

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela Profesional de Biología-Microbiología**

**“Determinación de la actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite  
esencial de *Pimpinella anisum* L. “anís” frente a  
*Salmonella typhi* ATCC 6539”**

**TESIS**

Presentada por:

**Bach. DANITZA YESENIA COTRADO APAZA**

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

**Tacna – Perú**

**2016**

TESIS N° 288

TÍTULO PROFESIONAL DE:  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por Resolución de Facultad N° 8661-2016-FACI-UN/JBG el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis:

**“Determinación de la actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. “anís” frente a *Salmonella typhi* ATCC 6539”**

El mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : Mgr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA  
SECRETARIA : Msc. ANGELA CHOQUE MIRANDA  
MIEMBRO : Mgr. ISABEL ANCCO OLIVA

Para examinar y calificar la sustentación de tesis en acto público el día 07 de diciembre del 2016 a las 16:00 horas.

Presentado por la Bachiller: **DANITZA YESENIA COTRADO APAZA**, de la Escuela Profesional de Biología – Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador, en forma individual y secreta emitieron su calificación sobre la tesis expuesta y procedió a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de **BUENO** y promedio de 15.

Para ratificar lo detallado firman:

Mgr. Daladier Miguel Castillo Cotrina  
Presidente

Msc. Angela Choque Miranda  
Secretaria

Mgr. Isabel Ancco Oliva  
Miembro

## **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada a mis Padres: Julio y Rosa, los cuales con su aprecio, sacrificio y apoyo constante han logrado que culmine este nuevo paso en mi vida. Los quiero y valoro muchísimo.

A mis hermanas: Mary y Katia, las cuales siempre formaron un gran apoyo, complicidad y compañía tanto en las alegrías como en las tristezas.

A mis abuelos: Martin y Matilde, Paulino y María; que en estos momentos gozan de la compañía de Dios y cuya memoria me acompaña cada día de mi vida.

A mis tíos, primos, padrinos y demás familiares, los cuales siempre me han brindado su compañía y apoyo en momentos difíciles.

Y sobre todo a Dios, que me acompaña en cada paso que doy. Me enseñó el camino correcto y me da fuerzas para no abandonarlo, me dio una familia que me ayuda día a día a que sea mejor persona.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por todas las bendiciones que me da día a día y por estar a mi lado aun cuando yo quise alejarme.

A mis maestros, por su colaboración, disposición y por los conocimientos que compartieron para que logre tener una buena formación profesional.

A mi asesor Dr. César Julio Cáceda Quiroz, por su colaboración, comprensión y paciencia en el desarrollo del presente trabajo.

Al profesor Edwin Obando, por su consejo y constante apoyo durante el desarrollo del trabajo.

A mis familiares y amigos, gracias por estar ahí cuando los necesite, por acompañarme en este camino y por darme los ánimos cada día para seguir adelante.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Enunciado del problema	4
1.2. Hipótesis	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Determinación de variables	6
1.4.1. Tipos de variables	6
1.4.2. Operacionalización de variables e indicadores	6
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	7
2.1. Fitoterapia	7
2.2. <i>Pimpinella anisum</i> L. (anís)	9
2.2.1 Ubicación taxonómica	9
2.2.2 Difusión y origen	10
2.2.3 Características morfológicas del Anís	11
2.2.4 Requerimientos agroclimáticos	12
2.2.5 Producción en el Perú	13
2.2.6 Composición química	14
2.2.7 Propiedades medicinales	16
2.3. Antimicrobianos de origen vegetal	18
2.3.1 Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural	19

2.3.2	Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	20
2.4.	Aceite esencial	21
2.4.1	Función de los aceites esenciales en el vegetal	23
2.4.2	Clasificación de los aceites esenciales	23
2.4.3	Distribución y estado natural	26
2.4.4	Propiedades	27
2.4.5	Extracción	28
2.4.6	Composición química	31
2.4.7	Usos	33
2.5.	Bacteria	36
2.5.1.	Generalidades	36
2.5.2.	<i>Salmonella</i>	38
2.5.2.1	Características de crecimiento	40
2.5.2.2	Características de sobrevivencia	41
2.5.2.3	Inactivación	43
2.5.2.4	Patogenia	45
2.5.2.5	Epidemiología	50
2.5.2.6	<i>Salmonella typhi</i>	51
a.	Descripción	51
b.	Taxonomía	52
c.	Epidemiología	53
d.	Patogenia	54
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
3.1.	Lugar de experimentación	58
3.2.	Materiales	58
3.2.1.	Material biológico	58
3.2.2.	Material microbiológico	58
3.2.3.	Materiales y equipos	58

3.3. Metodología	61
3.3.1. Diseño experimental	61
3.3.2. Variables	61
3.3.3. Recolección, extracción y densidad del aceite esencial	62
3.3.4. Cepa	65
3.3.5. Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i>	65
3.3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	71
3.3.7. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)	76
3.3.8. Procesamiento y análisis estadístico	77
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>78</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>105</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 01:</b> Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> (anís) frente a <i>Salmonella typhi ATCC 6539</i> por el método de difusión en disco Kirby Bauer.	79
<b>CUADRO 02:</b> Análisis de varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (Kirby – Bauer) de las concentraciones del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> (anís) frente a <i>Salmonella typhi ATCC 6539</i> , entre los diferentes tratamientos empleados.	80
<b>CUADRO 03:</b> Prueba de significación de Tukey al 95 % de confianza, para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> frente a <i>Salmonella typhi ATCC 6539</i> .	81
<b>CUADRO 04:</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> (anís) frente a <i>Salmonella typhi ATCC 6539</i> .	85
<b>CUADRO 05:</b> Concentración mínima bactericida (CMB) producido por el aceite esencial <i>Pimpinella anisum L.</i> (anís) frente a <i>Salmonella typhi ATCC 6539</i> .	86

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 01:** Promedio de cada uno de los halos de inhibición y los tratamientos del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* en estudio frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.* 83
- GRÁFICO 02:** Análisis de correlación y regresión lineal entre el diámetro de los halos de inhibición y la concentración de aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.* 84

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ILUSTRACIÓN 01 y 02:</b> <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	119
<b>FOTO 01, 02 y 03:</b> Hojas de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”, la primera pertenece a la base de la planta, la siguiente de la parte central y la última de la parte superior.	120
<b>FOTO 04 y 05:</b> Flores de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	121
<b>FOTO 06:</b> Flores y frutos de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	122
<b>FOTO 07:</b> Fruto de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	122
<b>FOTO 08:</b> Semillas de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	123
<b>FOTO 09, 10 y 11:</b> Extracción del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís” por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.	123
<b>FOTO 12:</b> Cepa bacteriana en estudio ( <b><i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539</b> ) proporcionada por el MINSA-TACNA.	125
<b>ESQUEMA 01:</b> Técnica Kirby Bauer.	125
<b>FOTO 13, 14, 15, 16 y 17:</b> Preparación de discos de sensibilidad en medio Müller Hinton.	126
<b>FOTO 18, 19 y 20:</b> Sensibilidad de <b><i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539</b> frente al aceite esencial puro de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís” por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).	128

<b>FOTO 21 y 22:</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539 frente al aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	130
<b>FOTO 23:</b> Concentración Mínima Bactericida (CMB) de <i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539 frente al aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> “anís”.	131
<b>FOTO 24 y 25:</b> Informe del ensayo Físico - Químico al aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i> (anís).	132

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo, determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de las semillas de *Pimpinella anisum* L. “anís” frente a la cepa bacteriana de *Salmonella typhi* ATCC 6539. Se obtuvo el aceite esencial de las semillas mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua. La actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de estas semillas se pusieron de manifiesto utilizando los métodos de: a) Kirby Bauer, para conocer el grado de sensibilidad en función al tamaño de los halos de inhibición, b) Por dilución en medio líquido, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y c) Por difusión en agar para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial.

En los resultados, se demostró que ***Salmonella typhi* ATCC 6539** presentó en el tratamiento T7, una sensibilidad promedio de 11,66 mm; a partir de ello todos los demás tratamientos fueron sensibles. La CMI para la cepa bacteriana fue de **44,1601 mg/ml** y su CMB fue de **50,1084 mg/ml**.

En conclusión, la bacteria ***Salmonella typhi* ATCC 6539** es sensible al aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. “anís”.

**Palabras Clave:** aceite esencial, halo de inhibición, Kirby Bauer, CMI, CMB, ***Salmonella typhi* ATCC 6539**.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the "in vitro" antibacterial activity of the essential oil of the seeds of *Pimpinella anisum* L. "anis" against the bacterial strain of *Salmonella typhi* ATCC 6539. The essential oil of the seeds was obtained by the Method of steam distillation. The "in vitro" antimicrobial activity of the essential oil of these seeds was evidenced using the methods of: a) Kirby Bauer, to know the degree of sensitivity as a function of the size of inhibition halos, b) By dilution in liquid medium, To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and c) By agar diffusion to determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oil.

In the results, it was demonstrated that ***Salmonella typhi* ATCC 6539** presented in the T7 treatment, an average sensitivity of 11,66 mm; From that all other treatments were sensitive. The MIC for the bacterial strain was **44,1601 mg/ml** and its BMC was **50,1084 mg/ml**.

In conclusion, the bacterium ***Salmonella typhi* ATCC 6539** is sensitive to the essential oil of *Pimpinella anisum* L. "anis".

**Keywords:** essential oil, inhibition halo, Kirby Bauer, MIC, MBC, *Salmonella typhi* ATCC 6539.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mundo moderno la población crece aceleradamente y con ellas también las enfermedades producidas por bacterias, virus, hongos, etc. A pesar que existen muchos antibacterianos para su control o tratamiento, el uso irracional de estos viene generando resistencia microbiana y otras secuelas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979), indica que el mundo ha virado sus ojos en las dos últimas décadas de forma progresiva hacia las plantas medicinales. El interés y la investigación, es cada día más patente por diferentes motivos para los países desarrollados y los países en vías de desarrollo, como el Perú.

La medicina tradicional en nuestro país es practicada por personas de todo nivel sociocultural, con un uso amplio y variado, basado en plantas medicinales, originalmente los únicos elementos curativos que conocía el hombre, que se han mantenido a través de la historia, sobre todo en zonas rurales remotas o entre minorías étnicas de la sociedad moderna, persistiendo como complemento del hombre pobre o como alternativa a la asistencia médica inaccesible.

Sobre todo en centros de culturas aborígenes andino amazónicas supervivientes, donde la medicina moderna sigue siendo desconocida y donde las plantas aún proporcionan las únicas medicinas (Chávez, 1997).

En el Perú, la gran biodiversidad botánica por un lado y los conocimientos incipientes de sus propiedades fitoquímicas marcan una brecha considerable que requiere esfuerzos coordinados de diferentes sectores de la sociedad científica, con fines tanto académicos, como prácticos de aprovechar el potencial natural. Además, las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de medicamentos, ya que han contribuido enormemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos, que constituyen la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países (HOSS, 2000).

La biodiversidad vegetal ofrece algunas especies con excelentes efectos antibacterianos, entre este grupo de plantas se encuentra la *Pimpinella anisum* L. “anís”, el aceite que se

obtiene de las semillas de esta planta, por destilación a vapor, es usado con fines medicinales. La medicina tradicional antigua le atribuye diversas propiedades como expectorante, antibacteriano y carminativo, los cuales mejoran la digestión y el tono estomacal, garantizando así una mejor digestión.

El aceite de anís tiene una alta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (responsable de infecciones de la piel), *Streptococcus haemoliticus* (que causa la infección de garganta y la nariz), *Bacillus subtilis* (infección en los pacientes inmunocomprometidos), *Pseudomonas aeruginosa* (causante de infección adquiridas en hospitales), especies de *Klebsella* y *Proteus vulgaris* (Singh et al., 2002).

El aceite esencial de anís también inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*; utilizando el método de dilución en agar (Hammer et al., 1999).

Por estas razones, el objetivo de este estudio radica en evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de

***Pimpinella anisum L.*** “anís” frente a ***Salmonella typhi*** ATCC 6539, con el fin de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta semilla.

Demostrar el efecto antibacteriano permitirá ofrecer una alternativa importante en el enfoque tradicional de las diversas enfermedades, y promover el diseño del ensayo clínico derivado del presente estudio, luego de la demostración *in vitro*.

### **1.1. Enunciado del problema**

¿Tendrá el aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís” actividad antimicrobiana “in vitro” frente a ***Salmonella typhi*** ATCC 6539?

### **1.2. Hipótesis**

El aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís” tiene actividad antibacteriana in vitro sobre la cepa de ***Salmonella typhi*** ATCC 6539 causante de enfermedades de origen alimentario.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo general:

- Determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de las semillas de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a la cepa bacteriana de *Salmonella typhi* ATCC 6539.

#### 1.3.2. Objetivos específicos:

- Evaluar el grado de sensibilidad que presenta la cepa bacteriana de *Salmonella typhi* ATCC 6539 frente al aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) mediante la técnica de difusión en disco.
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a la cual el aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) ejerce inhibición del crecimiento de la cepa bacteriana de *Salmonella typhi* ATCC 6539.
- Precisar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) sobre el crecimiento de la cepa bacteriana de *Salmonella typhi* ATCC 6539.

## 1.4. Determinación de variables

### 1.4.1. Tipos de variables

- Variable independiente: Concentración del aceite

esencial de *Pimpinella*

*anisum L. (anís)*

- Variable dependiente: Efecto sobre el agente bacteriano:

*Salmonella typhi* ATCC 6539

### 1.4.2. Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
VARIABLE INDEPENDIENTE Concentración del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum L.</i>	Capacidad del aceite esencial de <i>Pimpinella anisum</i> "anís" de inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición	Medida en mm
		Cualitativa	Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (-) Sumamente Sensible (+)
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto sobre la bacteria en estudio.	Efecto que se produce sobre la especie bacteriana, agente productor de infecciones.	Cepa ATCC <i>S. typhi</i>	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez UFC

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Fitoterapia**

Las plantas contienen elementos activos que las protegen de los insectos, mohos y otros parásitos, así como de los rayos ultravioletas del sol. Muchos de estos componentes ya sea de forma individual o en diferentes combinaciones poseen efectos estimulantes, calmantes o terapéuticos en el hombre (Wills et al., 2000).

Desde la antigüedad nuestros antepasados han utilizado las plantas como una forma de ayuda para poder calmar los dolores y malestares, y es así que aprovechando los conocimientos heredados de generaciones anteriores y de los indicios proporcionados por cierto grupos étnicos que asignan cualidades curativas, se distinguen centenares de plantas y se saben muchas de las propiedades de cada una, naciendo con ello las plantas medicinales que hasta hoy en día se siguen empleando (Barh, 1988).

El uso de las plantas en medicina tiene una historia honorable, ya que en determinados momentos todos los medicamentos se obtenían de fuentes naturales. Este evento dio lugar al

establecimiento de una relación muy cercana y productiva entre el hombre y su medio vegetal (INFA, 2000).

A pesar de los siglos de tradición la fitoterapia del griego *phytón* (plantas) y *therapeía* (tratamiento), es decir, tratamiento de las enfermedades por plantas frescas, secas o sus extractos, ha evolucionado y ha ganado prestigio y eficacia, sobre todo en los últimos tiempos, acercándose cada vez más a las normas y usos que exige la medicina moderna (Poletti, 1979).

Por tal motivo, los intentos dirigidos a la investigación y aplicación de productos vegetales para el control de enfermedades y sus agentes patógenos, están caracterizados por dos ejes fundamentales: Primero, la experimentación empírica de recursos botánicos preparados y evaluados de manera artesanal; Segundo, el estudio científico de las sustancias secundarias de plantas cultivadas con actividad antibacteriana que forman parte de los mecanismos de defensa como los compuestos preformados e inducidos (fitoalexinas). Ambos métodos han logrado la identificación de una serie de especies y variedades botánicas que puede servir como punto de partida para la investigación (Wills et al., 2000).

En el caso del Perú, la gran biodiversidad botánica, por un lado, y los conocimientos incipientes de sus propiedades fitoquímicas, por otro lado, marcan una brecha considerable que requiere esfuerzos coordinados de diferentes sectores de la sociedad científica, con fines tanto académicos como prácticos de aprovechar el potencial natural (Hernández, 2003).

## 2.2. *Pimpinella anisum* L. (anís)

### 2.2.1 Ubicación taxonómica

Se muestra la clasificación taxonómica del anís, descrita por *Carolus Linnaeus*:

<b>Clasificación científica</b>	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Género:	<i>Pimpinella</i>
Especie:	<b><i>Pimpinella anisum</i> L.</b>

### **2.2.2 Difusión y origen**

El anís es una de las plantas medicinales más antiguas que se conoce. Originaria del Mediterráneo meridional, Egipto, Asia menor e Islas Griegas. Es cultivada en climas templados y cálidos desde la antigüedad. En la Edad Media fue extendida por toda Europa. Actualmente se cultiva en zonas cálidas de todo el mundo (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Entre los principales productores del mundo se encuentra Turquía, China, India, México, España y Alemania. El anís de mejor calidad se produce en España (Mendiola, 2009).

Desde la antigüedad la planta del anís ha sido utilizada como planta medicinal, como especia y como alimento. Fue muy apreciado en la Roma del siglo I, se tomaba en pasteles, después de la comida, para ayudar en la digestión y refrescar el aliento (Green, 2007).

A lo largo de la historia se tienen noticias en el Egipto faraónico tanto de su cultivo como de su utilización en

fitoterapia, así como entre los griegos anteriores y posteriores a Hipócrates, los cuales alababan sus excelentes virtudes. En la mayor parte de las culturas, las matronas jugaron un papel importantísimo en el conocimiento y aplicación correcta del anís (Ara, 1994).

### **2.2.3 Características morfológicas del Anís**

*Pimpinella anisum L.*, popularmente conocido como anís, anís verde o matalahúga, es una planta herbácea anual que forma matas de hasta 50 cm de altura, presenta las siguientes características morfológicas:

**Raíz:** típica o pivotante.

**Tallo:** Estriado, erguido, ramificado en lo alto y muy frágil.

**Hojas:** Son alternas de color verde vivo, las de la base reniformes o débilmente lobuladas, las del medio ovales con los segmentos dentados y las de la cima del tallo con lóbulos linear-lanceolados y estrechos (angostas y filamentosas).

**Flores:** Son de color blanco, pequeñas, en umbelas compuestas de largos pedúnculos, con cinco pétalos radiales obovados. Florecen durante el verano, a la vez que van madurando sus frutos.

**Fruto:** Son diaquenios de color gris verdoso o verde amarillento, de 3 a 5 mm, ovoideos, ligeramente comprimidos y sedosos, con pelos cortos, son muy perfumados.

Las **semillas** del anís son utilizadas para sazonar dulces, pan, licores, etc. Toda la planta huele a anís (Mendiola, 2009).

#### **2.2.4 Requerimientos agroclimáticos**

El anís verde es una hierba de la familia *Apiaceae* de origen mediterráneo, de **climas** cálidos y templados, no prospera en lugares de climas fríos, no soporta las heladas ni humedad ambiental muy elevada, Igualmente es importante que el cultivo este protegido del viento. Produce una cosecha al año. La **época de siembra** es del mes de febrero a abril, las semillas se siembran directamente en **suelo** seco, ligero y permeable; germina alrededor del 95 % a los 12-15 días; cuando brotan es necesario enrarecer las plántulas y mantenerlas limpias de malas hierbas; por ser un cultivo demandante de nutrientes se recomienda abonar orgánicamente complementando con fósforo (P) y nitrógeno (N). La **época de cosecha** es en los meses de julio a agosto, los frutos se cosechan por la mañana cuando al menos el 50 % está maduro y se secan a la sombra dentro de una

bolsa; al concluir el secado las bolsas se golpean repetidamente para separar los frutos. Para su desarrollo requiere una **temperatura** mínima de 7 °C y una máxima de 25 °C. La temperatura óptima se sitúa entre 15 y 18 °C. La planta requiere una precipitación óptima de 593 mm al año, no es recomendable que haya precipitación en el momento de la floración y la cosecha, debe haber días largos en la etapa de floración y fructificación (Canchari, 2010).

### 2.2.5 Producción en el Perú

La producción ha sido como se muestra a continuación.

**Tabla 01:** Producción de anís en regiones potenciales (toneladas).

Periodo	Apurímac (Curahuasi)	Moquegua	Arequipa y Cuzco
2006	565,2	5,83	3,6
2007	334,2	5,21	2,4
2008	484,0	7,30	4,2
2009	520,0	14,50	6,4
2010	568,0	16,00	12,3
2011	450,0	20,60	22,0

**Fuente:** MINAGRI

Curahuasi es una zona potencialmente productora de anís que abastece el 80 % de la demanda del mercado nacional, el anís constituye un producto estrella de la zona (CICCA, 2015).

### **2.2.6 Composición química**

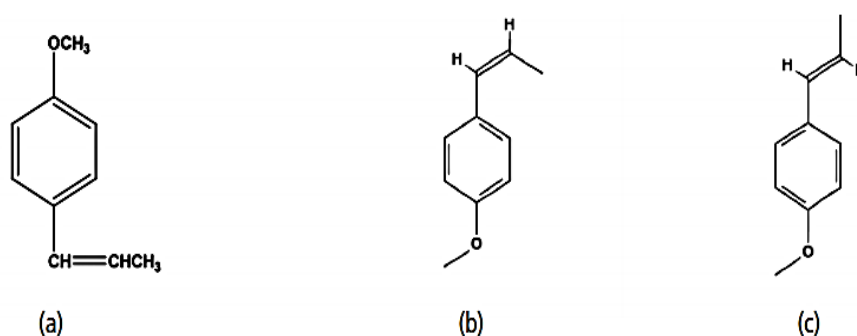
Las semillas de anís tienen un principio activo denominado colina, así como un aceite esencial, responsable de sus propiedades diuréticas y expectorantes (Mujica, 2012).

Poseen una composición química compleja. Son especialmente ricos en aceite esencial. Además, poseen compuestos fenólicos y abundantes componentes terpénicos no volátiles. Por destilación con vapor de agua, a partir de las semillas de *P. anisum L.* se extrae un 2-6 % de aceite esencial (“esencia de anís”). Contiene una elevada concentración de trans-anetol, entre el 87-94 % (Real Farmacopea Española, 2005).

La esencia de *P. anisum L.* (anís verde) contiene, además, otros monoterpenos como linalol (0,1-1,5 %) y compuestos fenilpropánicos como estragol (metil-chavicol)

(0,5-2,3 %), anisaldehído (trazas- 5,4 %), trans-pseudoisoeugenil-2-metilbutirato (0,4-6,4 %) y una pequeña cantidad de cis-anetol. Son también constituyentes del aceite esencial sesquiterpenos volátiles como cariofileno y -himachaleno (0,4-8,2 %). En los frutos se han identificado ácidos fenólicos (ácido clorogénico y otros derivados del ácido cinámico), flavonoides, cumarinas y triterpenos entre otros componentes (Orav et al., 2008).

La raíz también contiene alrededor de un 0,05 % en aceite esencial de su peso fresco.



**Figura 1.** Estructura química del anetol (a) y sus isómeros: cis (b) y trans (c).

**Fuente:** (CHEMIDPLUS, 2009).

### 2.2.7 Propiedades medicinales

El anís posee diversas propiedades curativas entre las cuales se puede citar las **expectorantes, antitusivas, antiespasmódicas** y **sedantes**. Además, ofrece otros **beneficios**, tales como poseer efectos **diuréticos, digestivos, galactógenos y hepatoprotectores** (Fonnegra y Jiménez, 2007).

En el tubo digestivo, el anís comienza su actuación en la misma boca, pues activa las secreciones salivales. El mismo efecto tiene sobre los jugos gástricos, que se ven incrementados. El anís facilita el peristaltismo del tubo digestivo y produce un efecto antiespasmódico que lo hace necesario en la fórmula para combatir los meteorismos persistentes (Ara, 1994).

A nivel popular, se usa la infusión del anís para **aumentar la secreción láctea** de las madres que no responden de forma conveniente al amamantamiento. Las semillas del anís, consumidas por la madre, confieren un sabor peculiar a la leche materna que facilita a los niños la

toma y les proporciona digestiones mucho más agradables, combatiendo así las molestias que suelen producirles los gases en los primeros meses de vida (Ara, 1994).

Otras propiedades medicinales de la planta de anís son: **diuréticas**, estimula la función renal, contribuyendo a la eliminación de líquidos del organismo y **hepatoprotectoras**, por sus propiedades digestivas, protege el funcionamiento hepático (Rivas, 1991).

Además es una de las plantas que contiene más principios antiinflamatorios y es un buen antitusivo. Todo ello le permite ayudar a los pulmones a expulsar las secreciones producidas en los bronquios, a reducir la inflamación y a disminuir la tos. El uso de esta planta se recomienda en anomalías del aparato respiratorio como: Bronquitis, Catarro y Asma (Mujica, 2012).

El aceite esencial extraído de las semillas del anís es antiséptico y bactericida. En dosis elevadas es peligroso

porque es un depresor del Sistema Nervioso Central (Mendiola, 2009).

Sus extractos metanólicos y acuosos mostraron actividad potente frente a bacterias patogénicas y se sugiere considerar su uso como una alternativa para sustituir antibióticos, especialmente en la alimentación animal (Akhtar, 2008).

### **2.3. Antimicrobianos de origen vegetal**

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) (Hernández, 2003).

Los compuestos utilizados como antimicrobianos atacan varios sitios dentro de las células microbianas y dependiendo de la concentración utilizada, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Araujo et al., 2008).

Los sitios de acción de los antimicrobianos en la célula microbiana influyen a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de ciertos microorganismos (Conner, 1993).

### **2.3.1 Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural**

Conner (1993), sugirió que la actividad antimicrobiana de los compuestos vegetales se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos los involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto activo cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular.

Según Kabara (1991), citado por Nychas (1995), menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser de dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos

fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación.

### **2.3.2 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos**

Para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos (Kalemba y Kunicka, 2003).

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos, puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido. El método estandarizado y recomendado por el NCCLS se basa en el descrito originalmente por Bauer, que obtiene resultados cualitativos que correlacionan bien con los resultados cuantitativos obtenidos mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Cona, 2002).

## **2.4. Aceite esencial**

Se trata de sustancias líquidas, aromáticas y volátiles situadas en cualquier parte del vegetal, (cavidades, células, pelos o canales secretores) conformadas por un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas (alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas, etc.). Las esencias pueden ser producidas por tejidos secretorios, mientras que en otros casos se encuentran como enlace glucosídico en el interior de la planta como ocurre con la “valeriana”, en la que sólo aparece el aroma al secarse la raíz y no en estado fresco (Martínez, 2003).

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (Choquehuanca, 2004).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres y ácidos)
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del “ajo” y la “cebolla”, los cuales contienen compuestos azufrados. La fisiología vegetal, por el contrario, los considera metabolitos secundarios, no imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de la planta. Químicamente consisten en mezclas de pequeñas moléculas unitarias con cinco átomos de carbono es el isopropeno.

Sólo se unen dos, tres o raramente más, pero al estar modificadas en sus funciones químicas las combinaciones son numerosísimas. Un aceite esencial puede poseer de diez a quince componentes principales y otros tantos muy escasos, o trazas. El número y tipo de componentes, así como sus proporciones, pueden experimentar importantes cambios dentro de una misma especie botánica, sea por razones ecológicas (luz, temperatura, altitud), agronómicas (época

de siega, abonado) o puramente genéticas (quimiotipos o variedades químicas) (Choquehuanca, 2004).

#### **2.4.1 Función de los aceites esenciales en el vegetal**

Su función en la planta sigue en estudio, pero se le atribuyen algunos de los siguientes beneficios: para regular su temperatura, liberándolos como vapores; como atractivo para los insectos colaboradores de la polinización o como repelente para los insectos dañinos (Lima, 2005).

#### **2.4.2 Clasificación de los aceites esenciales**

Se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en **esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas**.

Las **esencias fluidas** son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los **Bálsamos** son de consistencia más espesa, son poco volátiles propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.

Las **Oleorresinas** tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavero, etc.) (Martínez, 2003).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como **naturales, artificiales y sintéticos**. Los **aceites esenciales naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los **aceites esenciales artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de “rosa”, “geranio” y “jazmín” enriquecidas con linalool, o la esencia de “anís” enriquecida con anetol. Los **aceites esenciales sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto,

son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, frutilla, etc.) (Martínez, 2003).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo al tipo de sustancia que lo compone mayormente. Según esto, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (por ejemplo: “hierbabuena”, “albahaca”, “salvia”, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (por ejemplo: “copaiba”, “pino”, “junípero”, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ejemplo: “clavo”, “canela”, “anís”, etc.) (Martínez, 2003).

Los aceites esenciales presentan dos grandes grupos de constituyentes. El primer grupo y el más importante es el de los terpenoides, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, que pueden encontrarse en forma de hidrocarburos o bien estar oxigenados con diversos tipos de funcionalización como: alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres, ésteres, epóxidos, peróxidos, etc. En el segundo grupo

englobamos a los demás componentes de las esencias: compuestos alifáticos y aromáticos no terpenoides, como: fenilpropanoides, compuestos nitrogenados y azufrados (Choquehuanca, 2004).

### **2.4.3 Distribución y estado natural**

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (“ajenjo”, “albahaca”, “buchú”, “cidrón”, “eucalipto”, “hierbabuena”, “limoncillo”, “mejorana”, “menta”, “pachulí”, “quenopodio”, “romero”, “salvia”, “toronjil”, etc.), en las raíces (“angélica”, “ásaro”, “azafrán”, “cálamo”, “cúrcuma”, “galanga”, “jengibre”, “sándalo”, “sasafrás”, “valeriana”, “vetiver”, etc.), en el pericarpio del fruto (“limón”, “mandarina”, “naranja”, etc.), en las semillas (“anís”, “cardamomo”, “eneldo”, “hinojo”, “comino”, etc.), en el tallo (“canela”, “caparrapí”, etc.), en las flores (“árnica”, “lavanda”, “manzanilla”, “piretro”, “tomillo”, “clavo de olor”, “rosa”, etc.) y

en los frutos (“alcaravea”, “cilantro”, “laurel”, “nuez moscada”, “perejil”, “pimienta”, etc.) (Choquehuanca, 2004).

#### **2.4.4 Propiedades**

- a) Color:** La mayoría son prácticamente transparentes, incoloro o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de manzanilla, que contiene camazuleno de un intenso color azul.
- b) Olor:** El olor de los aceites volátiles es muy variable, es su propiedad más característica.
- c) Sabor:** Son casi tan variables como sus olores. Algunos son dulces, otros tienen sabores suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes.
- d) Densidad:** Generalmente, son menos densos que el agua aunque también hay excepciones como las esencias del clavo de olor y de canela que son más densas.
- e) Deterioro:** Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos. La exposición a la luz y el aire deterioran la calidad y destruyen su fragancia. Se deben almacenar en botellas de color ámbar bien llenas, tapadas y, colocadas en un lugar fresco.

**f) Solubilidad:** Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque algunos de sus componentes se solubilizan, como por ejemplo los fenoles). Son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc.). La solubilidad en alcohol es variable y siendo solubles en alcoholes de alta graduación (Kuklinski, 2003).

#### **2.4.5 Extracción**

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles y enflorado o enfleurage y con fluidos supercríticos (Choquehuanca, 2004).

##### **➤ Método de la expresión**

En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos (Martínez, 2003).

➤ **Método de la destilación por arrastre con vapor de agua**

La muestra vegetal generalmente seca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Choquehuanca, 2004).

➤ **Método de la extracción con solventes volátiles**

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque

se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Chamorro et al., 2006).

➤ **Método de enflorado o enfleurage**

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (“rosa”, “jazmín”, “azahar”, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Huamaní y col, 2005).

➤ **Método de extracción con fluidos supercríticos**

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico

(por ejemplo bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Choquehuanca, 2004).

#### **2.4.6 Composición Química**

Los aceites esenciales son una compleja mezcla de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro. Los principales componentes son:

➤ **Carburos terpénicos:** Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los Aceites esenciales,

resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como por ejemplo los pinos y muchos tipos de cítricos. Uno de los terpenos más comunes es el pineno, que se encuentra, entre otros, en la trementina, extraída del pino. Aunque no siempre se han de considerar tóxicos, los terpenos, tomados en dosis suficientemente elevadas, pueden producir convulsiones, insomnio, náuseas, pesadillas, temblores y vértigo, entre otros problemas. Algunos de los terpenos más usuales son el limoneno, felandreno, camfeno, cariofileno (INFA, 2000).

➤ **Cetonas:** Parecidas químicamente a los terpenos, algunas cetonas como la thuyona, se hallan en *Artemisia absinthium* (ajenjo), utilizado en la fabricación de numerosas bebidas alcohólicas como el vermut (Rodríguez, 2000).

➤ **Alcoholes:** Como el borneol, mentol, geraniol, linalol o cineol.

➤ **Fenoles:** Timol, eugenol, eucaliptol, carvacrol, anetol.

➤ **Aldehídos:** Cinámico, anísico y benzoico.

➤ **Ésteres:** Acetato de linalilo, salicilato de metilo (compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).

➤ **Carburos saturados y ácidos, compuestos sulfurados.**

#### **2.4.7 Usos**

Los aceites esenciales, obtenidos a partir de plantas aromáticas y medicinales, se utilizan ampliamente como alimentos, medicamentos, agentes conservantes, entre otras aplicaciones. Como planta medicinal, se usa como antipirético, antiparasítico, antifúngico y para trastornos digestivos, en forma de polvo, infusión, tintura y jarabes (Noorizadeh et al., 2011).

Los egipcios fueron los primeros en destilar las plantas, con el objetivo de extraer los aceites esenciales respectivos. Utilizaron éstos en la medicina y en rituales religiosos, o como embelesadores de la piel, perfumes y pociones para la cara. Los aceites eran tenidos con un valor incalculable, por eso eran ofrecidos a los dioses (Rodríguez, 2000).

##### **a. Industria Alimentaria.**

Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el “cilantro”, “naranja” y “menta”, entre otros. También son utilizados en la

preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad podemos citar las esencias extraídas del “naranja”, “limón”, “mentas” e “hinojo”, entre otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas (Fester et al., 1961).

#### **b. Industria Farmacéutica.**

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros) (Fester et al., 1961).

#### **c. Industria de Cosméticos.**

Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda y rosas (Fester et al., 1961).

#### **d. Industria de productos de uso veterinario.**

Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. (Van Ginkel, 2003).

#### **e. Otros Usos**

- Para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas.
- La industria de las pinturas emplea limoneno como disolvente biodegradable. También se imparte olor a juguetes.
- En textiles, como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido.
- En papelería, para impregnar de fragancias cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales.
- En la industria tabacalera demanda mentol para los cigarrillos mentolados.
- En la elaboración de insecticidas: Contra hormigas (*Mentha spicata*); contra áfidos (ajo), contra pulgas (“lavanda”, “mentas”); contra moscas

("ruda", "citronela", "menta"); contra piojos ("***Mentha spicata***", "albahaca", "ruda"); contra polilla ("mentas", "hisopo", "romero"); contra cucarachas ("menta", "ajenjo", "eucalipto", "laurel") y contra nemátodos ("salvia", "caléndula", "aspáragus"), entre otros (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

## **2.5. Bacteria**

### **2.5.1. Generalidades**

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni Retículo Endoplásmico que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de

pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan sólo en el interior de la célula del organismo anfitrión o en el ambiente hipertónico. Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño (1 a 20  $\mu\text{m}$  o más), forma (esferas, bastoncillos espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadena y formando cúmulos); mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunos mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de forma permanente. También se encuentran bacterias en el ambiente como el aire que se respira, el agua que se bebe y en los alimentos que se comen; aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los factores tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles (Murray et al., 2007).

### **2.5.2. *Salmonella***

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gramnegativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacteriáceas: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasas negativo y suelen ser móviles (Yousef y Carlstrom, 2006).

La familia *Enterobacteriaceae* es la más grande de bacilos Gramnegativos con importancia clínica. Se han descrito 40 géneros con más de 150 especies. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica e hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones (Murray et al., 2007).

El género *Salmonella* está formado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino del hombre y de muchas especies animales, causando patología intestinal (Romero, 2007).

Algunas especies de *Salmonella* son: *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella nyanza*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella virginia*.

De las anteriores, **S typhi**, **S choleraesuis** y **S enteritidis**, son las especies que hasta el momento se reconocen como patógenas a su vez, según la serotipificación de Kauffman y White, eran clasificadas en más de 2 200 serotipos en base a los antígenos flagelares H (proteicos) y antígenos somáticos O (fracción polisacárida del lipopolosacárido bacilar). **S. typhi** posee además un antígeno de virulencia.

***Salmonella spp*** es un microorganismo que se adapta muy bien a los animales y a las personas. Cuando llega a los alimentos es capaz de multiplicarse en cualquier producto fresco a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 o 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20 °C). Si los alimentos no se refrigeran rápidamente y a baja temperatura (el límite de crecimiento está en 6 °C) el microorganismo

se multiplica, con el consiguiente riesgo para los consumidores. Sin embargo, posee una escasa capacidad de multiplicación si no existe oxígeno.

### **2.5.2.1 Características de crecimiento**

#### **a. Temperatura**

*Salmonella* puede crecer entre 7-49 °C, su crecimiento se ve reducido a < 15 °C.

Al evaluar la temperatura de este microorganismo, se señala que pueden crecer a 5,9 °C, sin embargo, estos datos no son concluyentes porque dependen del serovar y el medio de cultivo donde se inocula (Lake et al, 2002).

#### **b.pH**

*Salmonella* crece a un pH que varía entre 4-9, la tolerancia al ácido depende del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo, y por factores como la temperatura y sustancias como los nitritos (Lake et al, 2002).

### **c. Condiciones atmosféricas**

*Salmonella* se clasifica como anaerobio facultativo (Ellermeier y Slauch, 2006).

El crecimiento bajo atmósferas de nitrógeno es ligeramente menor a las condiciones aeróbicas.

Puede crecer de 8-11 °C con concentraciones de 20-50 % de CO<sub>2</sub>, su crecimiento se ve retardado cuando hay un 80 % de CO<sub>2</sub> en el aire (Lake et al, 2002).

### **d. Actividad de agua (a<sub>w</sub>)**

*Salmonella* puede multiplicarse en a<sub>w</sub> que van desde 0,94 hasta 0,995 y puede persistir en alimentos con a<sub>w</sub> inferiores a 0,94 como chocolate, nueces y mantequilla de maní (Lake et al, 2002).

## **2.5.2.2 Características de Supervivencia**

Se sabe que *Salmonella* crece bien en alimentos (especialmente si tiene un alto contenido de proteína como el pollo y el huevo), así como en superficies de la industria de alimentos. La habilidad de *Salmonella*

para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe en parte a su capacidad para responder efectivamente a los cambios medioambientales (Humphrey, 2004).

**a. Temperatura**

*Salmonella* puede sobrevivir por largos periodos a temperatura de refrigeración, especialmente en alimentos que tengan grasa, estudios señalan que pueden sobrevivir por encima de 5 °C (Oscar, 2009).

**b. Concentración de sal**

*Salmonella* generalmente es sensible a altas concentraciones de sal (9 %), aunque puede crecer en productos que tengan 3 % de cloruro de sodio (Thomas y Wimpenny, 1996).

**c. pH**

Puede crecer en función del tipo de ácido empleado en: ácido clorhídrico (4,05), ácido cítrico (4,05), ácido tartárico (4,1), ácido glucónico (4,2), ácido fumárico (4,3), ácido málico (4,3), ácido láctico (4,4), ácido succínico

(4,6), ácido glutárico (4,7), ácido adipico (5,1), ácido pimélico (5,1), ácido acético (5,4) y ácido propiónico (5,5). Es importante señalar en función de la serovariedad *S. Typhimurium* es la más resistente hasta ahora reportada (Jay et al., 2005).

### **2.5.2.3 Inactivación**

#### **a. Temperatura**

La muerte de *Salmonella* puede presentarse en los procesos de congelación, pero puede permanecer viable durante este proceso, por lo que debe tenerse en cuenta que la congelación no garantiza su muerte (Jay et al., 2005).

#### **b. Valor D**

El valor D para *Salmonella* a 60 °C es de 2-6 minutos (dependiendo del alimento) y a 70 °C es de un minuto, el cual se altera por el contenido de grasa existente en el alimento. Algunos serovares son más resistentes, por ejemplo, *S. Senftenberg* (Doyle y Mazzotta, 2000).

**c. Cloruro de sodio**

Concentraciones superiores a 9 % de cloruro de sodio resultan bactericidas para *Salmonella* (Jay et al., 2005).

**d. Actividad de agua**

El número de *Salmonella* disminuye a medida que disminuye el  $a_w$  de los alimentos. Valores bajos de  $a_w$  parecen tener un efecto protector sobre *Salmonella* (Lake et al, 2002).

**e. pH**

*Salmonella* no crece en pH inferiores a 4.0 (Jay et al., 2005).

**f. Conservantes**

*Salmonella* inhibe su crecimiento en presencia de 0,1 % de ácido acético a pH 5,1 (Lecompte et al., 2009).

Los nitritos pueden ser eficaces para destruir a *Salmonella* siempre que su pH sea ácido (Jay et al., 2005).

#### 2.5.2.4 Patogenia

La salmonelosis es la infección causada por una bacteria del género *Salmonella* (Romero, 2007).

La salmonelosis también puede producir: **gastroenteritis**, forma más frecuente de salmonelosis, los síntomas suelen aparecer entre las 6 y las 48 horas siguientes a la ingestión de alimentos o agua contaminada, con una sintomatología inicial de náuseas, vómitos y diarrea no sanguinolenta, los síntomas pueden persistir entre 2 días y 1 semana antes de la resolución espontánea. **Septicemia**, una infección de la sangre, todas las especies de *Salmonella* pueden dar lugar a bacteriemia, aunque las infecciones por *S. choleraesuis*, *S. paratyphi* y *S. typhi* son las que con mayor frecuencia la producen. El riesgo de bacteriemia por *Salmonella* es más alto en pacientes pediátricos, geriátricos y con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). **Fiebre entérica o fiebre tifoidea**, producida por

*Salmonella typhi*. Entre 10 y 14 días después de la ingestión de los bacilos, los pacientes presentan fiebre que va aumentando progresivamente, con síntomas inespecíficos como cefalea, mialgias, malestar general y anorexia. Estos síntomas duran al menos 1 semana y son seguidos por síntomas gastrointestinales. La mortalidad se acerca al 15 % en casos no tratados de fiebre tifoidea (Madigan y col, 2004).

*Salmonella* posee mecanismos que le permiten adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y puede sobrevivir al pH ácido del estómago, responde al estrés oxidativo causado por el óxido nítrico o el peróxido de hidrógeno, mecanismos que juegan un papel determinante en la infectividad a nivel celular, la habilidad de *Salmonella* para inhibir y/o resistir el pH de los fagosomas es un mecanismo importante de defensa (Humphrey, 2004).

Puede multiplicarse dentro de las células intestinales y liberar una endotoxina, el mecanismo de invasión tradicionalmente se limita a las células del intestino, donde puede causar daño a la mucosa del intestino delgado y el colon (Lake et al, 2002).

*Salmonella enterica* puede atravesar el epitelio del tracto intestinal, donde causa inflamación y libera una enterotoxina y una endotoxina (D´Aoust y Maurer, 2007), no obstante en recientes brotes alimentarios se han reportado infecciones urinarias y apendicitis asociadas a *Salmonella* (MMRW, 2002), sugiriendo un mecanismo de adaptación de este microorganismo a otros tejidos.

*Salmonella* entra por la vía fecal-oral que al sobrevivir en el ambiente ácido del estómago son capaces de colonizar varios sitios incluyendo el intestino delgado, colon y ciego. La adherencia intestinal está mediada por fimbrias o pili presentes en la superficie celular de las bacterias. Hay muchos tipos de fimbrias asociada con *Salmonella* que

pueden jugar un papel en la colonización incluyendo:

- **Fimbrias tipo 1 (FIM)**

Específica  $\alpha$ -D-manosa receptores en la superficie de múltiples tipos de células. Fimbrias de tipo 1 se compone de siete genes (fimAICDHF). La subunidad estructural importante FIMA, y FimH es la subunidad que interactúa con los receptores de superficie de la célula huésped para facilitar la fijación. Las diferencias en la secuencia genética de FimH y fimA probablemente, desempeñan un papel en el tropismo de la célula huésped demostrada por algunos patógenos.

- **Fimbrias largas polar (LPF)**

LPF se une a la superficie de las placas de Peyer y las células M.

- **Plásmidos**

Codifican las fimbrias (PEF), FEM se une a las vellosidades del intestino.

La proteína reguladora importante es T3SS Hila, cuya expresión está mediada por una serie de factores ambientales importantes para la supervivencia celular (Murray et al., 2007).

El tratamiento antibiótico de las infecciones por Enterobacteriaceae se debe basar en las pruebas de sensibilidad *in vitro* y en la experiencia clínica. Mientras algunos microorganismos como *E. coli* y *P. mirabilis* son sensibles a muchos antibióticos, otros pueden ser muy resistentes. Además, los microorganismos sensibles que son expuestos a concentraciones infraterapéuticas de antibióticos en un medio hospitalario pueden desarrollar resistencias rápidamente. En general, la resistencia a antibióticos es más frecuente en las infecciones nosocomiales que en las infecciones que se adquieren en la comunidad (Murray et al., 2007).

### 2.5.2.5 Epidemiología

*Salmonella* es un importante patógeno alimentario en todo el mundo. Se ha reportado que en el mundo anualmente se presentan más de 1,3 billones de salmonelosis y tres millones de muertes, la tasa de mortalidad en individuos que se han infectado con *Salmonella* es tres veces mayor que en personas que no se han expuesto a *Salmonella* en el año siguiente a la patología (Helms et al., 2003).

La mayoría de las infecciones son consecuencia de la ingestión de productos alimentarios contaminados, y, en los niños, de una transmisión directa por vía feco-oral. La incidencia de la enfermedad es más elevada en niños menores de 5 años y en adultos mayores de 60 años, que se infectan durante los meses de verano y otoño cuando los alimentos contaminados se consumen en reuniones sociales al aire libre. Se registraron alrededor de 45 000 casos de infecciones por

*Salmonella* en EE.UU. en el año 2004, aunque se ha estimado que ocurren más de 1,4 millones de infecciones y 600 muertes cada año (Murray et al., 2007).

#### 2.5.2.6 *Salmonella typhi*

##### a. Descripción

La especie *Salmonella typhi* es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Pertenece al serotipo 9,12, en base a los epítopes de la tivelosa, el azúcar repetido en su antígeno "O". Además de los antígenos "O" y "H", tiene en su exterior una cápsula de polisacáridos denominada "Vi" (por antígeno de "virulencia"). Estos bacilos no producen esporas. La mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos peritricos, que rodean a la célula. Interesantemente, existen cepas no móviles en Indonesia, en donde la incidencia de la fiebre tifoidea es más alta.

*Salmonella typhi* produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; pero no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa y otros azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato y también produce ácido sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (Romero, 2007).

#### **b. Taxonomía**

Se muestra la clasificación taxonómica de *Salmonella typhi*:

<b>Clasificación científica</b>	
Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Salmonella</i>
Especie:	<i>Salmonella typhi</i>

### c. Epidemiología

La dosis infecciosa para las infecciones por *Salmonella typhi* es baja, por lo que es frecuente la transmisión horizontal de una persona a otra. Estos microorganismos se pueden multiplicar hasta alcanzar concentraciones elevadas cuando los alimentos contaminados no se conservan adecuadamente. La dosis infecciosa es menor en las personas de riesgo para la enfermedad debido a su edad, estado de inmunodepresión o coexistencia de una enfermedad subyacente (leucemia, linfoma, anemia drepanocítica) o reducción del pH gástrico (Murray et al., 2007).

Las infecciones por *Salmonella typhi* se contraen al ingerir agua o alimentos contaminados por un manipulador infectado.

Se comunicaron 283 infecciones por *Salmonella typhi* en EE.UU. en 2004, la mayor parte de las cuales se adquirieron durante viajes al extranjero. A diferencia de lo anterior, se estima

que cada año se producen 21 millones de infecciones y 200 000 muertes por *S. typhi* cada año a nivel mundial. El riesgo de padecer la enfermedad es más alto en los niños desfavorecidos de los países en vías de desarrollo (Murray et al., 2007).

#### **d. Patogenia**

Por haber sido una patología muy prevalente en nuestro medio en décadas anteriores, las generaciones de clínicos que nos han precedido, con menos medios diagnósticos que nosotros, hicieron un esfuerzo encomiable por buscar matices clínicos específicos que ayudaran al diagnóstico de la enfermedad, dejándonos bellos y minuciosos tratados, pero poco prácticos ya que en la mayoría de las ocasiones la enfermedad se presenta como un cuadro sistémico caracterizado por fiebre y malestar general indistinguible del comienzo de otras enfermedades habituales en nuestro medio de etiología infecciosa, tumoral o autoinmune.

El periodo de incubación suele ser variable, entre 2 y 3 semanas, el comienzo insidioso y los síntomas predominantes son fiebre de intensidad variable, cefalea, diarrea, estreñimiento, tos, náuseas y vómitos, anorexia, dolor abdominal y escalofríos (Koneman et al., 2008).

**Complicaciones:** Son muy raras de ver en el momento actual, sobre todo en el paciente correctamente diagnosticado y tratado. Las más graves y frecuentes y por tanto, las que más tenemos que vigilar suelen aparecer a partir de los 10 días de evolución y son la hemorragia y la perforación intestinal. Es excepcional la presentación en forma de neumonía, meningitis, espondilitis, endocarditis, abscesos u otras localizaciones, así como la presentación de shock endotoxínico tras la instauración de antibioterapia. Como complicación también se puede considerar el estado de portador crónico,

definido como la presencia de ***Salmonella typhi*** en las heces o en la orina durante más de un año (Koneman et al., 2008).

**Diagnóstico:** Aunque la clínica y los antecedentes epidemiológicos nos son útiles, el diagnóstico se basa en el aislamiento de la ***Salmonella typhi***, fundamentalmente en los hemocultivos que suelen ser positivos en la primera semana en el 90 % de los casos, perdiendo sensibilidad con el paso de los días (50 % en la tercera semana).

El coprocultivo y el urocultivo suelen ser negativos en la primera semana y terminan siendo positivos en el 75 % de los casos en la tercera semana. En el caso de un portador crónico el coprocultivo positivo puede inducir a error.

También se puede aislar el microorganismo en la médula ósea (permite el aislamiento del germen al comienzo de la

enfermedad, incluso en aquellos que han recibido antibióticos) y en lesiones de la piel (roséola).

El diagnóstico serológico cada vez se utiliza menos por su baja sensibilidad y especificidad. Puede ser útil en aquellos pacientes en los que se sospecha la enfermedad y que han tomado antibióticos antes de la toma de hemocultivos siendo estos negativos (Koneman et al., 2008).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de experimentación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1. Material biológico:

- Aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís), extraído de sus semillas.

##### 3.2.2. Material microbiológico:

- Cepa de *Salmonella typhi* ATCC 6539

##### 3.2.3. Materiales y equipos:

###### a. Material de vidrio

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 15x125 mm
- Tubos de ensayo de 13x100 mm
- Tubos de ensayo de 15x125 mm

- Placa Petri de 10x100 mm
- Matraz de 500 ml
- Matraz de 250 ml
- Matraz de 100 ml
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de 5 ml
- Pipeta de 10 ml
- Vaso precipitado de 200 ml
- Vaso precipitado de 500 ml
- Frasco de vidrio color ámbar de 100 ml
- Frasco de vidrio de 500 ml
- Probeta de 100 ml
- Balones de vidrio de 100 ml
- Balones de vidrio de 250 ml
- Balones de vidrio de 500 ml
- Embudo de vidrio
- Fiolas de 100 ml

**b. Medios de Cultivo**

- Agar Müeller Hinton (MH)
- Caldo Müeller Hinton (MH)
- Medio Infusión Cerebro Corazón (BHI)

### **c. Otros materiales**

- Asa de Kolle
- Bagueta
- Espátula
- Gradillas
- Papel de filtro
- Trípode y malla de asbesto
- Discos de papel de filtro

### **d. Reactivos**

- Alcohol etílico de 70°
- Alcohol yodado
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Agua destilada

### **e. Equipos**

- Autoclave
- Estufa de incubación
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen
- Refrigeradora
- Incubadora
- Equipo de destilación

- Micro pipeta de 0,5 – 10  $\mu$ l
- Micro pipeta de 10 – 100  $\mu$ l

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Diseño experimental: Aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (Murray, 2002).

Para la ejecución del experimento se utilizó el diseño experimental de bloques completo al azar con 11 tratamientos y 4 repeticiones, teniendo así un total de 44 unidades experimentales

#### 3.3.2. Variables:

##### **Variables independientes**

Concentración del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís).

##### **Variable dependiente**

Grado de actividad antibacteriana de *Pimpinella anisum L.* (diámetro de halos de inhibición de crecimiento) sobre *Salmonella typhi ATCC 6539.*

### **Controles**

- Como control negativo se utilizó el vehículo líquido dimetilsulfóxido y
- Como control positivo se empleó cultivos de ***Salmonella typhi* ATCC 6539.**

### **3.3.3. Recolección, extracción y densidad del aceite esencial:**

#### **3.3.3.1 Recolección de *Pimpinella anisum* L. (anís)**

El anís en estudio fue obtenido de una comercializadora de abarrotes, ubicada en el Mercado Mayorista de la localidad (Mercado Grau), se compró una cantidad de 4000 gramos, y se colocaron en bolsas de primer uso, para su posterior traslado al laboratorio.

#### **3.3.3.2 Extracción de aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. (Técnica de Lock de Ugaz, O., 1994).**

La obtención del aceite esencial se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de

agua. El equipo de destilación estuvo compuesto por un sistema de doble balón, en el cual solo uno de los balones, de capacidad volumétrica de un litro contuvo agua destilada (volumen aproximado de 600 ml), y fue sometido a calor directo (cocina eléctrica); mientras que en el segundo balón, de capacidad volumétrica de un litro, se colocó aproximadamente 250 gramos de muestra, los cuales recibieron los vapores del agua, para luego liberar el vapor mixto (agua – aceite esencial) hacia el refrigerante.

El producto destilado se recibió en un depósito estéril, donde se observó un estado bifásico entre agua y aceite esencial por la diferencia de densidades. Esto permitió separar el aceite esencial mediante el uso de una pipeta Pasteur a un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz del ambiente. El aceite esencial se almacenó a temperatura ambiente y

en oscuridad hasta su utilización.

**Tabla 02:** Características organolépticas

<b>Aceite Esencial de <i>Pimpinella anisum</i> L.</b>	
<b>Aspecto</b>	Líquido traslúcido
<b>Color</b>	Amarillo Pálido
<b>Olor</b>	Característico
<b>Sabor</b>	Picante y Dulce

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.3.3 Determinación de la densidad del aceite

**Donde:**

d= densidad (g/ml)

m= masa (g)

v= volumen (ml)

W<sub>1</sub>= Peso probeta (g)

W<sub>2</sub>= Peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite= Volumen de aceite (ml)

Vol. aceite= 1,5 ml.

W<sub>1</sub>= 16,1976 g.

W<sub>2</sub>= 17,6707 g.

$$d=m/v$$

$$d= \frac{W_2 - W_1}{1,5 \text{ ml}}$$

$$1,5 \text{ ml}$$

$$d= \frac{(17,6707 \text{ g.} - 16,1976 \text{ g.})}{1,5 \text{ ml}}$$

$$1,5 \text{ ml}$$

$$d = 0,9821 \text{ g/ml} = 982,1 \text{ mg/ml}$$

#### 3.3.4. Cepa

Se utilizó un microorganismo patógeno de importancia clínica: ***Salmonella typhi* ATCC 6539**, proporcionada por el Ministerio de Salud-Tacna (MINSA).

#### 3.3.5. Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. (Técnica Duraffourd y col, 1983)

La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en disco).

En el ensayo se usó volúmenes de aceite esencial puro (15  $\mu\text{l}$  – 40  $\mu\text{l}$ ) para la determinación de los halos de inhibición, con el fin de saber entre cuáles concentraciones se ubica el CMI.

Esta técnica estandarizada por la NCCLS (Nacional Commite for Clinical Laboratory Standars), basada en el método de Kirby Bauer, el cual se basa en que el compuesto a estudiar se difunde por el medio de agar produciendo un gradiente de concentración, entonces si el compuesto es efectivo contra el microorganismo a prueba se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido en el compuesto. El tamaño de la zona proporciona indicios de la relativa actividad de la sustancia.

#### **a) Preparación de discos**

En esta etapa se preparó discos de sensibilidad de 6 mm de diámetro (previamente esterilizados), los discos de sensibilidad fueron embebidos con una micropipeta de rango variable con volúmenes de 15,0  $\mu\text{l}$ , 17,5  $\mu\text{l}$ , 20,0  $\mu\text{l}$ , 22,5  $\mu\text{l}$ , 25,0  $\mu\text{l}$ , 27,5  $\mu\text{l}$ ,

30,0 µl, 32,5 µl, 35,0 µl, 37,5 µl, 40,0 µl de aceite esencial respectivamente, teniendo un total de 44 discos que correspondieron a 4 repeticiones.

La esterilización consistió en la desnaturalización de los discos con antibióticos, que fueron colocados en un vaso de precipitado (capacidad de 100 ml) con agua destilada aprox. 80ml y llevados a la autoclave a una presión de 20 Bar (121 °C) por 15 minutos. Se realizó una segunda repetición para descartar cualquier resto de antibiótico. Luego se desechó el agua destilada del vaso de precipitado y se colocó a la estufa para su secado a 170 °C por 1 hora.

**Control negativo:**

Consistió en un disco de sensibilidad de antibiótico desnaturalizado el cual estuvo impregnado con agua destilada para así descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

**Tabla 03:** Concentraciones de cada tratamiento

<i>Aceite esencial de Pimpinella anisum L. puro</i>		
<b>N° Tratamiento</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>[ ] (mg/ml)</b>
T1	15,0	14,7315
T2	17,5	17,1867
T3	20,0	19,6420
T4	22,5	22,0972
T5	25,0	24,5525
T6	27,5	27,0077
T7	30,0	29,4630
T8	32,5	31,9183
T9	35,0	34,3735
T10	37,5	36,8287
T11	40,0	39,2840

**Fuente:** Elaboración propia

**b) Preparación del inóculo bacteriano de *Salmonella typhi* ATCC 6539**

La bacteria que se utilizó en el trabajo se cultivó en un vial de agar nutritivo para su mantención; para luego

ser activada en Caldo Müller Hinton e incubada por el lapso de 4 a 6 horas hasta llegar a una concentración de  $1,5 \times 10^8$ , comparada con el tubo 0,5 de la escala de Mac Farland.

**c) Prueba de susceptibilidad: Método de difusión en disco de susceptibilidad (Kirby – Bauer)**

Se inoculó la placa de agar Müller Hinton, utilizando la suspensión estandarizada de bacterias a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  (Tubo 0,5 de Mac Farland). Con ayuda de una micro pipeta se depositó 100  $\mu$ l del inóculo bacteriano sobre la superficie del agar de cada placa, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quedó distribuido de modo homogéneo. Se dejó secar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.

Los discos fueron embebidos con 15,0  $\mu$ l, 17,5  $\mu$ l, 20,0  $\mu$ l, 22,5  $\mu$ l, 25,0  $\mu$ l, 27,5  $\mu$ l, 30,0  $\mu$ l, 32,5  $\mu$ l, 35,0  $\mu$ l, 37,5  $\mu$ l, 40,0  $\mu$ l de aceite esencial, y dejados reposar durante 30 minutos para su mejor

impregnación. Cada disco impregnado con el aceite esencial, fue tomado con una pinza estéril y se colocó sobre la superficie de las placas con agar, haciendo una ligera presión para asegurar el contacto con el medio.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 - 24 horas para observar la presencia y el tamaño de los halos de inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos alrededor del diámetro del disco. El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre el microorganismo estudiado. Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por Duraffourd, 1983; que considera la actividad de los aceites esenciales como: Resistente, para un diámetro inferior a 11 mm; y finalmente para un diámetro superior o igual a 11 mm, el microorganismo se considera sumamente sensible.

**3.3.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): Método de la macro dilución en medio líquido. Técnica: (Granados y Villaverde, 1996)**

**a) Preparación de la solución madre**

Se preparó una solución madre de 10 000 µl totales: 2 300 µl de aceite esencial con 2 300 µl de Dimetilsulfóxido 10 % (DMSO) y 5 400 µl de caldo Mueller Hinton (MH). La concentración final se obtuvo de la siguiente manera (Duraffourd, 1983).

A partir de la densidad obtenida = 0,9821 g/ml => 982,1 mg/ml.

Se sabe que: en 1 ml o en 1 000 µl existe una concentración de 982,1 mg de aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.***

En la solución madre se utilizó 2,3 ml o 2 300 µl, en consecuencia se determinó lo siguiente:

$$1 \text{ ml} = 1\,000 \text{ µl} \longrightarrow [ ] = 982,1 \text{ mg}$$

$$2\,300 \text{ µl} \longrightarrow X$$

$$X = 2\,258,83 \text{ mg}$$

Por tanto, en 2 300  $\mu$ l de aceite esencial existe una concentración de 2 258,83 mg de aceite esencial de anís.

Para la solución madre: esta concentración se diluyó en 10 000  $\mu$ l de solución total, por lo cual se consiguió una concentración final de:

$$2\,258,83\text{ mg} \longrightarrow 10\,000\ \mu\text{l}$$

$$X \longrightarrow 1\,000\ \mu\text{l}$$

$$X = 225,883\text{ mg/ml}$$

Entonces en 1 ml o 1 000  $\mu$ l de solución madre, se obtuvo una concentración final de 225,883 mg de aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*

**b) Preparación del inóculo bacteriano de *Salmonella typhi* ATCC 6539 (Técnica de De Paula y Martins, 2000)**

La cepa bacteriana fue activada en tubos que contenían Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubada a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente fue transferida a viales con agar Nutritivo e incubada a 37 °C durante 24 horas.

Para la preparación de la suspensión del inóculo del agente bacteriano de prueba, se tomó asadas del cultivo y se suspendió en 10 ml de Caldo Müeller Hinton, y se incubó por 6 a 8 horas a 37 °C hasta alcanzar la turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  cel/ml).

**c) Preparación del CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) para *Salmonella typhi* ATCC 6539**

Se utilizó el método de la Macro dilución en tubos con medio Caldo Müeller Hinton, preparando diluciones del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* a diferentes concentraciones, después de los cual se agregó una suspensión bacteriana constante de acuerdo al estándar de turbidez de 0,5 de Mac Farland.

Se prepararon 12 tubos de 15 x 125 mm, de los cuales se tomaron dos tubos control: un control negativo (Dimetilsulfóxido al 10 %), y un control positivo, conteniendo una suspensión de *Salmonella typhi* ATCC 6539, en los restantes tubos se agregó lo siguiente:

**Tabla 04:** Preparación de volúmenes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Tratamiento	V. Solución Madre (µl)	Caldo Müller Hinton (µl)	Vol. Total de la solución (µl)
<b>T1</b>	310,0	2690,0	3000
<b>T2</b>	349,5	2650,5	3000
<b>T3</b>	389,0	2611,0	3000
<b>T4</b>	428,5	2571,5	3000
<b>T5</b>	468,0	2532,0	3000
<b>T6</b>	507,5	2492,5	3000
<b>T7</b>	547,0	2453,0	3000
<b>T8</b>	586,5	2414,5	3000
<b>T9</b>	626,0	2374,0	3000
<b>T10</b>	665,5	2334,5	3000

**Fuente:** Elaboración propia

Aquí las concentraciones finales cambiaron ya que en el caso del primer tubo el cual contuvo los 310 µl de solución madre, tendría una concentración inicial, de acuerdo al volumen de solución madre que se utilizó, de 70,0237 mg/ml. Lo cual se determinó de la siguiente manera:

225,883 mg/ml → 1 000 µl

X → 310 µl

X = 70,0237 mg/ml

Esta concentración se diluyó en 3 000 µl y tuvo una concentración final (para la CMI) de 23,3412 mg/ml.

Los tubos quedaron con las siguientes concentraciones de aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*

**Tabla 05:** Concentraciones finales para identificación del CMI

Tratamiento	V. Solución Madre (µl)	Caldo Müller Hinton (µl)	Vol. Total de la solución (µl)	Conc. Inicial en (mg/ml)	Conc. Final de la solución (mg/ml)
T1	310,0	2690,0	3000	70,0237	23,3412
T2	349,5	2650,5	3000	78,9461	26,3154
T3	389,0	2611,0	3000	87,8685	29,2895
T4	428,5	2571,5	3000	96,7909	32,2636
T5	468,0	2532,0	3000	105,7132	35,2378
T6	507,5	2492,5	3000	114,6356	38,2119
T7	547,0	2453,0	3000	123,5580	41,1860
T8	586,5	2414,5	3000	132,4804	44,1601
T9	626,0	2374,0	3000	141,4028	47,1343
T10	665,5	2334,5	3000	150,3251	50,1084

Fuente: Elaboración propia

Luego se agregó 300 µl de la solución bacteriana de ***Salmonella typhi* ATCC 6539** a cada tratamiento.

### **3.3.7. Determinación de la concentración mínima bactericida “CMB” (Técnica de Granados y Villaverde, 1996).**

Una vez obtenida la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se procedió a determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Para ello de los 10 tratamientos usados para determinar el CMI se tomó los tubos en donde no se presentó turbidez, los cuales fueron el T8, T9 y T10.

De cada uno se sembró 0,1 ml por diseminación en placas que contenían agar Müeller Hinton. Las placas se dejaron secar por 5 minutos y luego fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en cada concentración del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.***, y así se ubicó el correspondiente CMB ( $\leq 1$  UFC/placa).

### **3.3.8. Procesamiento y análisis estadístico (Murray, 2002).**

Todos los datos fueron procesados a través del software estadístico STATGRAPHICS VERSIÓN 5.1.

Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA), usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 y para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó la prueba de significación de Tukey al 0,05.

Para establecer el grado de relación entre la variable independiente y dependiente se realizó el análisis de regresión y correlación simple.

Los tratamientos a base de aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* se expresaron en términos de mg/ml, mientras que los promedios de los halos de inhibición o de sensibilidad se expresaron en milímetros (mm).

#### IV. RESULTADOS

Se realizó el estudio *in vitro* en la especie bacteriana: ***Salmonella typhi* ATCC 6539** demostrándose la sensibilidad de la bacteria mencionada frente al aceite esencial de ***Pimpinella anisum* L.** “anís”; para lo cual se trabajó con 11 tratamientos y 4 repeticiones.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas han sido agrupados en cuadros y gráficas para su mejor interpretación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que éste es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

**CUADRO 01:** Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi* ATCC 6539 por el método de difusión en disco Kirby Bauer.

Tratamiento	Aceite esencial		Inóculo Bacteriano Volumen (µl/placa)	Diámetro del halo de inhibición (mm)				Promedio
	Volumen	Conc. (mg/ml)		Repeticiones				
				I	II	III	IV	
T1	15,0 µl	14,7315	100	8,02	8,06	8,38	7,36	7,96
T2	17,5 µl	17,1867	100	7,94	8,88	8,66	8,72	8,55
T3	20,0 µl	19,6420	100	9,44	10,18	6,94	8,36	8,73
T4	22,5 µl	22,0972	100	10,32	11,28	10,44	10,62	10,67
T5	25,0 µl	24,5525	100	9,92	10,54	11,16	10,42	10,51
T6	27,5 µl	27,0077	100	11,38	10,94	10,92	9,72	10,74
T7	30,0 µl	29,4630	100	11,51	13,72	10,58	10,82	11,66
T8	32,5 µl	31,9183	100	11,86	10,94	11,06	11,72	11,40
T9	35,0 µl	34,3735	100	12,44	12,38	11,92	11,88	12,16
T10	37,5 µl	36,8287	100	14,23	14,51	15,06	13,98	14,45
T11	40,0 µl	39,2840	100	16,57	16,12	15,69	16,44	16,21

**Fuente:** Elaboración propia

En el Cuadro 01 se observa el efecto antibacteriano de las 11 concentraciones probadas, lo cual se evidenció mediante la formación de los halos de inhibición con medidas entre los 7,96 y 16,21 mm de diámetro. Siendo la concentración de 39,2840 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño.

También se pudo determinar la sensibilidad de *Salmonella typhi* **ATCC 6539**, de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz ( $\geq 11$  mm), lo cual se evidenció a partir del tratamiento 7 (T7).

**CUADRO 02:** Análisis de varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (Kirby – Bauer) de las concentraciones del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi* **ATCC 6539**, entre los diferentes tratamientos empleados.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Significación 0,05
Bloques	3	3,151	1,050		
Tratamientos	10	245,454	24,545	2,12	0,1187 ns
Error	30	14,868	0,495	49,53	0,000 *
Total	39	253,473			

**CV.** 6,29 % \* Diferencias significativas **ns** no significativo

**Fuente:** Elaboración propia diseñado en Statgraphics

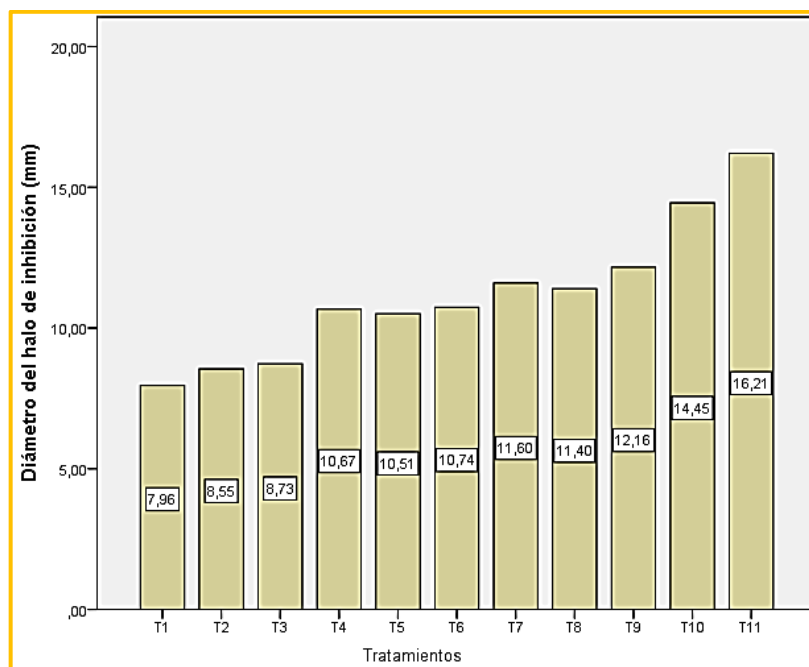
- **Formular la hipótesis:**
  - $H_0$  : El promedio entre los tratamientos son iguales
  - $H_1$  : El promedio entre los tratamientos son diferentes
- **Nivel de significancia:**  $\alpha = 5 \% = 0,05$
- **Estadístico de prueba:**  $F_c = 49,53$  ;  $p=0,0000$
- **Decisión:**  $p= 0,000 < \alpha = 5 \% = 0,05$ , entonces se acepta  $H_1$
- **Conclusión:** se concluye que existe diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, puesto que  $\alpha = 0,05$  es mayor que la significación 0,000 por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95 %, sin embargo, entre los bloques no existe diferencias estadísticas, es decir que fueron homogéneos, el coeficiente de variabilidad indica que hubo precisión en el experimento y que por lo tanto, los datos son confiables.

**CUADRO 03:** Prueba de significación de Tukey al 95 % de confianza, para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.*

Orden de mérito	Tratamientos	Promedio del diámetro de halos de inhibición (mm)	Significancia $\alpha$ 0,05
1	T <sub>11</sub> :	16,21	a
2	T <sub>10</sub> :	14,45	b
3	T <sub>9</sub> :	12,16	c
4	T <sub>7</sub> :	11,66	c
5	T <sub>8</sub> :	11,40	c
6	T <sub>6</sub> :	10,74	c
7	T <sub>4</sub> :	10,51	c
8	T <sub>5</sub> :	10,67	c
9	T <sub>3</sub> :	8,73	d
10	T <sub>2</sub> :	8,55	d
11	T <sub>1</sub> :	7,96	d

**Fuente:** Elaboración propia diseñado en Statgraphics

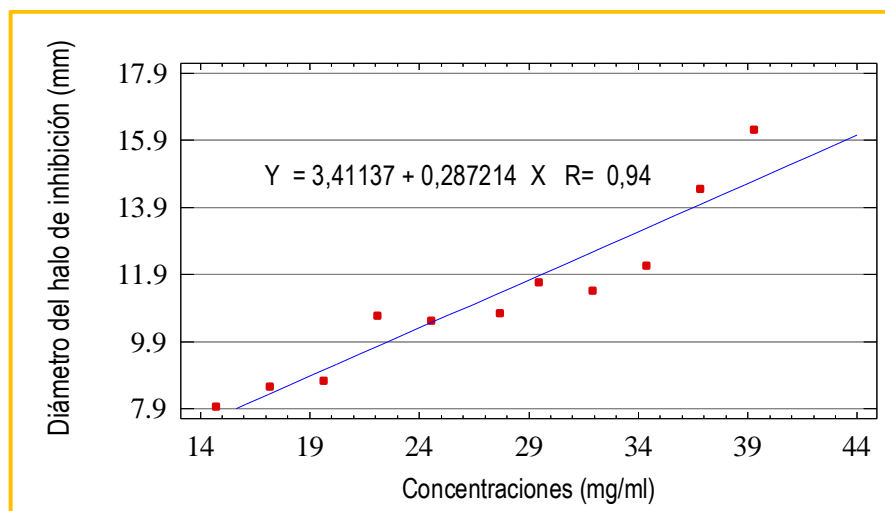
La prueba de significación de Tukey registra los promedios donde se puede apreciar que el tratamiento T<sub>11</sub> logró el mayor promedio con 16,21 mm superando estadísticamente al resto en el segundo lugar se ubicó el T<sub>10</sub> con 14,45 mm, además, se puede observar que existen 2 grupos de tratamientos que estadísticamente son similares en sus promedios, donde el grupo de tratamientos T<sub>3</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> obtuvieron el menor promedio con 8,73, 8,55 y 7,96 mm respectivamente.



**Fuente:** Elaboración propia diseñado en Statgraphics.

**GRÁFICO 01:** Promedio de cada uno de los halos de inhibición y los tratamientos del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* en estudio frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.*

En el Gráfico 01 se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtuvo el tratamiento T<sub>11</sub> que alcanzó el mayor promedio de 16,21 mm. El promedio más bajo corresponde al tratamiento T<sub>1</sub> con diámetro promedio de 7,96 mm.



**Fuente:** Elaboración propia diseñado en Statgraphic.

**GRÁFICO 02:** Análisis de correlación y regresión lineal entre el diámetro de los halos de inhibición y la concentración de aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi ATCC 6539*.

El gráfico 02 muestra que la ecuación de regresión es de  $Y = 3,41137 + 0,287214 X$  indicando que por cada unidad en **mg/ml** de aceite esencial el crecimiento del halo se incrementó en 0,287214 mm; asimismo, se observó que existe una correlación altamente significativa entre las variables en estudio ( $R=0,94$ ).

**CUADRO 04:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.*

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	23,3412	+
T2	26,3154	+
T3	29,2895	+
T4	32,2636	+
T5	35,2378	+
T6	38,2119	+
T7	41,1860	+
T8	44,1601	-
T9	47,1343	-
T10	50,1084	-
TP	Control positivo	+
TN	Control negativo	-

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro 04 muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*, donde se observa que a partir del tubo 8 se inhibe el crecimiento bacteriano. Por tanto, la CMI para *Salmonella typhi ATCC 6539* fue de 44,1601 mg/ml.

**CUADRO 05:** Concentración mínima bactericida (CMB) producido por el aceite esencial *Pimpinella anisum L.* (anís) frente a *Salmonella typhi ATCC 6539.*

N° Tubos	N° Placas	Conc. mg/ml	UFC/placa	Observaciones
8	1	44,1601	9	
9	2	47,1343	4	
10	3	50,1084	0	<b>CMB</b>

**Fuente:** Elaboración propia

El Cuadro 05 muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basados a partir de los resultados obtenidos del Cuadro 04; tomando los tres tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 10 a concentración de 50,1084 mg/ml se ubica el CMB ya que se registra un crecimiento de  $\leq 1$  UFC/placa.

## V. DISCUSIÓN

La naturaleza es y seguirá siendo la fuente de una amplia variedad de moléculas bioactivas que podrían ser utilizadas como base para el diseño y la formulación de nuevas generaciones de medicamentos con el fin de solucionar diversos problemas de salud. El objetivo de esta búsqueda debe ser el descubrimiento de nuevos componentes con actividad antimicrobiana a partir de fuentes naturales con mayor espectro, menos efectos adversos y menor costo que compuestos existentes.

Los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus cualidades (Taboas, 2005).

Con la misma rapidez con la que se introducen nuevos antibióticos, los microorganismos desarrollan resistencias a éstos. Esta resistencia puede estar codificada en plásmidos transferibles e intercambiarse entre especies, géneros e incluso familias de bacterias (Murray et al., 2007).

En el Perú, las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de medicamentos, ya que han contribuido enormemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos, que constituyen la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad en la mayoría de países.

Dentro de las prioridades en investigación en salud en el Perú está el encontrar alternativas que promuevan o faciliten el acceso a la salud para todos en la Costa, Sierra y Selva del Perú (Alvarado, 1989).

Durante los últimos años, la medicina tradicional ha cobrado gran impulso y crédito creciente en todo el mundo. No obstante, una de las conclusiones más notables y reiteradas de las reuniones nacionales e internacionales celebradas sobre este tema es que existen factores que siguen entorpeciendo su equipación con la medicina moderna.

El reconocimiento de los valores teóricos y prácticos de la medicina tradicional es lento.

Es bien conocida la transmisión al hombre de bacterias patógenas a través del consumo de los alimentos con bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*, siendo, por esto, reconocidos como microorganismos de vital importancia para la salud pública. Este grupo de bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimentarias.

La actividad antibacteriana de algunos extractos y productos naturales han revelado un potencial superior a los fármacos sintéticos ya conocidos, en relación a su efecto sobre enfermedades causadas por microorganismos patógenos.

Un motivo más para el desarrollo del presente trabajo de investigación toda vez que al anís, entre muchas propiedades se le atribuye un potencial efecto o actividad antimicrobiana, por ello se determinó su actividad antibacteriana *in vitro* frente a ***Salmonella typhi* ATCC 6539**.

El microorganismo evaluado fue seleccionado por ser una bacteria patógena representativa en la práctica médica. Las pruebas de sensibilidad

proporcionaron datos sobre el efecto del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís) frente al patógeno.

Según bibliografía consultada, existen estudios en especies vegetales de la familia *Apiaceae*, especies parecidas, de las cuales se podría mencionar al *Cuminum cyminum L.* “comino”, según Ars Pharmaceutica (2003) en el trabajo “Actividad Antimicrobiana de *Cuminum cyminum L.* y *Pimpinella anisum L.*” muestran que estas plantas presentan actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos patógenos. Sin bien no hay muchas referencias de estudios realizados con aceites esencial de *Pimpinella anisum L.* “anís” que demuestren su actividad antimicrobiana, este trabajo reporta actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie vegetal en estudio, resultado que respalda la presente investigación. Otra de las especies de la familia *Apiaceae* es *Coriandrum sativum* “cilantro”, el cual según Delaquis et al. (2002), examinó su actividad antibacteriana contra algunas bacterias de la putrefacción de alimentos Gram-positivas y Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*). El efecto inhibitorio de *Coriandrum sativum* en bacterias de descomposición potenciales, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*,

*Escherichia coli*, *Escherichia cloaca*, *Enterococcus faecalis*, se ha confirmado (Keskin & Toroglu, 2011).

En el trabajo titulado “Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultural” (Facultad de Ciencias Naturales, UNLP – La Habana, Cuba). Se menciona el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. “anís”, el cual muestra una actividad positiva y relevante frente a los siguientes hongos analizados: *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.; de igual forma lo reportado por Alpsoy (2010). Frente a las especies de *Bacillus* muestra un resultado negativo y solamente mostró una actividad moderada para el caso de *Enterobacter agglomerans* y *Streptomyces* sp. (Gómez et al., 2012).

De acuerdo a Tajkarimi et al. (2010), se han encontrado alrededor de 1 340 plantas a las que se le han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se han identificado alrededor de 30 000 componentes activos.

La composición de los aceites esenciales varía de acuerdo a las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004), y puesto

que sus compuestos volátiles son los que presentan el efecto antimicrobiano, la determinación de su composición es importante; para ello, diversos investigadores emplean la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) (Gómez - Sánchez et al., 2011). Para el análisis fisicoquímico del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís”, se utilizó la técnica de Cromatografía gaseosa con detección de masas, se observó en forma cualitativa y cuantitativa la presencia de los siguientes compuestos: 3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl- (11,72 %), 1,6-Octadien-3-Ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino (8,94 %), D-Limonene (19,58 %), 1,4-Butanediol, diacetate (9,04 %), Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl- (7,47 %), Trans anetol (31,15 %), Nonane, 5-methyl-5-propyl- (6,22 %), 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobuty (5,88 %). Por lo tanto, la acción antibacteriana demostrada por el aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís” se basaría en estos compuestos bioactivos, los cuales tienen propiedades antimicrobianas.

Brown (1998), indica que el *trans anetol* (80–90 %) es el componente principal del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*, con algunos derivados del anetol y pequeñas cantidades de sesquiterpenos; datos que no fueron tan semejantes a los obtenidos en el análisis fisicoquímico realizado al aceite esencial del “anís”, el cual muestra al *trans anetol* como el

compuesto en mayor proporción con un 31,15 %. Esta diferencia puede deberse a muchos factores que influyen en la composición del aceite, entre ellos, los más importantes serían el origen y el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, tierra de cultivo, etc.), así como la destilación y la forma de almacenamiento del aceite. Se ha descrito incluso un cierto efecto de la madurez de la planta en el momento de producir el aceite (Svoboda, 1999).

En el trabajo de Pino et al. (2012), "Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*", se nombra como componente mayoritario al *metil chavicol*, nuestros resultados difieren de los encontrados en este trabajo, el cual muestra como componente mayoritario al *trans anetol*, lo cual puede deberse a que el aceite se obtuvo de las semillas de la planta y no de los de las hojas como sucedió en el otro estudio.

Muchos métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas fastidiosas. Para el presente trabajo se incluyó un

método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia (NCCLS, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pusieron de manifiesto la actividad antibacteriana presentada por el aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.***, frente a ***Salmonella typhi* ATCC 6539**.

Para la técnica se empleó el inóculo estandarizado de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, que asegura un mejor desarrollo de las colonias de las especies.

En la primera prueba para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** frente a ***Salmonella typhi* ATCC 6539**, se trabajó a concentraciones que inician de 14,7315 mg/ml hasta 39,2840 mg/ml, cabe mencionar que paralelamente se contrastó con un control; transcurrido el periodo de incubación de 37 °C por 24 h se procedió hacer las lecturas de las placas, verificándose la formación de halos de inhibición del crecimiento en ***Salmonella typhi* ATCC 6539**, con lo que se pudo determinar que la bacteria presentó un grado de sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz (>11 mm) frente al aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** Posteriormente, se identificó el CMI y CMB. Partiendo de la dilución madre, con

concentraciones de 70,0237 mg/ml hasta 150,3251 mg/ml (Duraffourd, 1983).

En el Cuadro 01, se puede apreciar la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial *Pimpinella anisum L.* frente a *Salmonella typhi ATCC 6539*, por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). La sensibilidad de la cepa empieza en el T7 (29,4630 mg/ml) con un halo promedio de inhibición de 11,66 mm, alcanzando diámetros promedio de 16,21 mm en el T11 (39,2840 mg/ml) lo que indica que a mayor concentración mayor será el diámetro del halo de inhibición. En la presente investigación se observa, en todos los casos, que el efecto antibacteriano de tipo cuantitativa o cualitativa del aceite esencial *Pimpinella anisum L.* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial en los discos, esto coincide con el trabajo de Quiñones (2012), el cual estudió la actividad antimicrobiana de *Pimpinella anisum L.* frente a cepas de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. En cuanto a los halos de inhibición, en el trabajo de Quiñones, presenta mayor halo la bacteria *Escherichia coli* (10 a 20 mm) y en menor valor *Salmonella typhi* (0 a 5 mm), valor que difiere en el presente trabajo, en el cual se pudo observar un halo de hasta 16,21 mm.

En el trabajo de Rojas et al. (2014), "Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*", se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de "anís", frente a la bacteria *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum*, en el caso de esta bacteria se evidenció su actividad antibacteriana con la formación de un halo de inhibición de 8 mm.

Según Pino et al. (2012), al aplicar el aceite esencial de anís frente a *X. campestris*, uso cantidades de 10 y 5 µL de aceite esencial produciendo una inhibición total del crecimiento de la bacteria, mientras que al añadir 2,5 µL mostró una actividad moderada.

Con estos trabajos se puede evidenciar la actividad antibacteriana que presenta *Pimpinella anisum* L. antes diferentes microorganismos, y evidenciar los diversos halos de inhibición que forma según el germen al que se enfrente.

Dentro de la familia *Apiaceae*, se encuentra a *Pimpinella anisum* L. y a *Coriandrum sativum*, el cual exhibió un efecto antibacteriano contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi*, frente a los que muestra diámetro de la zona de inhibición de 25, 10 y 18 mm, respectivamente (Teshale et al., 2013); en el presente caso el aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. frente a ***Salmonella typhi* ATCC 6539**, mostró un halo de inhibición 16,21 mm, un poco menor al que se formó con el aceite esencial de *Coriandrum*

*sativum*. Esto puede deberse a la composición entre un aceite esencial y el otro, los cuales a pesar de ser procedentes de plantas de una misma familia presentan compuestos y actividad antibacteriana distinta.

Según la escala de Duraffourd y Lapraz se puede determinar el grado de sensibilidad para ***Salmonella typhi* ATCC 6539** en función al halo de inhibición de crecimiento del microorganismo (HICM). Según la escala, se considera que la actividad de los aceites esenciales es como sigue: a) sumamente sensible, cuando presenta un diámetro mayor o igual a 11,0 mm y b) resistente, cuando presenta un diámetro menor a 11,0 mm. En este contexto, se puede hipotetizar que la actividad antibacteriana observada en este trabajo podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos (Bruneton, 2001), considerando los diferentes grupos de compuestos químicos presentes en el aceite esencial, es importante decir que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico; sin embargo, Friedman et al. (2002), menciona algunos sitios de acción en la célula en donde podrían ocurrir los siguientes efectos: daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular y coagulación del citoplasma.

La resistencia de las bacterias Gram negativas (*Salmonella typhi*) a aceites esenciales han sido documentadas anteriormente y se ha concluido que esta resistencia se debe a las diferencias estructurales en la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que en estas últimas la membrana celular actúa como una barrera para muchas sustancias medioambientales y antibióticos según Murray et al. (2007) y Koneman et al. (2008).

Hay estudios que demuestran los efectos antimicrobianos que ejercen los compuestos aromáticos sobre la membrana citoplasmática, alterando su estructura y por consiguiente su función (Dorman y Deans, 2000).

En el trabajo desarrollado, se observó una notable sensibilidad de la cepa, cuyo crecimiento fue inhibido por el aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** Su principal compuesto activo, el cual se encuentra presente en mayor cantidad es el *trans anetol*, el cual se cree se introduce a través de los lípidos de la membrana celular, alterando la estructura y haciéndola más permeable. Como consecuencia tiene lugar a una fuga de iones y otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que lleva a la muerte celular del microorganismo finalmente (Zekaria, 2006).

Los datos fueron procesados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 %, que permitió establecer mínimas diferencias entre los tratamientos.

Los datos obtenidos de los tratamientos aplicados al patógeno se procesaron mediante el Software Estadístico Statgraphics.

Al efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para el promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos sobre ***Salmonella typhi* ATCC 6539** (Cuadro 02), se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Más no existe diferencia estadística a nivel de halos, para ***Salmonella typhi* ATCC 6539**; con un coeficiente de variabilidad 6,29 % siendo aceptable como un máximo de 15 % para condiciones de laboratorio. El Gráfico 02 muestra que la ecuación de regresión lineal es de  $Y = 3,41137 + 0,287214$  indicando que por cada unidad en mg/ml de aceite esencial el crecimiento del halo se incrementó en 0,287214 mm; asimismo, se observó que existe una correlación altamente significativa entre las variables en estudio ( $R=0,94$ ). Al realizar la prueba de significación de Tukey (Cuadro 03 y Gráfico 01), se confirma que el T11 (39,2840 mg/ml) tuvo mayor actividad antibacteriana y de mayor significancia para ***Salmonella typhi* ATCC 6539** con un halo de inhibición de 16,21 mm. Esta prueba confirma que esta concentración es la de mayor acción antibacteriana y por lo tanto, la que contiene cantidades apreciables de

principios activos de ***Pimpinella anisum L.***

En las pruebas de sensibilidad se trabajó con el dimetilsulfóxido 10 % (DMSO) como diluyente del aceite en estudio debido a su gran viscosidad, lo cual podría reducir la capacidad de la dilución o podría causar distribución desigual del aceite a través del medio. Este disolvente aprótico de baja toxicidad es recomendado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) por no presentar ninguna actividad antibacteriana, no interfiriendo en los resultados (Huamaní y col, 2005).

En el presente estudio no se observó en ninguna de las pruebas (controles) efecto de este solvente sobre ***Salmonella typhi ATCC 6539***, por lo que los resultados obtenidos sólo serían atribuibles al aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís”.

Según el Cuadro 04, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para ***Salmonella typhi ATCC 6539*** se observó en el tratamiento 8 del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** con una concentración de 44,1601 mg/ml, esto debido a la ausencia de la turbidez. Finalmente, según el Cuadro 05, la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se ubicó en el tratamiento 10 con una concentración de 50,1084 mg/ml, donde se apreció la *inhibición absoluta* del crecimiento bacteriano.

En el estudio realizado, en cuanto a la determinación de CMI se observó, en todos los tratamientos, que la efectividad antimicrobiana de tipo cuantitativa o cualitativa de *Pimpinella anisum L.* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial en la dilución, esto coincide con el trabajo de Pino et al. (2012), los cuales estudiaron la actividad antimicrobiana de *Pimpinella anisum L.* frente a bacterias fitopatógenas hallando una relación directamente proporcional entre la concentración y el grado de la inhibición.

En el presente trabajo de investigación se demostró las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*, donde los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la actividad exhibida por el aceite esencial frente a *Salmonella typhi ATCC 6539*.

En la literatura se encontró escasa información sobre la actividad antibacteriana del aceite de anís frente a la bacteria patógena *Salmonella typhi*, por lo cual los resultados obtenidos aumentan el conocimiento sobre la actividad biológica de *P. anisum L.* y las posibilidades de aplicación práctica de su aceite esencial.

Existen diferentes principios activos, muchos de ellos actúan sinérgicamente por lo que su actividad terapéutica no depende solamente

de uno, sino de la proporcionalidad de los mismos como se mencionó anteriormente; y el aceite esencial del “anís” no está exento de esta verdad y se constituye en una alternativa terapéutica buena; sin embargo, aún se requieren estudios más específicos para su utilización con fines terapéuticos.

En general, los resultados sugieren la realización de mayores estudios *in vitro* e *in vivo* considerando las diferentes especies, para determinar susceptibilidades de cada una de ellas, ampliando otros métodos de extracción, utilizando diferentes partes del vegetal o, en su defecto, realizar un estudio fitoquímico empleando otras especies botánicas en especial con las autóctonas registradas en nuestra región.

Asimismo, en la actualidad es común el empleo de plantas, ya que ofrecen una variedad de principios activos con la finalidad de obtener variados efectos medicamentosos. Entre las variables aplicaciones de los vegetales, se incluyen aquellos con fines antibacterianos. Además, el uso de antibióticos por pacientes afectados, que no cuentan con recursos, para cubrir sus necesidades de salud y tratamiento con fármacos convencionales caros, poco disponibles y algunos con efectos secundarios, hacen revalorizar los productos naturales como fuente de sustancias de interés médico.

Entonces, es necesario dar una aplicación científica que justifique el uso tradicional en el Perú de las plantas medicinales; el conocimiento de su composición química y las propiedades terapéuticas que manifiesten, lo cual permitirá una mayor confiabilidad de sus usos.

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que la bacteria ***Salmonella typhi*** ATCC 6539 es sensible al aceite esencial obtenido de las semillas de ***Pimpinella anisum L.*** “anís”.
- El aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** “anís” frente a ***Salmonella typhi*** ATCC 6539, generó halos de inhibición con medidas entre los **7,96 y 16,21 mm**, se determinó la sensibilidad de ***Salmonella typhi*** ATCC 6539, según la escala de Duraffourd y Lapraz ( $\geq 11$  mm), lo cual se evidenció a partir del tratamiento 7 (T7). Siendo la concentración de **39,2840 mg/ml** la que generó el halo de mayor tamaño.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** frente a ***Salmonella typhi*** ATCC 6539 fue de **44,1601 mg/ml**.
- La Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial ***Pimpinella anisum L.*** “anís” frente a ***Salmonella typhi*** ATCC 6539 fue de **50,1084 mg/ml**.

## VII. RECOMENDACIONES

- Analizar la actividad antibacteriana del aceite esencial de ***Pimpinella anisum L.*** (anís) frente a otras bacterias de importancia clínica, de tal modo que pueda convertirse en una alternativa natural.
- Realizar pruebas *in vivo* para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de ***Pimpinella anisum L.*** como también poder determinar sus dosis terapéuticas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AKHTAR, A.; DESHMUKH, A. A.; BHONSLE, A. V.; KSHIRSAGAR, P. M.; KOLEKAR M. A.** (2008). “*In vitro* antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic”. Veterinary World.
2. **ALVARADO, CH.** (1989). “Plantas medicinales del Perú”. Editorial - Concytec. Lima – Perú.
3. **ARA ROLDÁN, ALFREDO** (1994). “Las 40 Plantas Medicinales Más Populares: una guía práctica y completa de sus virtudes terapéuticas y recetario”. Editorial EDAF, 224 págs.
4. **ARAUJO, J.; DÍAZ R. & SALAS, A.** (2008). Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. Rev. Científica del Sur. Fondo Editorial de la UCS.
5. **Ars Pharmaceutica** (2003), “Actividad antimicrobiana de *Cuminum cyminum* y *Pimpinella anisum* L.”. Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.
6. **BARH, R. F.** (1988). Plantas medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas. Ediciones Readers Digest. México, D. F., Pág. 63-87.

7. **BROWN G.D.** (1998). "Novel phenylpropanoids and lignans from *Illicium verum*". J Nat Prod; Págs. 987-992.
8. **BRUNETON, J.** (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. Segunda edición. Ed. Acribia.
9. **BURT, S.** (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review". International Journal of Food microbiology. Págs. 223-253.
10. **CANCHARI, G.** (2010). Caracterización Agroclimática de cultivos priorizados y evaluación de impacto sobre el desarrollo fenológico de cultivos y su productividad en Apurímac y Cusco. Informes de Consultoría – SENAMHI - Dirección de Agrometeorología - PACC.
11. **CHAMORRO A. W.; MORALES, E.; SEQUEIRA W. & GUSTAVO, A.** (2006). Identificación de los componentes del aceite esencial. Grupo de Investigación en Química Orgánica y Biológica QUIMOBIO. UT. Facultad Regional Resistencia. French 414. Resistencia, Chaco.
12. **CHÁVEZ, A.** (1997). "La Materia Médica del Incanato". Editorial Mejía Baca Lima. 10 Págs.
13. **CHEMIDPLUS** (2009). United States National Library of Medicine. Disponible en: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMViewFiles&nextPage=j>

sp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3Dlite&chemid=004180238&formatType=\_3D [acceso 30-4-2009]

14. **CHOQUEHUANCA, G. L.** (2004). Tesis “Efecto antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Satureja boliviana* (muña) frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas”. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Escuela Profesional y Académica de Biología.
15. **CICCA – CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN CAMPESINA.** (2015). Cultivando el Anís. Manual técnico. Curahuasi – Apurímac.
16. **CONA, E.** (2002). Condiciones para un buen Estudio de Susceptibilidad Mediante Test de Difusión en Agar. Rev Chil Infec. Vol. 19. págs. 77-81.
17. **CONNER, D.** (1993). Naturally Occurring Compounds. En A. Branen & P. Davison (Eds.). Antimicrobials in foods (2th ed) (págs. 441-468) New York: Marcel Dekker, Inc.
18. **D´Aoust, J. & MAURER, J.** (2007). Food Microbiology, fundamentals and frontiers. Chapter 10. Third Edition. ASM Press. Págs. 187-236.
19. **DELAQUIS, R.; STANICH, K.; GIRARD, B. & MASSA, G.** (2002). “La actividad antimicrobiana de las fracciones individuales y mixtas de

- eneldo, cilantro, coriandro y aceites esenciales de eucalipto”. Food Microbiology. Págs. 101-109.
20. **DE PAULA, SILVIA J. & MARTINS DE SIQUEIRA A.** (2000). “Acción antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de *Rubrus urticifolius*”. Rev. Cub. De Plantas Med. Cuba.
21. **DOYLE, M. & MAZZOTTA, A.** (2000). Review of Studies on the Thermal Resistance of Salmonellae. Págs. 779-795.
22. **DORMAN, H.J. & DEANS S.G.** (2000). “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”. Journal of Applied Microbiology. Págs. 308–316.
23. **DURAFFOURD, C. & LAPRAZ, J. C.** (1983). “Propriétés Particulières Des Plantes Dans Leur Indication De Médecine De Terrain.” In “Perspectives En Phytothérapie Clinique.” Editorial Masson. Francia.
24. **ELLERMEIER, C. & SLAUCH, J.** (2006). The genus *Salmonella* in: Prokaryotes. Págs. 123-158.
25. **FESTER, G. A.; MARTINUZZI, E. A.; RETAMAR, J. A. & RICCIARDI, A. I.** (1961). “Aceites esenciales de la República Argentina”, academia nacional de ciencias, Córdoba, Argentina.
26. **FONNEGRA GÓMEZ, RAMIRO & JIMÉNEZ RAMÍREZ, SILVIA LUZ** (2007). “Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia”. Universidad de Antioquia, 368 págs.

27. **FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E.** (2002). "Bactericidal activities of plant essential oil and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*". Journal of Food Protection. Págs. 1545-1560.
28. **FUNDACIÓN ALFONSO MARTÍN ESCUDERO** (1999). Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Madrid-España.
29. **GRANADOS, R.; VILLAVERDE, C.** (1996). "Bacteriología, Características y clasificación bacteriana y virología. Características y técnicas bioquímicas". Editorial Paraninfo Magallanes, Madrid.
30. **GREEN, ALIZA** (2007). "El Libro de las Especies: hierbas aromáticas y especias". Ediciones Robinbook, 368 págs.
31. **GÓMEZ – SANCHEZ, A.; PALOU, E.; LOPEZ – MALO, A.** (2011). "Antifungal Activity Evaluation of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) Essential Oil on the Growth of *Aspergillus flavus* by Gaseous Contact". Journal of Food Protection. Págs. 2192-2198.
32. **GÓMEZ DE SARAVIA, SANDRA; BORREGO, SOFÍA; LAVIN, PAOLA; VALDÉS, ODERLAISE et al.** (2012). "Productos Ambientalmente Amigables de Origen Vegetal Empleados en el Control de Microorganismos Intervinientes en el Biodeterioro del Patrimonio

Cultural” Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales, UNLP. La Habana, Cuba.

33. **HAMMER, K. A.; CARSON, J. F.; RILEY, T. V.** (1999). “Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts”. *J. Appl Microbiol.*86:985-990.
34. **HELMS, M.; VASTRUP, P.; GERNER-SCHMIDT, P. y MOLBAK K.** (2003). Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. Págs. 326, 357-361.
35. **HERNÁNDEZ, L.** (2003). “Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. Innocua*”.
36. **HOSS, REINHART** (2000). “Recursos Botánicos Con Potencial Biocida”. Revista Públcada por la red de Acción en Alternativa al uso de Agroquímicos (RAAA). Perú.
37. **HUAMANÍ ACHATA, MARÍA E. y COL.** (2005) “Determinación de la Actividad Antifúngica contra *Cándida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima-Perú.

38. **HUMPHREY, T.** (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. Nature Reviews. Págs. 504-509.
39. **INFA - INSTITUTO DE FITOTERAPIA AMERICANO** (2000). Resumen del 1er congreso internacional de plantas medicinales y fitoterapia. Lima – Perú.
40. **JAY, J.; LOESSNER, M. y GOLDEN, A.** (2005). Food Modern Microbiology. Seventh Edition. Springer Science. USA. Págs. 619-639.
41. **KALEMBA, D. & KUNICKA, A.** (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10, págs. 813-829.
42. **KESKIN, D. & TOROGLU, S.** (2011). “Los estudios sobre las actividades antimicrobianas de extractos en disolventes de diferentes especias”. Págs. 251-256.
43. **KONEMAN, ELMER; STEPHEN, D.; ALLEN, V.; DOWELL, WILLIAM; JANDA, HERBERT; SOMMERS, WASHINTON** (2008). Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color. 6ta edición. Editorial Médica Panamericana Argentina.
44. **KUKLINSKI, CLAUDIA** (2003), Farmacognosia “Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural”-Ediciones Omega.
45. **LAKE, R.; HUDSON, A. y CRESSEY, P.** (2002). Risk profile: *Salmonella* (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces). Págs. 63.

46. **LECOMPTE, J.; COLLIGNAN, A.; SARTER, S. y CARDINALE, E.** (2009). Decontamination of chicken skin surfaces inoculated with *Listeria innocua*, *Samonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* by contact with a concentrated lactic acid solution. *British Poultry Science*. Págs. 307-317.
47. **LIMA, S.** (2005). “Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial”. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Guatemala.
48. **LOCK DE UGAZ, O.** (1994). Investigación Fotoquímica. “Métodos en el Estudio de Productos Naturales”. Segunda edición de la PUCP. Lima-Perú.
49. **MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M.; PARKER, JACK** (2004). “Brock, Biología de los Microorganismos”. 10ma edición. Editorial Prentice Hall, 1011 págs.
50. **MARTÍNEZ, ALEJANDRO** (2003). “Aceites Esenciales”. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.
51. **MENDIOLA UBILLOS, MARÍA ÁNGELES** (2009). “Plantas Aromáticas Gastronómicas”. Editorial Mundi-Prensa Libros, 191 págs.

52. **MMRW** (2002). Multistate Outbreaks of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from Mexico, United States and Canada. Págs. 1044-1047.
53. **MUJICA PONS, XAVIER** (2012). "HIERBAS QUE CURAN. Recetas naturales y efectivas, catálogo de hierbas medicinales y curas para cada enfermedad". Ediciones LEA. Buenos Aires, Argentina.
54. **MURRAY, PATRICK R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFAÜER, MICHAEL A.** (2007). "Microbiología Médica". 5ta edición. Editorial Elsevier. Madrid-España.
55. **MURRAY R., SPIEGEL L.; LARRY J., STEPHENS** (2002). "Estadística". Tercera edición en español por McGrall – Hill Interamericana. Editores, S.A. México.
56. **NCCLS - NATIONAL COMITÉ FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS** (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard.
57. **NOORIZADEH, H.; FARMANY, A.; NOORIZADEH, M.** (2011). "Application of GA-PLS and GA-KPLS calculations for the prediction of the retention indices of essential oils". Quim Nova.34 (8):1398-1404.

58. **NYCHAS, J.** (1995). Natural antimicrobials from plants. En: Gould G W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation* págs. 59-89. London: Chapman & Hall.
59. **OMS – ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD** (1979). *Plantas medicinales: un modelo de curación, clasificación popular correlativa de plantas y enfermedades en una comunidad rural andino-venezolano. Informes técnicos. Vol. II N° 6.*
60. **ORAV, A.; RAAL, A. y ARAK, E.** (2008). Essential oil composition of *Pimpinella anisum L.* fruits from various European countries. *Natural Products Research*. Págs. 227-232.
61. **OSCAR, T. P.** (2009). Predictive model for survival and growth of *Salmonella typhimurium* DT104 on chicken skin during temperature abuse. Págs. 304-314.
62. **PINO, O.; SÁNCHEZ, Y.; ROJAS, M.; ABREU Y.; et al.** (2012). “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.*” La Habana – Cuba.
63. **POLETTI, O.** (1979). “Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II, Vol. 1: Acanthaceae – Euphorbiaceae (Dicotyledoneae); Vol. 2: Fabaceae – Zygophyllaceae (Dicotyledoneae)”, *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, Vol. 74, Buenos Aires.

64. **QUIÑONES GUTIÉRREZ, Y.** (2012). “Análisis de los principios activos de especies mexicanas de anís y evaluación de su actividad biológica sobre microorganismos patógenos”. Universidad Autónoma de Nuevo León – México. Tesis Doctoral.
65. **RFE - REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA** (2005). Ministerio de Sanidad y Consumo. 3era Ed. Págs. 845-852.
66. **RIVAS GARCÍA, HERIBERTO** (1991). “Plantas Curativas Mexicanas: descripción y usos”. Panorama Editorial, 263 págs.
67. **RODRÍGUEZ DIAZ, M.** (2000). “Riquezas Florísticas del Distrito de Chiguata-Arequipa”. Tesis UNAS.
68. **ROMERO CABELLO, RAÚL** (2007). “Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias”. Editorial Panamericana, 999 págs.
69. **ROJAS, M.; CORZO, M.; SÁNCHEZ, Y.; BRITO, D.; MONTES DE OCA, R.; et al.** (2014). “Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*”. Instituto de Investigaciones Hortícolas. Mayabeque – Cuba.
70. **SINGH, G.; KAPOOR, I.; PANDEY, S.K.; et al.** (2002). “Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices”. *Phytother Res.* 16 (7):680-682.

71. **SVOBODA, K. & HAMPSON, J.** (1999). Bioactivity of Essentials oil of selected temperate aromatic plants. Plant biology departamentet SAC, Auchincruive, Aur, Scotland, Uk.
72. **TABOAS GUIMERANS, SUSI** (2005). "Fitoterapia". Capítulo 62.
73. **TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D.** (2010). "Antimicrobial herb and spice compounds in food". Food Control. Págs. 1199-1218.
74. **TESHALE, C.; HUSSIEN, J.; JEMAL, A.** (2013). "La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales aromáticos seleccionados de Etiopía". Págs. 175-180.
75. **THOMAS, L. & WIMPENNY, J.** (1996). Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature. International Journal of Food Microbiology. Págs. 361-370.
76. **VAN GINKEL, A.** (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB. "Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas Medicinales. Tecnología y Producción."
77. **WILLS, A. M.; RICCIARDI, G.; AGRELO DE NASSIFF, A. E. y TORRES, A. M.** (2000). "Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica". CYTED, editorial de la Universidad de La Plata.

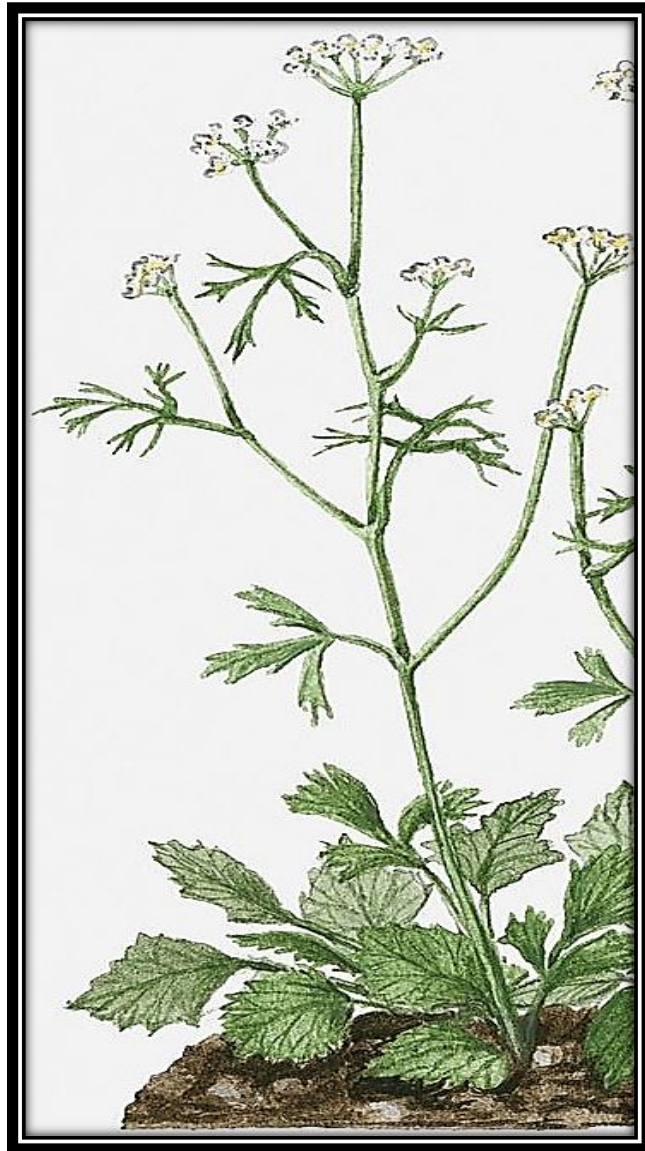
78. **YOUSEF, AHMED E. & CARLSTROM, CAROLYN** (2006).

“Microbiología De Los Alimentos Manual Del Laboratorio”. Editorial Acribia, 303 págs.

79. **ZEKARIA, D.** (2006). “Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos”. Laboratorios Calier.

## ANEXOS

ILUSTRACIÓN 01 y 02: *Pimpinella anisum* L. “anís” (planta completa).





**FOTO 01, 02 y 03:** Hojas de *Pimpinella anisum* L. “anís”, la primera pertenece a la base de la planta, la siguiente de la parte central y la última de la parte superior.





**FOTO 04 y 05:** Flores de *Pimpinella anisum L.* “anís”.



**FOTO 06:** Flores y frutos de *Pimpinella anisum* L. “anís”.



**FOTO 07:** Fruto de *Pimpinella anisum* L. “anís”.



**FOTO 08:** Semillas de *Pimpinella anisum L.* “anís”.



**FOTO 09, 10 y 11:** Extracción del aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* “anís” por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.

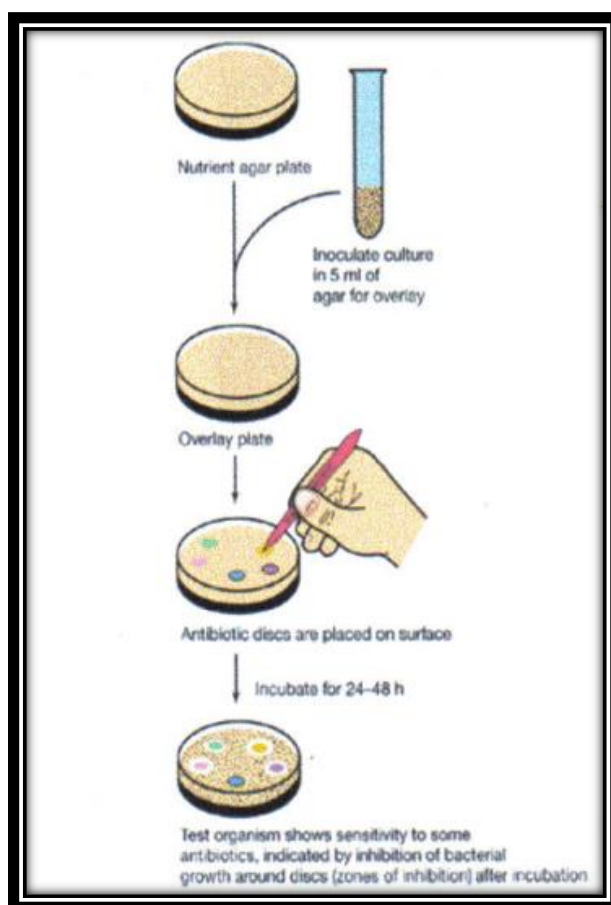




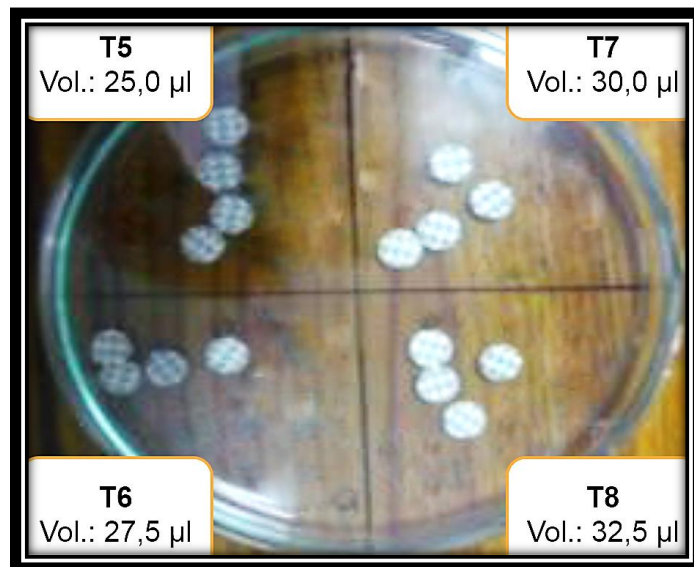
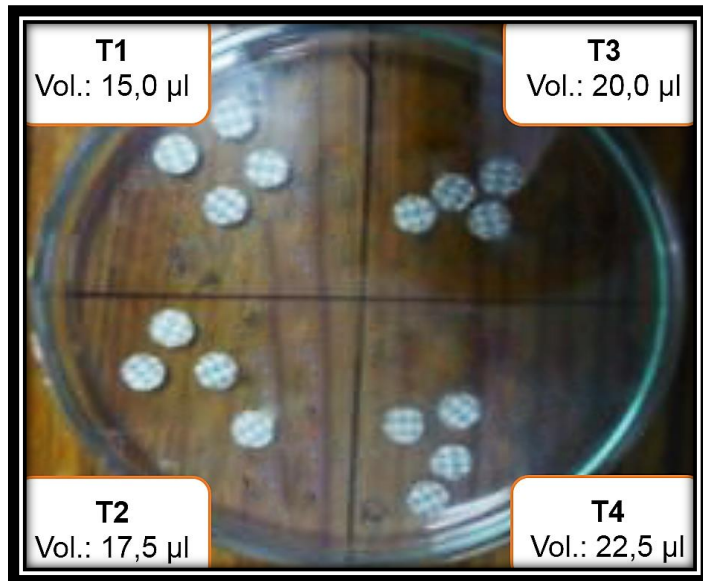
**FOTO 12:** Ceba bacteriana en estudio (*Salmonella typhi* ATCC 6539) proporcionada por el MINSA-TACNA.



**ESQUEMA 01:** Técnica Kirby Bauer.



**FOTO 13, 14, 15, 16 y 17:** Preparación de discos de sensibilidad en medio Müller Hinton.



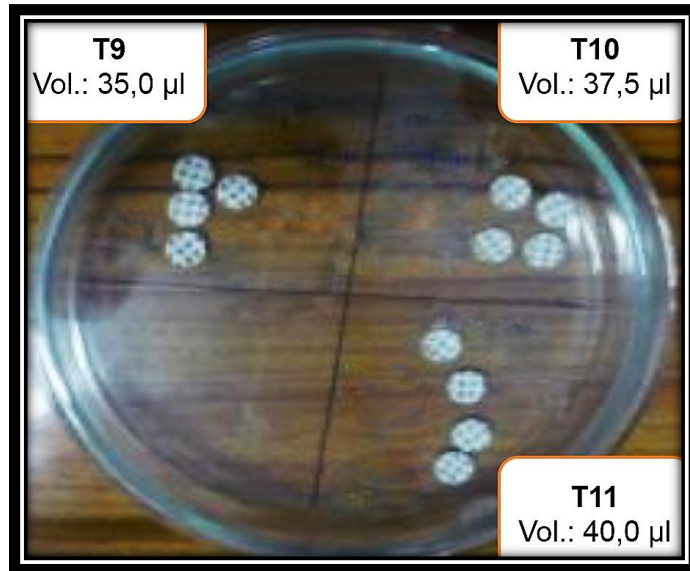
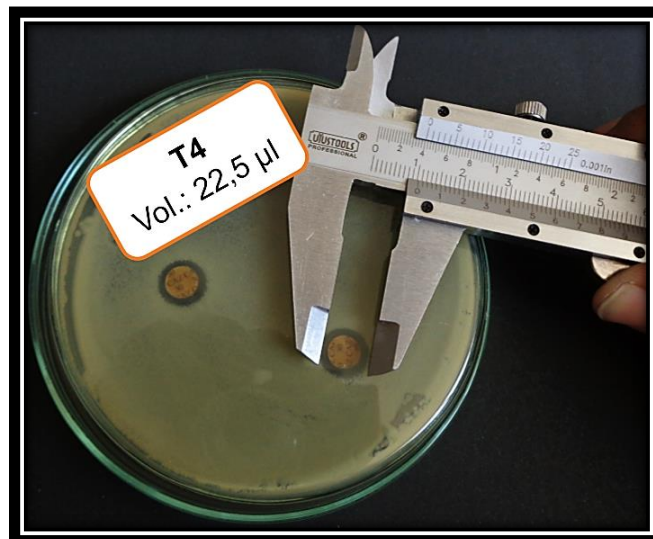




FOTO 18, 19 y 20: Sensibilidad de *Salmonella typhi* ATCC 6539 frente al aceite esencial puro de *Pimpinella anisum* L. “anís” por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).



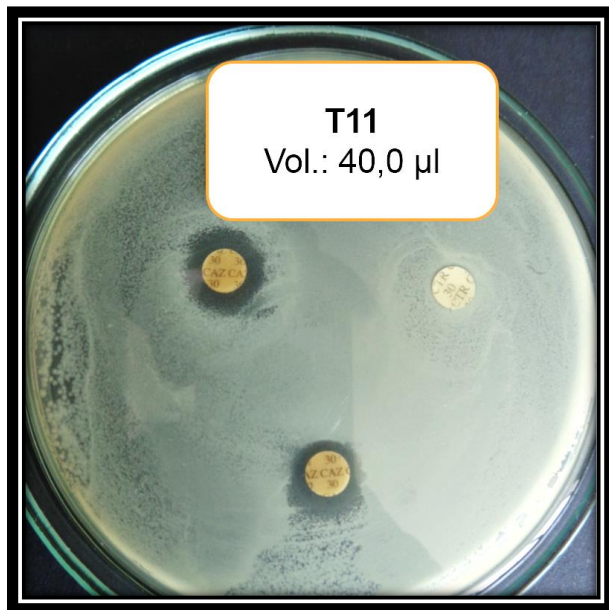
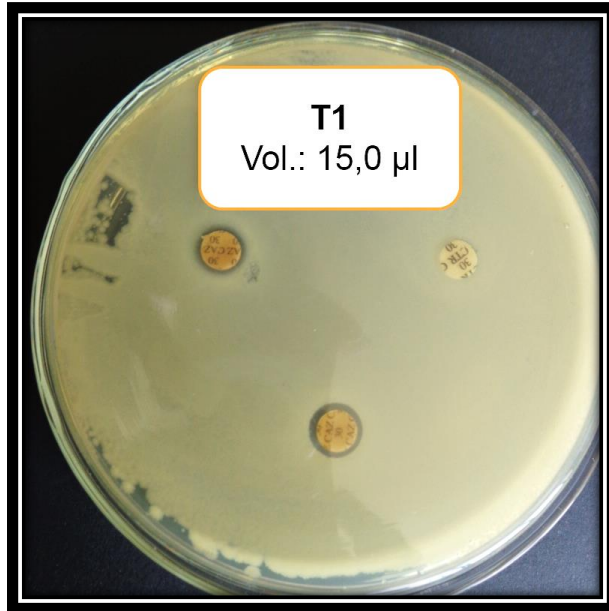
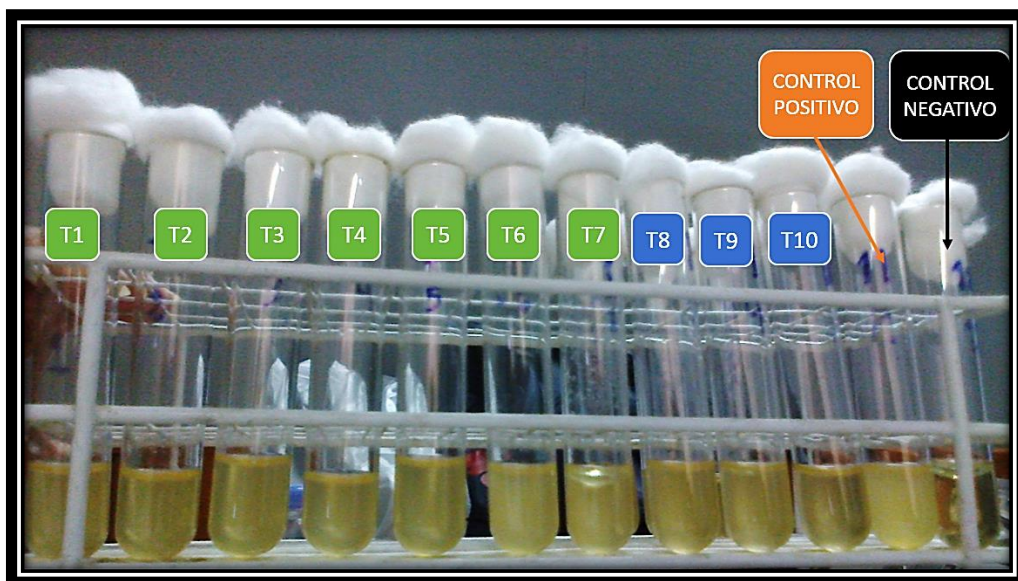
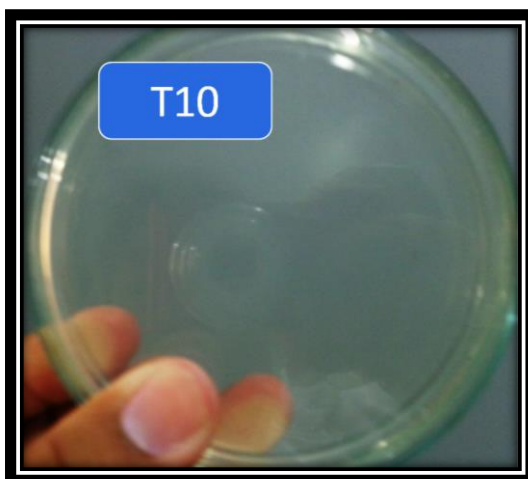


FOTO 21 y 22: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Salmonella typhi* ATCC 6539 frente al aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. "anís".



**FOTO 23:** Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Salmonella typhi* ATCC 6539 frente al aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. “anís”.



**FOTO 24 y 25:** Informe del ensayo Físico - Químico al aceite esencial de *Pimpinella anisum L.* (anís).

**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA11C15.001593**

<b>Nombre del Cliente</b>	: DANITZA YESENIA COTRADO APAZA
<b>Dirección del Cliente</b>	: ASOC. LOS EDILES MZ J LOTE 08 GREGORIO ALBARRACIN – LANCHIPA - TACNA
<b>RUC</b>	: NO CORRESPONDE
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE ANIS
<b>Tamaño de muestra</b>	: 5 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 11/03/2015
<b>Fecha de Ejecución del ensayo</b>	: 11/03/2015
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 17/03/2015
<b>Página</b>	: 1 de 2

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACIÓN NIST)	Name 3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl- 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino D-Limonene 1,4-Butanediol, diacetate Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl-1-(1- Trans anetol Nonane, 5-methyl-5-propyl- 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobuty

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Name</th> <th style="text-align: right;">Area%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl-</td> <td style="text-align: right;">11,72</td> </tr> <tr> <td>1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino</td> <td style="text-align: right;">8,94</td> </tr> <tr> <td>D-Limonene</td> <td style="text-align: right;">19,58</td> </tr> <tr> <td>1,4-Butanediol, diacetate</td> <td style="text-align: right;">9,04</td> </tr> <tr> <td>Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl-1-(1-</td> <td style="text-align: right;">7,47</td> </tr> <tr> <td>Trans anetol</td> <td style="text-align: right;">31,15</td> </tr> <tr> <td>Nonane, 5-methyl-5-propyl-</td> <td style="text-align: right;">6,22</td> </tr> <tr> <td>2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobuty</td> <td style="text-align: right;">5,88</td> </tr> </tbody> </table>	Name	Area%	3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl-	11,72	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino	8,94	D-Limonene	19,58	1,4-Butanediol, diacetate	9,04	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl-1-(1-	7,47	Trans anetol	31,15	Nonane, 5-methyl-5-propyl-	6,22	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobuty	5,88
Name	Area%																		
3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl-	11,72																		
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino	8,94																		
D-Limonene	19,58																		
1,4-Butanediol, diacetate	9,04																		
Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl-1-(1-	7,47																		
Trans anetol	31,15																		
Nonane, 5-methyl-5-propyl-	6,22																		
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobuty	5,88																		





**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**



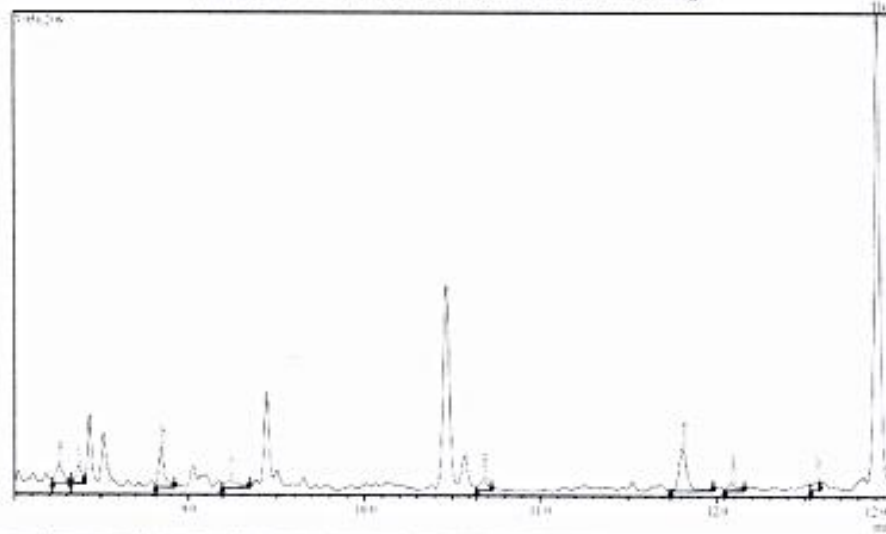
Urb. San José SIN Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 ■ + 51 84 382038 ANEXO 1199  
 laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe ■ http://www.ucsm.edu.pe ■ F. Apdo. 1390  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA11C15.001593**

**Nombre del Cliente** : DANITZA YESENIA COTRADO APAZA  
**Dirección del Cliente** : ASOC. LOS EDILES MZ J LOTE 08 GREGORIO  
 ALBARRACIN – LANCHIPA - TACNA  
**RUC** : NO CORRESPONDE  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : ACEITE ESENCIAL DE ANIS  
**Tamaño de muestra** : 5 mL  
**Fecha de Recepción** : 11/03/2015  
**Fecha de Ejecución del ensayo** : 11/03/2015  
**Fecha de Emisión de Informe** : 17/03/2015  
**Página** : 2 de 2

4: /home/gparr/01/01/15/4115/MS/Informe/Doc/Report/Informe/Control/001593/aceite\_anis.qtd



Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/I	Mark	Name
1	8.26	8.22	8.325	410645	11.72	149160	13.84	2.75	V	3-Octanol, 2,2,3-trimethyl-
2	8.733	8.725	8.405	333356	8.94	144136	11.44	2.17		1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-amino
3	8.849	8.815	8.92	886080	18.58	557470	26.39	2.00	V	D-4-monoene
4	9.239	9.19	9.585	316961	9.04	65333	5.19	4.85	V	1,4-Butanediol, diacetate
5	10.68	10.64	10.729	264797	7.47	79902	6.34	3.28	V	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-methyl-1,1-
6	11.808	11.74	11.98	1091515	31.15	552501	27.98	3.1	NV	trans-anetol
7	12.086	12.045	12.159	217974	6.22	64812	5.03	3.37	V	Nosure, 5-methyl-3-propyl-
8	12.565	12.55	12.585	206180	5.88	71843	5.69	2.88	V	2,2,6-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyl
				3504508	100	1239776	100			