con los resultados obtenidos debido a los compuestos presentes y empleados en ambos estudios, es así que posteriormente este estudio terminó en patentes al establecer el protocolo correcto para la síntesis a gran escala de los compuestos de interés.

Además, la máxima concentración de 40 μ g/ml empleado en este estudio asegura la ausencia de efectos alucinógenos debido a que estudio realizado por Mahmood

Z¹⁴ determinó que solo las concentraciones mayores a 10 mg son capaces de lograr el efecto alucinógeno en los pacientes. Tyls F¹² en investigaciones posteriores amplía este conocimiento al determinar que concentraciones administradas por vía intravenosa correspondientes a 1 – 2 mg no resultan en efectos alucinógenos en pacientes adultos, de esta manera las concentraciones estudiadas al representar valores muy por debajo de la décima parte de la concentración mínima causante de alucinaciones, asegura la posibilidad de llegar a una futura aplicación en pacientes, excluyéndolos de algún riesgo relacionado a la acción recreativa de este compuesto.

VI. Conclusiones:

El extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, y este efecto aumenta en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas en el estudio.

A una concentración 10 µg/ml el extracto metanólico no presenta efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* si no a partir de concentración de 20 µg/ml.

La concentración de 30 µg/ml presenta un halo de inhibición mayor que la concentración de 20 µg/ml.

El mayor efecto inhibitorio fue al 40 µg/ml del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* con un halo de inhibición casi similar al grupo control de la Amoxicilina más ácido clavulánico sobre cepas de *Sptahylococcus aureus*.

Aspectos complementarios

Recomendación

Se recomienda ampliar los estudios sobre la extracción metanólica de los metabolitos liberados por el género *Psilocybe*, sobre todo el componente principal denominado psilocibina en donde podría radicar el efecto presentado, así como métodos de extracción y evaluaciones en demás bacterias de interés clínico odontológico.

Referencias bibliográficas

1. Jackson M, Bagg J, Kennedy H, Michie J. *Staphylococci* in the oral flora of healthy children and those receiving treatment for malignant disease. *Microbial Ecology in Health and Disease* (internet) 2000 (consultado el 22 de octubre del 2019); 12: 60–64. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/089106000435617>
2. Quintana S, Sjostrom P, Socarrás D, Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev cubana Estomatol* (internet).2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 54 (1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008
3. Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES Odont* (internet) 2015 (consultado el 22 de octubre del 2019); 28(2): 112-118. Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3681>
4. Bao J, Zhai H, Zhu K, Hai J, Zhang Y, Wang Y, et al. Bioactive Pyridone Alkaloids from a Deep-Sea-Derived Fungus *Arthrinium* sp. UJNMF0008. *Mar Drugs*. 2018 (consultado el 22 de octubre del 2019); 16(5): 174. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29786655>
5. Fricke J, Blei F, Hoffmeister D. Enzymatic Synthesis of Psilocybin. *Angew Chem Int Ed Engl* (internet). 2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 56(40):12352-12355. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763571>
6. Konaté K, Mavoungou J, Lepengué A, Samseny R, Hilou A, Souza A, et al. Antibacterial activity against β - lactamase producing Methicillin and Ampicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012; 11: 18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464800/>
7. Parada B, Marguet E, Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol* (internet). 2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 29 (2): 15 – 23. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/323000707_Aislamiento_y_caracterizacion_parcial_de_actinomicetos_de_suelos_con_actividad_antimicrobiana_cont_ra_bacterias_multidrogo-resistentes
 8. Belibasakis G, Mylonakis E. Oral infections: clinical and biological perspectives. *Virulence* (internet). 2015 (consultado el 22 de octubre del 2019); 6(3): 173–176. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601476/>
 9. Ragupathi V, Stephen D, Kumaresan, S. Antibacterial activity, in vitro antioxidant potential and gc-ms characterization of methanolic extract of *Gymnopilus junonius*, a wild mushroom from southern western ghats, India. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences*. 2018; 5: 650-657. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/323604305_antibacterial_activity_in_vitro_antioxidant_potential_and_gc-ms_characterization_of_methanolic_extract_of_gymnopilus_junonius_a_wild_mushroom_from_southern_western_ghats_india
 10. McCormack M, Smith A, Akram A, Jackson M, Robertson D, Edwards G, et al. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and

- infection? American Journal of Infection Control. 2015; (43): 35-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564121>
11. Nowacka N, Nowak R, Drozd M, Olech R, Malm A. Antibacterial, Antiradical Potential and Phenolic Compounds of Thirty-One Polish Mushrooms. PLoS ONE (internet) 2015 (consultado el 22 de octubre del 2019); 10(10): e014035 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607371/>
 12. Tyls F, Páleníček T, Horacek J. Psilocybin, summary of knowledge and new perspectives. European Neuropsychopharmacology (internet). 2014 (consultado el 22 de octubre del 2019); 24 (3):342-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444771>
 13. Karaman M, Stahl M, Vulić J, Vesić M, Canadanović-Brunet J. Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. Int J Food Sci Nutr (internet). 2014 (consultado el 22 de octubre del 2019);65 (3):311-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295284>
 14. Mahmood Z. Bioactive Alkaloids from Fungi: Psilocybin. Natural Products Springer, Berlin, Heidelberg (internet). 2013 (consultado el 22 de octubre del 2019); 3: 642 -978 Disponible en: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-22144-6_19#citeas
 15. Mohammed T. Tryptamine-derived compounds as antibacterial agents. Patente Europea. ES 81 WO2011060976A1. 20-11-2012. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2268/174148>

16. Jean N, Guinchard X, Moreau N, Neuville L, Vallee Y, et al. Novel indole derivatives, methods for preparing same, and use thereof particularly as antibacterial agents. Patente de Francia. Paris WO / 2008/110690. 31.01.2012
Disponible en:
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2008110690>
17. Ruby J, Barbeau J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. Journal ListCan J Infect (internet). 2002 (consultado el 22 de octubre del 2019); 13(1). Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094851/>
18. Aarabi G, Heydecke G, Seedorf. Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis. Int J Mol Sci (internet). 2018 (consultado el 22 de octubre del 2019); 19(7): 1978. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29986441>
19. Campbell G, Nicholson A, Thoms C. Oral Bacterial Infections: Diagnosis and Management. Dent Clin North Am (internet). 2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 61 (2): 305-318. Disponible:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28317568>
20. Pérez J, Pérez E, Ruiz M, Gonzáles J. Infecciones orofaciales de origen odontogénico. Med. oral patol. oral cir. Bucal (internet).2004 (consultado el 22 de octubre del 2019); 9 (4). Disponible en:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-44472004000400002

21. Montañez F. Infecciones cervicofaciales de origen odontogénico. Rev ADM (internet). 2006 (consultado el 22 de octubre del 2019); 2 (63): 74-79. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2006/od062f.pdf>
22. Fernández R, Rodríguez J, Ramírez. Las infecciones odontogénicas y sus etapas clínicas. Acta pediatr. Méx. (internet) 2016 (consultado el 22 de octubre del 2019); 37 (5).Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000500302
23. Velasco I, Soto R. Principios para el tratamiento de infecciones odontogénicas con distintos niveles de complejidad. Rev. Chilena de Cirugía (internet). 2012 (consultado el 22 de octubre del 2019); 6 (64): 586-598. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-40262012000600016
24. Naini F, Aminishakib P, Ghorbanpour M, Vakili M, Kharazifard M. Demographic Profile of Non-Odontogenic Jaw Lesions in an Iranian Population: A 30-Year Archive Review. J Dent (Tehran) (internet). 2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 14(3): 132–137. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694845/>
25. García V, Ángeles E, Ceballos H, Ordaz J. Infecciones faciales odontogénicas: Informe de un caso. Rev Odonto Mex (internet). 2009 (consultado el 22 de octubre del 2019); 3 (13): 177-183. Disponible en : <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2009/uo093i.pdf>
26. Caviglia I, Techera A, García G. Antimicrobial therapies for odontogenic infections in children and adolescents. Literature review and clinical

- recomendations. J Oral Res (internet) 2014 (consultado el 22 de octubre del 2019); 3(1): 50-56. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/273345523_Antimicrobial_therapies_for_odontogenic_infections_in_children_and_adolescents_Literature_review_and_clinical_recommendations
27. García A, Bujaldón A, Rodríguez A. Lesiones periapicales. Diagnóstico y tratamiento Periapical lesions. Diagnosis and treatment. Av Odontoestomatol.(internet) 2015 (consultado el 22 de octubre del 2019); 31 (1).Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852015000100005
28. Rodríguez M, Villamizar H. Osteomielitis: una revisión de la literatura. Univ. Salud (internet). 2010 (consultado el 22 de octubre del 2019); 1 (12). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0124-71072010000100015
29. Jamies F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación / Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. Univ Odontol. (internet) 2014 (consultado el 22 de octubre del 2019); 33(71): 65-73. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286511061_Identificacion_y_caracterizacion_microbiologica_fenotipica_y_genotipica_del_Streptococcus_mutans_experiencias_de_investigacion_Microbiological_Phenotypic_and_Genotypic_Characterization_of_Streptococcus

30. Mayer F, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Journal Virulence (internet). 2013 (consultado el 22 de octubre del 2019); 4(2): 119–128. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3654610/>
31. Komiyama E, Soares L, Gomes C, Samaranayake L, Parahitiyawa N, Balducci I, et al. *Enterococcus* Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. PLoS One (internet). 2016 (consultado el 22 de octubre del 2019); 11(9): e0163001. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27631785>
32. Aspiroz C, Lozano C, Gilaberte Y, Zarazaga M, Aldea J, Torre C, et al. Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ST398 en pacientes con infecciones cutáneas y sus familiares. Enferm Infecc Microbiol Clin (internet) 2012 (consultado el 22 de octubre del 2019); 1 (30) 1:52. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-caracterizacion-molecular-cepas-staphylococcus-aureus-S0213005X11002606>
33. Rajagopal M, Wonsik L, Kos V, Meredith T, Gilmore M, Walker S, et al. Multidrug Intrinsic Resistance Factors in *Staphylococcus aureus* Identified by Profiling Fitness within High-Diversity Transposon Libraries. mBio (internet). 2016 (consultado el 22 de octubre del 2019); 7(4): e00950-16. Disponible en: <https://mbio.asm.org/content/7/4/e00950-16>
34. Puerto C, Del Puerto E, Morales T, Baños N, Dolores M, Carnota G, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. Vaccimonitor (internet). 2009 (consultado el 22 de octubre del 2019); 1 (18).

Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2009000100004

35. Wu L, McCluskey K, Desmeth P, Liu S, Hideaki S, Yin Y, et al. The global catalogue of microorganisms 10K type strain sequencing project: closing the genomic gaps for the validly published prokaryotic and fungi species. *Gigascience* (internet). 2018 (consultado el 22 de octubre del 2019); 7(5) disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29718202>
36. Akers B. A Prehistoric Mural in Spain Depicting Neurotropic *Psilocybe* Mushrooms? *Journal eco bot* (internet). 2011 (consultado el 22 de octubre del 2019); 65 (2):121–128. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-011-9152-5>
37. Gartz J, Wiedemann G. Discovery of a new caerulescent *Psilocybe* mushroom in Germany.: *Psilocybe germanica* sp.nov. *Drug Test Anal* (internet). 2015 (consultado el 17 de noviembre del 2019); 7(9): 853–857. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6680175/>
38. Stijve T, Kuyper T. Occurrence of psilocybin in various higher fungi from several European countries. *Planta Med* (internet). 1985 (consultado el 17 de noviembre del 2019) ;51(5):385-7. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1055/s-2007-969526>
39. Hernández, Pérez J, Xoconostle B, Almaraz J, Ojeda E, Montes G, Díaz I. Traditional knowledge and use of wild mushrooms by Mixtecs or Ñuu savi, the people of the rain, from Southeastern Mexico. *J Ethnobiol Ethnomed* (internet). 2016 (consultado el 17 de noviembre del 2019); 12(1): 35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5011354/>

40. Tangarife H, Ceballos L, Rodríguez J. Chamanismo, enteógenos y arte contemporáneo. RevCD (internet), 2017 (consultado el 17 de noviembre del 2019); 23 (25), 106-136. Disponible en: [http://culturaydroga.ucaldas.edu.co/downloads/Culturaydroga23\(25\)_07.pdf](http://culturaydroga.ucaldas.edu.co/downloads/Culturaydroga23(25)_07.pdf)
41. Manevski N. Glucuronidation of Psilocin and 4-Hydroxyindole by the Human UDP-Glucuronosyltransferases. Drug Metab Dispos (internet). 2010 (consultado el 22 de octubre del 2019); 38(3): 386–395. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007669>
42. Lenz C, Wick J, Hoffmeister D. Identification of ω -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a *Psilocybe* Natural Product. J Nat Prod (internet). 2017 (consultado el 22 de octubre del 2019); 80(10):2835-2838. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28929753>
43. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6^a ed. México: Interamericana; 2014.
44. Código de ética para la investigación. ULADECH. Versión 001 (Internet). (citado 22 enero 2019). Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/7455/codigo-de-eticaparalainvestigacionv001.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
45. Sanders E. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. J Vis Exp (internet). 2012 (consultado el 15 de noviembre del 2019); (63): 3064. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846335/>

Anexos

Anexo 1

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Trujillo, 20 de febrero del 2019

CONSTANCIA DE CO-ASESOR

Yo, Ricardo Noriega Miranda, Químico Farmacéutico, con CQFP N° 14754 por el presente documento dejo constancia de ser co-asesor externo del alumno, Cabos Zavaleta Carlo, estudiante de la carrera de Odontología de la Universidad Privada Católica Los Ángeles de Chimbote - Filial Trujillo, quien es autor de la tesis titulada "Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*"

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado


Ricardo Noriega Miranda
QUÍMICO FARMACÉUTICO
CQFP 14754

Anexo 2

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Trujillo, 20 de febrero del 2019

CONSTANCIA DE SUPERVISIÓN

Yo, Ricardo Noriega Miranda, Químico Farmacéutico, con CQFP N° 14754 por el presente documento dejo constancia de haber revisado y hecho algunas correcciones a la tesis "Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*", del alumno Cabos Zavaleta Carlo, estudiante de la carrera de Odontología de la Universidad Privada Católica Los Ángeles de Chimbote - Filial Trujillo, al igual que he supervisado y guiado en la ejecución de los ensayos realizados desde el Lunes 18 de febrero del 2019.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.


Ricardo Noriega Miranda
QUÍMICO FARMACÉUTICO
CQFP 14754

Anexo 3


"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Trujillo, 20 de Febrero del 2019

CONSTANCIA DE CO-ASESOR

Yo, Teresa Alayo Padilla, Bfga. - Mbfga. con CBP N° 6442 por el presente documento dejo constancia de ser co-asesora externa del alumno Cabos Zavaleta Carlo, estudiante de la Carrera de Odontología de la Universidad Privada Católica Los Ángeles de Chimbote – Filial Trujillo, quien es autor de la tesis titulada "Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.


TERESA FRANCISCA ALAYO PADILLA
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. N° 6442

Anexo 4


"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Trujillo, 20 de Febrero del 2019

CONSTANCIA DE SUPERVISIÓN

Yo, Teresa Alayo Padilla, Biga. - Mblga. con CBP N° 6442 por el presente documento deo constancia de haber revisado y hecho algunas correcciones a la tesis "Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*", del alumno Cabos Zavaleta Carlo, estudiante de la Carrera de Odontología de la Universidad Privada Católica Los Ángeles de Chimbote – Filial Trujillo, al igual que he supervisado y guiado en la ejecución de los ensayos realizados desde el Lunes 18 de Febrero del 2019.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.


TERESA FRANCISCA ALAYO PADILLA
BIÓLOGO - MICROBIOLOGO
C.B.P. N° 6442

Anexo 5

Ficha del diámetro de halo de inhibición del crecimiento sobre *S. aureus* ATCC 43300

muestra	Grupo de Tratamiento				Control positivo
	10ug/ml	20ug/ml	30ug/ml	40ug/ml	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					

Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

muestra	Grupo de Tratamiento				Control positivo
	10ug/ml	20ug/ml	30ug/ml	40ug/ml	
1	0	9.2	16.0	36.3	37.3
2	0	12.0	15.0	37.0	37.0
3	0	11.0	15.2	36.8	37.7
4	0	11.0	15.0	36.8	37.7
5	0	11.1	15.0	36.5	37.0
6	0	10.0	16.0	36.5	37.0
7	0	10.8	16.0	36.9	37.4
8	0	11.5	15.6	36.8	37.5
9	0	10.0	15.5	37.0	37.6
10	0	10.1	15.8	36.9	37.5
11	0	10.0	15.2	36.4	37.3
12	0	10.4	16.0	36.3	37.7
13	0	11.0	15.6	36.5	37.4
14	0	11.0	15.4	36.7	37.4
<i>Estadístico de Shapiro-Wilk</i>	-	0.951	0.876	0.907	0.888
<i>p</i>	-	0.572	0.052	0.142	0.075

Como se observa todos los grupos tienen distribución normal, excepto la concentración del 10ug/ml que no tiene valores.

Anexo 6



Anexo 7



FIGURA 1. Subcultivo de *P. cubensis* en un medio de PDA

FIGURA 2. Propagación del micelio de *P. cubensis* en mezcla de arroz integral y abono de vaca y colonización de la superficie



FIGURA 3. Desarrollo de basidiocarpos de *P. cubensis*



FIGURA 5. Secado de basidiocarpos de *P.cubensi* a 40° C durante 24 horas

FIGURA 4. Recolección de basidiocarpos inmaduros de *P.cubensis*



FIGURA 6. cuantificando 16 gramos de *P.cubensis* secos

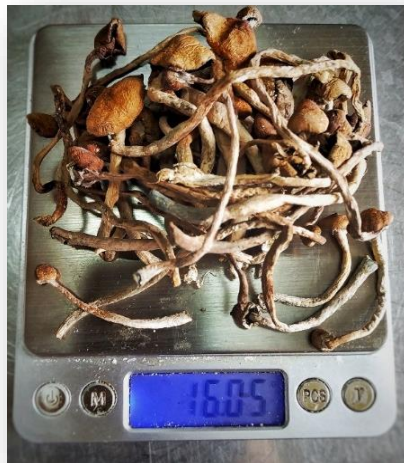




FIGURA 7. Pulverización de 16 gramos de *P.cubensis* con un mortero y pilón

FIGURA 8. Solución de 100 ml de metanol con 16 gramos *P.cubensis* triturado



FIGURA 9. Maceración del *P.cubensis* con 100 metanol, dentro de un envase color ámbar por 24 horas.





FIGURA 10. Filtrado del extracto metanólico con un papel filtro whatman N°1

FIGURA 11. Obtención del extracto metanólico puro

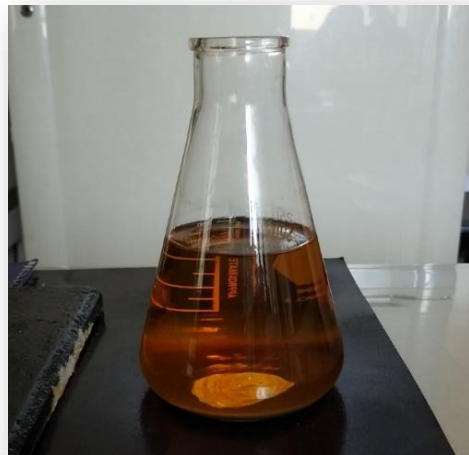


FIGURA12. Conservación del extracto metanólico en frascos color ámbar en sus 5 concentraciones: 10,20,30,40 ug/ml.

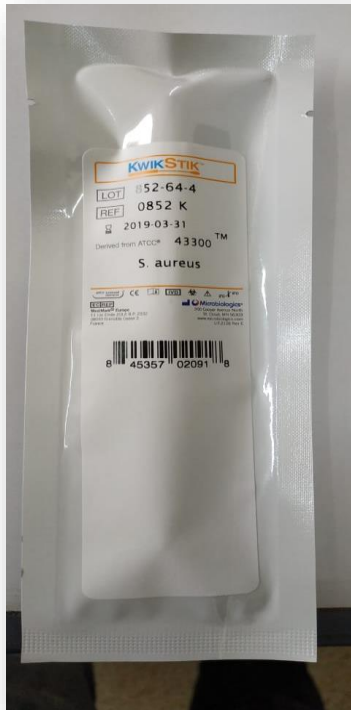
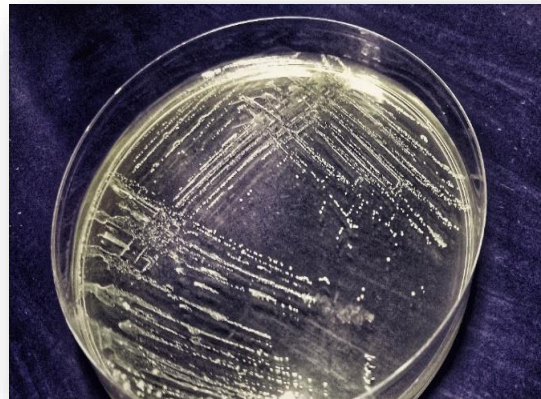


FIGURA 13. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

FIGURA 14. Evaluación de la pureza de colonias con morfología característica de *S.aureus* sin contaminación



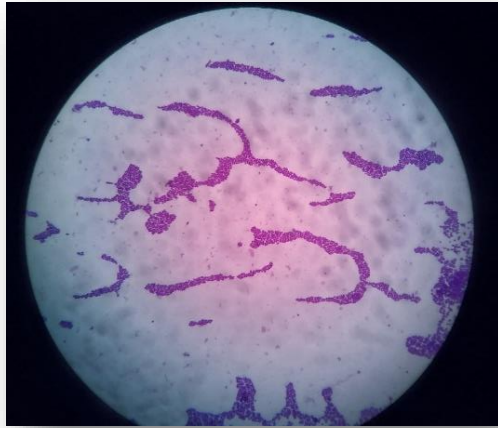


FIGURA 15. Evaluación de la pureza, coloración Gram (cocos Gram positivos)



FIGURA 16. Estandarización del inóculo con una turbidez correspondiente al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland

FIGURA 17. Preparación de agar Müller Hinton para evaluación de la actividad antimicrobiana





FIGURA 18. Sembrado de *S.aureus* por superficie con 0.1ml de inóculo en cada placa, extendido con asa de digralsky



FIGURA 19. Colocación de discos embebidos con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 30 y 40 ug/ml. Prueba de sensibilidad antibiótica.

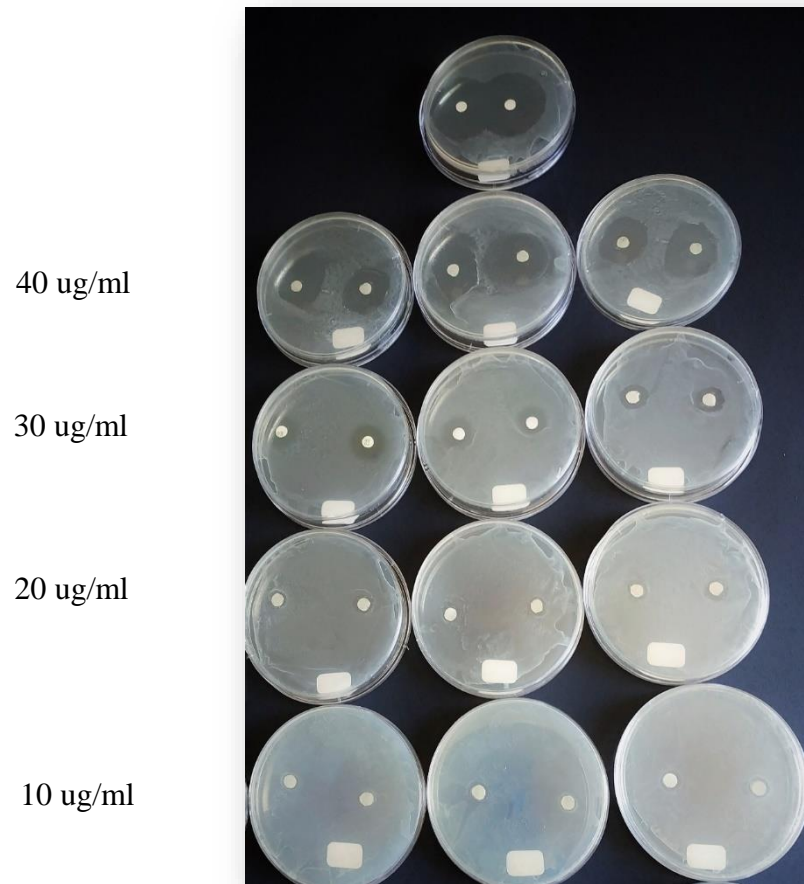


FIGURA 20. Presencia de halos de inhibición en las placas, después de 24 horas de incubación

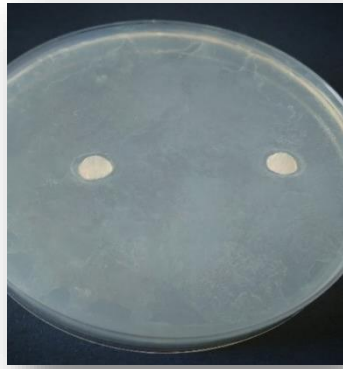


FIGURA 21. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 10 ug/ml

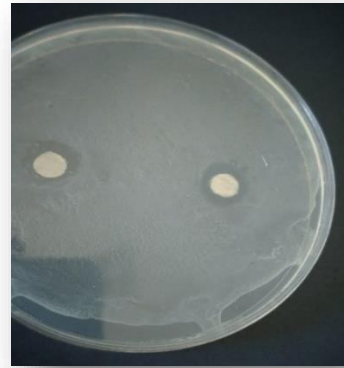


FIGURA 22. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 20 ug/ml

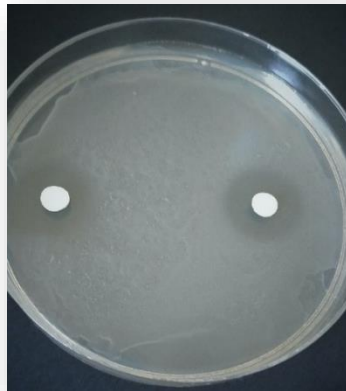


FIGURA 23. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 30 ug/ml

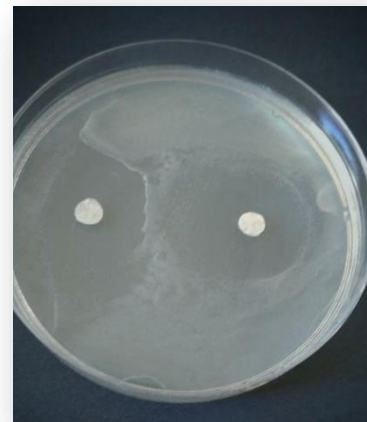


FIGURA 24. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 40 ug/ml

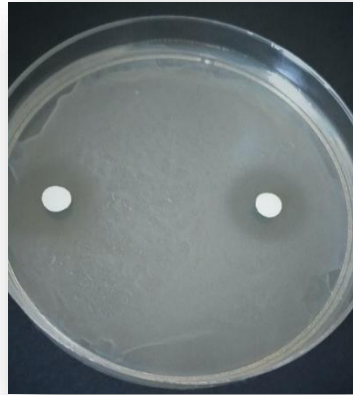


FIGURA 25. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 30 ug/ml

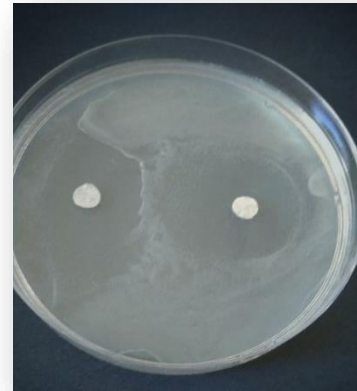


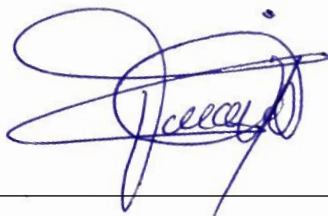
FIGURA 26. Prueba de sensibilidad antibiótica en agar Müller Hinton después de 24 horas de incubación, cepas de *S.aureus* con discos embebidos con extracto metanólico de *P.cubensis* 40 ug/ml



FIGURA 27. Vernier digital marca Mitutoyo, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025

DOCUMENTO DE DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERES

Mediante este documento el autor declara que la tesis “Efecto inhibitorio, *in vitro*, del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300” se llevó a cabo en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un posible conflicto de intereses.



CABOS ZAVALETA CARLO FEDERICO