

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

**Actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de
Cinnamomum zeylanicum Breyn “canela” frente a *Staphylococcus*
aureus ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430**

Tesis presentada por:

TANIA GABRIELA ARIAS CHOQUE

Para optar el Título Profesional de

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

Tacna – Perú

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 201

TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO –MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico de la Facultad de Ciencias, certifica que mediante la resolución de la Facultad N° 7600 – 2013 – FACI/UNJBG se ha designado como jurado calificador para la sustentación de la tesis: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DEL ACEITE ESCENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum Breyn* “CANELA” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430, conformado por:

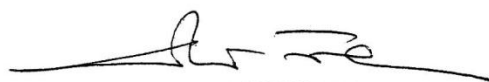
PRESIDENTE:	MSc. César E. Rivasplata Cabanillas
SECRETARIO:	Mblgo. Luis Lloja Lozano
VOCAL:	MSc. Angela V. Choque Miranda

Quienes calificaron el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 5 de Diciembre del 2013, a las 12:00 horas, por la Bachiller TANIA GABRIELA ARIAS CHOQUE, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología, para optar el título profesional de Biólogo - Microbiólogo.

El jurado calificador en forma secreta e individual, se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto, procediendo a emitir el siguiente resultado:


Aprobado por unanimidad con la nota de 16 (DIECISEIS) con el calificativo de bueno.

Para ratificar firma:



MSc. César Efraín Rivasplata Cabanillas

PRESIDENTE



Mblgo. Luis Lloja Lozano

SECRETARIO



MSc. Angela V. Choque Miranda

VOCAL

DEDICATORIA

A mi madre Lorena, por ser mi primera maestra, por enseñarme desde mis primeras palabras hasta los mejores consejos, gracias por ser la amiga que me ayudó a crecer, por estar siempre conmigo en todo momento. Gracias por la paciencia que tuviste, por el amor que recibí, por tus cuidados, por los regaños que me merecía y que no entendía. Gracias por estar al pendiente durante toda esta etapa y desde el cielo deseo te sientas orgullosa de mí, Te quiero mucho.

A mi padre Segundo, gracias por todos los sacrificios y enseñanzas que desde pequeña supiste inculcarme, por tu paciencia que me hacen ahora profesional y con muchos sueños en mente por cumplir. Gracias por esa templanza que me hace admirarte.

A mis hermanos Tony y Marita, gracias por preocuparse por su hermana mayor, por apoyarme tantas veces, por hacerme ver mis errores, gracias chinita por salvarme cuando más necesitaba de tu ayuda.

A Cesar, gracias por permitirme formar parte de tu vida, por ser el hombre con los mejores sentimientos que he conocido, por presionarme para terminar este trabajo, ayudarme con las correcciones, por aguantarme, pero sobre todo gracias por enseñarme a creer en mí y motivarme a hacer las cosas de la mejor manera. Gracias por todo amor, te adoro.

AGRADECIMIENTOS

Al Microbiólogo César Cáceda Quiroz, asesor del proyecto de tesis, por su predisposición y ayuda permanente en desarrollo del mismo. Mi respeto y agradecimiento.

Al profesor Edwin Obando, por su apoyo, consejos y adiestramiento durante la parte práctica de este trabajo, gracias por su paciencia y constante colaboración.

Gracias a todos aquellos familiares y amigos que con su aliento y buenos deseos me ayudaban a no dejarme vencer.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* “canela” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. **Metodología:** Se obtuvo el aceite esencial de las cortezas *Cinnamomum zeylanicum Breyn* mediante destilación por arrastre de vapor. Utilizando los métodos de: a) Kirby Bauer, se conoció el grado de sensibilidad en función al tamaño de los halos de inhibición, b) Por dilución en medio líquido se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y c) Por difusión en agar la Concentración Mínima Bacteriana (CMB) del aceite esencial. **Resultados:** Se demostró que *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430 presentan alta sensibilidad al aceite esencial. La CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue de 0,31633 mg/ml, para *Salmonella typhi* ATCC 19430 el CMI fue de 0,18076 mg/ml; el CMB para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue de 0,36152 mg/ml mientras que para *Salmonella typhi* ATCC 19430 el CMB fue de 0,27114 mg/ml. **Conclusión:** El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* presenta

actividad antibacteriana frente a ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538 y ***Salmonella typhi*** ATCC 19430.

Palabras claves: ***Cinnamomum zeylanicum*** **Breyn**, aceite esencial, ***Staphylococcus aureus***, ***Salmonella typhi***, halo de inhibición, CMI, CMB.

CONTENIDO

	Pág.
PÁGINA DE APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
CONTENIDO	<i>vi</i>
I. INTRODUCCIÓN	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
II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (canela)	8
2.1.1. Hábitat y distribución geográfica	8
2.1.2. Descripción general	8
2.1.3. Ubicación taxonómica	10
2.1.4. Composición química	10
2.1.5. Propiedades medicinales	11
2.2. Aceites esenciales	12
2.2.1. Propiedades	15
2.2.2. Composición química de los aceites esenciales	16
2.2.3. Distribución natural	18
2.2.4. Clasificación de los aceites esenciales	19

2.2.5.	Función de los aceites esenciales en el vegetal	21
2.2.6.	Extracción	22
2.2.7.	Usos	25
2.3.	Bacterias	28
2.3.1.	Generalidades	28
2.3.2.	<i>Staphylococcus</i>	30
2.3.2.1.	Patogenia e inmunidad	33
2.3.2.1.	Toxinas estafilocócicas	34
2.3.2.3.	Enzimas estafilocócicas	40
2.3.2.4.	Epidemiología	44
2.3.2.5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.3.3	Salmonella	64
2.3.3.1.	Patogenia e inmunidad	66
2.3.3.1.	<i>Salmonella typhi</i>	68
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.1.	Materiales	77
3.1.1.	Material biológico	77
3.1.2.	Material de vidrio	77
3.1.3.	Material de metal y otros	78
3.1.4.	Medios de cultivo y reactivos	79
3.1.5.	Equipos	79
3.1.6.	Lugar de experimentación	80
3.2.	Métodos	81
3.2.1.	Diseño experimental	81
3.2.2.	Variables	81
3.2.3.	Recolección de <i>Cinnamomum zeylanicum Breyn</i>	82
3.2.4.	Extracción y rendimiento del aceite esencial	83
3.2.5.	Cepas	86
3.2.6.	Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Cinnamomum Zeylanicum Breyn</i>	87
3.2.7.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria: Método de la macro dilución en medio líquido	92
3.2.8.	Determinación de la Concentración Mínima Bacteriana: Método de difusión en medio sólido	95

3.2.9.	Procesamiento y análisis estadístico	97
IV.	RESULTADOS	99
V.	DISCUSIÓN	118
VI.	CONCLUSIONES	129
VII.	RECOMENDACIONES	131
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
IX.	ANEXOS	139

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), indica que actualmente, 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. Alrededor del 80% de la población mundial utiliza las plantas como medio curativo, siendo varias las razones por las que socialmente el uso de las plantas medicinales está tomando un auge (hasta hace unas décadas) insospechado, ya sea como respuesta a una medicina alopática, muchas veces iatrogénica; en otros casos por la reducida o inexistente accesibilidad económica de la población a los medicamentos de síntesis, aunado al hecho incontrastable que los países en vías de desarrollo, como es el caso de Perú, que no cuenta con una industria farmacéutica propia. Además, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos y la pérdida de su efectividad frente a múltiples microorganismos, ha producido un renovado interés en el campo de la medicina alternativa.

Ya desde tiempos inmemoriales numerosas poblaciones indígenas de todo el mundo, algunas de niveles culturales muy elevados, tuvieron

como base de su supervivencia el uso de diversos productos que extraían de los bosques que constituían su hábitat. Entre tales productos se encuentran los empleados con fines medicinales.

En los últimos años, muchos países están desarrollando estudios sobre plantas medicinales que han logrado tener gran importancia médica. 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 infecciosas causadas por microorganismos patógenos.

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).

Teniendo en cuenta la existencia en Perú de una flora muy rica y el arraigo popular de la medicina natural y tradicional se debe trabajar en investigaciones científicas que garanticen el conocimiento y disposición de fitofármacos rigurosamente estudiados, que posibiliten la obtención de principios activos de bajo costo con efectos tóxicos inferiores a los existentes (INFA, 2000).

Según la medicina tradicional *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela) es usado como estimulante, aromático, aperitivo, emenagogo, astringente, carminativo, digestivo, para ayudar a la secreción de jugo gástrico, en el tratamiento de náuseas, vómito, reumatismo, gripe, hipertensión y malestares femeninos. También se le atribuyen propiedades afrodisiacas y acción contra las hemorragias, antirreumática, antiséptica, antidiarreica.

Diversos estudios han mostrado su efecto antimicrobiano y otros han explorado qué metabolitos están presentes en su aceite esencial. Sin

embargo, poco se ha explorado sobre su interacción específica con determinadas bacterias patógenas, lo cual fue objeto del presente estudio.

1.1. Enunciado del problema

¿Tendrá el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* *Breyn* “canela” actividad antibacteriana “in vitro” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430?

1.2. Hipótesis

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* *Breyn* “canela” tiene actividad antibacteriana *in vitro* sobre cepas de *S. aureus* y *S. typhi*.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana “In vitro” del aceite esencial de las cortezas *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente a *S. aureus* ATCC 6538 y *S. typhi* ATCC 19430.

1.3.2. Objetivos específicos

- Extraer el aceite esencial de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* por la técnica de arrastre a vapor.
- Determinar el efecto del aceite de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente al crecimiento bacteriano.

- Establecer el grado de sensibilidad que presentan **S. aureus** y **S. typhi** al aceite esencial **Cinnamomum zeylanicum Breyn** (Canela), mediante la técnica de difusión en disco.
- Precisar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de la corteza de **Cinnamomum zeylanicum Breyn** frente a **S. aureus** ATCC 6538 y a **S. typhi** ATCC 19430.
- Delimitar la concentración bactericida mínima (CMB) del aceite esencial de la corteza de **Cinnamomum zeylanicum Breyn** frente a **S. aureus** ATCC 6538 y a **S. typhi** ATCC 19430.

1.4. Determinación de variables

1.3.3. Tipos de variables

Variable independiente:

- Concentración del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn*** (canela)

Variable dependiente:

- Efecto sobre el agente bacteriano: ***S. aureus* ATCC 6538** y ***S. typhi* ATCC 19430**.

1.5. Operacionalización de variables e indicadores

Tabla 01: Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
VARIABLE INDEPENDIENTE Concentración del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Capacidad del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> "canela" de inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición	Medido en mm.
		Cualitativa	Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (-) Sensible (+) Muy Sensible (++) Sumamente sensible (+++)
VARIABLE DEPENDIENTE Efecto sobre las bacterias en estudio	Efecto que se produce sobre las especies bacterianas, agentes productores de infecciones.	Cepa ATCC <i>S. aureus</i> <i>S. typhi</i>	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez UFC

Fuente: Elaboración propia

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela)

2.1.1. Hábitat y distribución geográfica

Esta planta es originaria de Ceilán y suroeste de la India. Está presente en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados, entre los 100 y 200 msnm. Cultivado en huertos familiares, solares o presente en terrenos de cultivo abandonados, asociada a vegetación secundaria derivada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perenifolio, además del bosque mesófilo de montaña y bosque de pino (MOURA, 2011).

2.1.2. Descripción general

Cinnamomum zeylanicum Breyn “Canela” pertenece a la familia Lauraceae es un pequeño árbol que alcanza entre 3 y 10 m. de altura; su tronco suele llegar a los

50cm de diámetro. Sus ramas no son redondas, sino que presentan cuatro aristas romas, sólo erectas en su parte superior; están recubiertas por dos cortezas: una de color blanco amarillento y otra más esponjosa e intensamente aromática. Sus hojas, de colores verde amarillento, brillantes, ovaladas u oblongas, miden 15 a 20 cm de largo; presentan punta algo coriácea y una fina retícula por el envés, sobre todo cuando son jóvenes. Las flores son terminales, blancas o purpúreas, pequeñas y sedosas. Las hojas también presentan aroma y sabor típicos de la canela, mientras que el olor de sus flores resulta desagradable. El fruto es una baya de tamaño de un guisante, de color azul o negro y sabor picante cuando está verde; en su interior contiene usualmente dos semillas (ARANGO, 2007).

IMAGEN 01: Hojas y corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn



2.1.3. Ubicación taxonómica

Reino : Vegetal

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Dicotiledoneae

Orden : Laurales

Suborden : Magnoliineae

Familia : Lauraceae

Género : *Cinnamomum*

Especie : *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

Nombre Popular: Canela de Ceilán, cinamomo.
Canyella, Kanelondo, Caneleiro, Canelle, Zimt, Cinnamon,
Cannella.

2.1.4. Composición química

Los principales componentes del aceite esencial (0,5-2%) de la corteza son: Aldehído cinámico (50-80%), eugenol (9- 10%), safrol (0-11%), linalol (10-15%), contiene otros fenilpropanoides (aldehído hidroxicinámico, aldehído o-

metoxicinámico, alcohol cinámico y su acetato) y terpenos (limoneno y α -terpineol).

Mientras que en las hojas el eugenol está presente en un 80% (KUKLINSKI, 2003).

2.1.5. Propiedades medicinales

Según la medicina tradicional *Cinnamomum zeylanicum* *Breyn* “canela” es usado como estimulante, aromático, aperitivo, emenagogo, astringente, carminativo, digestivo, para ayudar a la secreción de jugo gástrico, en el tratamiento de náuseas, vómito, reumatismo, gripe, hipertensión y malestares femeninos. También se le atribuyen propiedades afrodisiacas y acción contra las hemorragias, antirreumática, antiséptica, antidiarreica.

Asimismo propiedades como espasmolítico, antibacteriano, antihelmíntico, dispepsia, flatulencia, anorexia, cólico intestinal, fungicida, antioxidante, antiulcerogénico, inflamaciones de la boca y la faringe,

diarreas infantiles, influenza, debilidad, convalecencia y externamente para tratar heridas (LEHMANN, 1998).

Las inhalaciones del vapor de agua hirviendo con 5 gotas de aceite de canela se utilizan para combatir la tos y la irritación respiratoria. La dilución de 10 ml de aceite de canela en 25 ml de aceite de almendras o de girasol aplicada en forma de masaje se emplea contra cólico abdominal, enfriamiento estomacal y diarrea. Las compresas con decocción o tintura de canela se usan para aliviar los dolores artríticos y reumáticos (FONNEGRA, 2006).

2.2. Aceites esenciales

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. 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 (CABIESES, 1993).

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, ésteres 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 isopreno.

Solo 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) (FONT, 1985).

2.2.1. 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; y es muy sensible ante la exposición al aire.

- 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 lugar fresco.

f) Solubilidad: Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque alguno 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).

2.2.2. Composición química de los aceites esenciales

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, 2003).

- **Cetonas:** Parecidas químicamente a los terpenos, algunas cetonas como la thuyona, se hallan en el “Ajenjo” (*Artemisia absinthium*), utilizado en la fabricación de numerosas bebidas alcohólicas como el vermut (RODRIGUEZ, 2000).

- **Alcoholes:** Como el borneol, mentol, geraniol, linalol o cineol.
- **Fenoles:** Timol, eugenol, eucaliptol, carvacrol, anetol.
- **Aldehídos:** Cinámico, anísico y benzoico.
- **Esteres:** Acetato de linalilo, salicilato de metilo (compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- **Carburos saturados y ácidos, compuestos sulfurados.**

2.2.3. Distribución natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas que incluyen las compuestas, Labiadas, Lauraceae, Mirtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (“ajenjo”, “albahaca”, “eucalipto”, “hierbabuena”, “mejorana”, “menta”, “pachulí”, “romero”,

“salvia”, etc.), en las raíces (“angélica”, “cúrcuma”, “jengibre”, “sándalo”, “sasafrás”, “valeriana”, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como “limón”, “mandarina”, “naranja”, etc.), en las semillas (“anís”, “cardamomo”, “hinojo”, “comino”, etc.), en el tallo (“canela”, etc.), en las flores (“lavanda”, “manzanilla”, “piretro”, “tomillo”, “rosa”, etc.) y en los frutos (“nuez moscada”, “perejil”, “pimienta”, etc.). Aunque en los Aceites esenciales tanto los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentran en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (SALDAÑA, 1992).

2.2.4. Clasificación de los aceites esenciales

Se clasifican con base en diferentes criterios: como consistencia y origen (entre otros).

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 y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, 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, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).
- De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos.
- Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos;

- Los 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 enriquecida con linalol;
- Los sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (ZAPATA, 2001).

2.2.5. 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).

2.2.6. Extracción

Se pueden extraer de las muestras vegetales por variados métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos. En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca 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).

En el método de 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, 2006).

En el 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 (HUAMANI, 2005).

El 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 dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor 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 necesitan bombas de alta presión y sistemas de extracción

también resistentes a las altas presiones (CHOQUEHUANCA, 2004).

2.2.7. Usos

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, producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

b) Industria Farmacéutica

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes. 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).

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, rosas y pachouli.

d) Industria de productos de uso veterinario

Esta industria emplea el aceite esencial de ***Chenopodium ambrosoides*** muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. También requiere limoneno y mentol como insecticidas.

e) Desodorantes Industriales

Actualmente se ha desarrollado el uso de esencias 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.

f) Industria tabacalera

Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.

g) Biocidas e insecticidas

Existen esencias con propiedades bactericidas, como el tomillo, clavo, salvia, mentas, orégano, pino, etc.

Otras son insecticidas:

- Contra hormigas: ***Mentha spicata*** (spearmint), Tanacetum y poleo.

- Contra áfidos: Ajo, otros *Allium*, coriandro, anís, albahaca.
- Contra pulgas: Lavanda, mentas, lemongrass, etc.
- Contra moscas: Ruda, citronela, menta, etc.
- Contra piojos: ***Mentha spicata***, albahaca, ruda, etc.
- Contra polilla: Mentas, Hisopo, romero, eneldo, etc.
- Contra coleópteros: ***Tanacetum***, comino, ajeno y tomillo, etc.
- Contra cucarachas: Menta, ajeno, eucalipto, laurel, etc.
- Contra nemátodos: Tagetes, salvia, caléndula, Aspáragus, etc. (FUNDACIÓN ALFONSO MARTIN ESCUDERO, 1999)

2.3. Bacterias

2.3.1. 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 μm 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, 2002).

2.3.2. *Staphylococcus*

Los cocos Gram positivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endoesporas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es una prueba sencilla que se utiliza para subdividirlos en varios géneros. Las catalasas son enzimas que catabolizan peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Cuando se pone en contacto una gota de solución de peróxido de hidrógeno con una colonia productora de catalasa, aparecen burbujas a medida que se forma oxígeno gaseoso (KONEMAN, 1992).

El nombre del género ***Staphylococcus*** procede del griego Staphylé, “racimo de uvas” Por tanto, la designación ***Staphylococcus*** se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas; sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1 μm y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente), inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal (por ejemplo cloruro sódico al 10%) y a temperaturas desde 18 hasta 40 °C. Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. En la actualidad, el género comprende 35 especies y 17 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. Algunas especies se desarrollan en nichos muy específicos en los que se encuentran habitualmente. Por ejemplo, ***Staphylococcus aureus*** coloniza las narinas anteriores, ***Staphylococcus capitis*** crece en regiones con glándulas sebáceas (como la frente) y ***Staphylococcus haemolyticus*** y ***Staphylococcus hominis*** se hallan en

zonas dotadas de glándulas apocrinas (como la axila). Las bacterias del género ***Staphylococcus*** conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, las partes blandas, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son ***S. aureus*** (el miembro más virulento y mejor conocido del género), ***Staphylococcus epidermidis***, ***S. haemolyticus***, ***Staphylococcus lugdunensis*** y ***Staphylococcus saprophyticus***. Las colonias de ***S. aureus*** son doradas debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Igualmente, representa la única especie colonizadora del ser humano que produce la enzima coagulasa. Cuando se suspende una colonia de ***S. aureus*** en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa, son conocidas

colectivamente como estafilococos coagulasa negativos (GARCIA, 1996).

2.3.2.1. Patogenia e inmunidad

La patología de las infecciones estafilocócicas depende de la producción de proteínas de superficie que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo anfitrión y la fabricación de proteínas extracelulares, como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas. La expresión de los genes que codifican exoproteínas se encuentra controlada fundamentalmente por un regulador global, agr, el cual está controlado, a su vez, por factores ambientales, la densidad celular y la disponibilidad de energía (GARCIA, 1996).

2.3.2.2. Toxinas estafilocócicas

S. aureus produce un gran número de factores de virulencia, entre los que figuran cinco toxinas citolíticas (alfa, beta, delta, gamma y leucocidina de Panton-Valentine P-V), dos toxinas exfoliativas (A y B), ocho enterotoxinas (A a E, G a I) y la toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) (GARCÍA, 1996).

a) Toxina alfa

La toxina alfa (α), la cual puede estar codificada tanto en el cromosoma bacteriano como en un plásmido, es un polipéptido de 33,000 Daltons producido por la mayoría de cepas de **S. aureus** que causan enfermedad en el ser humano. La toxina altera el músculo liso de los vasos sanguíneos y es tóxica para muchas células, como hematíes, leucocitos, hepatocitos y plaquetas (WILLS, 2000).

b) Toxina beta

La toxina beta (β), conocida también como esfingomielinasa C es una proteína termolábil de 35000 Daltons producida por la mayoría de las cepas de ***S. aureus*** que provocan enfermedad en el ser humano y los animales. En el ser humano no se ha demostrado aún la función de la toxina β , aunque se cree que es responsable, junto con la toxina α , de la destrucción tisular y la formación de los abscesos característicos de la enfermedad estafilocócica (SALDAÑA, 1992).

c) Toxina delta

La toxina delta (δ) es un polipéptido de 3000 Daltons producido por casi todas las cepas de ***S. aureus*** y la mayoría de las restantes especies estafilocócicas (por ejemplo ***S. epidermidis***, ***S. haemolyticus***). La toxina

tiene un amplio espectro de actividad citolítica, afecta a los hematíes, muchas otras células de los mamíferos y las estructuras de las membranas intracelulares (SCHTER, 2001).

d) Toxina gamma y leucocidina de Pantone-Valentine

La toxina gamma (γ) (fabricada por la mayoría de las cepas de *S. aureus*) y la leucocidina P-V (elaborada por <5% de las cepas de esta especie) son toxinas formadas por dos componentes que constan de dos cadenas de polipéptidos: el componente S (proteínas de elución lenta) y el componente F (proteínas de elución rápida). Las bacterias que producen ambas toxinas codifican todas estas proteínas y podrían producir seis toxinas distintas. Estas seis toxinas pueden lisar los neutrófilos y los macrófagos, y la actividad hemolítica más intensa (SCHTER, 2001).

e) Toxinas exfoliativas

El síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE), un espectro de enfermedades que se caracteriza por dermatitis exfoliativa, está mediado por toxinas exfoliativas. La prevalencia de la producción de toxina en las cepas de ***S. aureus*** varía en función de la distribución geográfica, pero generalmente se encuentra entre menos de un 5% y un 10%. Se han identificado dos formas distintas de toxina exfoliativa (ETA y ETB) (GARCIA, 1996).

f) Enterotoxinas

Se han identificado ocho tipos de enterotoxinas estafilocócicas (**A** a la **E**; **G** a la **I**) y tres subtipos de la enterotoxina C. Las enterotoxinas son estables a 100 °C durante 30 minutos y resistentes a la hidrólisis de las

enzimas gástricas y yeyunales. Por ello, cuando un alimento se ha contaminado por estafilococos productores de enterotoxinas y se han producido las toxinas, el hecho de volver a calentar ligeramente la comida o la exposición a los ácidos gástricos carecen de capacidad protectora frente a la acción de estos compuestos. Estas toxinas son producidas por una proporción de cepas de **S. aureus** comprendida entre el 30 y el 50%. La enterotoxina A es la toxina que se asocia con mayor frecuencia a la enfermedad. Las enterotoxinas C y D se encuentran en los productos lácteos contaminados, y la enterotoxina B produce colitis pseudomembranosa estafilocócica. Se conoce en menor medida la prevalencia de las restantes toxinas. Se ignora cuál es el mecanismo exacto de acción de la toxina, ya que no se dispone de ningún modelo animal adecuado (KONEMAN, 1992).

g) Toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)

La TSST-1, antes conocida como exotoxina pirogénica C y enterotoxina F, es una exotoxina termoestable y resistente a la proteólisis de 22 000 Daltons y codificada por un gen cromosómico. Se estima que el 90% de las cepas de ***S. aureus*** causantes del síndrome del shock tóxico (SST) asociado a la menstruación y la mitad de las cepas causantes de otras formas de SST producen TSST-1. La muerte de las pacientes aquejadas de SST se produce como consecuencia de un shock hipovolémico que origina insuficiencia multiorgánica (KONEMAN, 1992).

2.3.2.3. Enzimas estafilocócicas

a) Coagulasa

Las cepas de ***S. aureus*** poseen dos formas de coagulasa: ligada y libre. La coagulasa que se une a la pared del estafilococo puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina insoluble para forzar la agregación de los estafilococos. La coagulasa libre logra el mismo resultado al reaccionar con un factor del plasma (una globulina, factor que reacciona con la coagulasa) para originar una estafilotrombina, un factor semejante a la trombina. Este factor cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina insoluble. El papel de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad es especulativo, pero la coagulasa puede provocar la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, de forma que la infección quede localizada y los

microorganismos estén protegidos de la fagocitosis (GARCIA, 1996).

b) Catalasa

El peróxido de hidrógeno se puede acumular durante el metabolismo bacteriano o con posterioridad a la fagocitosis. Todos los estafilococos producen catalasa, la cual cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (GARCIA, 1996).

c) Hialuronidasa

La hialuronidasa hidroliza los ácidos hialurónicos, los mucopolisacáridos ácidos que se encuentran en la matriz acelular del tejido conectivo. La enzima favorece la diseminación de ***S. aureus*** en los tejidos. Más del 90% de las cepas de ***S. aureus*** es capaz de producir esta enzima (KONEMAN, 1992).

d) Fibrinolisisina

Prácticamente todas las cepas de **S. aureus** fabrican fibrinolisisina, conocida también como estafilocinasa, la cual puede disolver los coágulos de fibrina. La estafilocinasa es diferente de las enzimas fibrinolíticas producidas por los estreptococos (MURRAY, 2002).

e) Lipasas

Todas las cepas de **S. aureus** y más del 30% de las cepas de **Staphylococcus** coagulasa negativos producen diferentes lipasas. Como indica su nombre, estas enzimas hidrolizan los lípidos, una función esencial para garantizar la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo. Se cree que la presencia de estas enzimas es necesaria para que los estafilococos puedan

invadir los tejidos cutáneos y subcutáneos, y para el desarrollo de infecciones cutáneas superficiales (por ejemplo, forúnculos, carbunco) (KONEMAN, 1992).

f) Nucleasa

La nucleasa termoestable es otro marcador de ***S. aureus***, si bien otras especies también producen esta enzima. Se desconoce la función de esta enzima en la patogenia de la infección (KONEMAN, 1992).

g) Penicilinasas

Más del 90% de los estafilococos aislados eran sensibles a la penicilina en 1,941, el año en que el antibiótico se usó en clínica por primera vez. Los microorganismos desarrollaron con rapidez resistencia a la penicilina por su producción de penicilinasas (β -

lactamasa). La amplia distribución de esta enzima se aseguró por la presencia en plásmidos transmisibles (KONEMAN, 1992).

2.3.2.4. Epidemiología

Los estafilococos son ubicuos. Todas las personas portan estafilococos coagulasa negativos en la piel, y es frecuente la colonización transitoria de los pliegues cutáneos húmedos con ***S. aureus***. En los neonatos se observa con frecuencia la colonización del ombligo, la piel y la región perianal por ***S. aureus***.

S. aureus y los estafilococos coagulasa negativos se encuentran, igualmente, en bucofaringe, aparato digestivo y sistema genitourinario. El estado de portador permanente o temporal de ***S. aureus*** en niños, mayores y adultos es más frecuente en la nasofaringe que en la bucofaringe. Aproximadamente el 15% de los

adultos sanos son portadores permanentes de **S. aureus** en la nasofaringe, aunque se ha descrito una incidencia más elevada en los pacientes hospitalizados, el personal sanitario, los sujetos aquejados de enfermedades eczematosas de la piel y aquellos que utilizan frecuentemente agujas, ya sea de forma ilegal (por ejemplo drogodependientes) o por motivos médicos (por ejemplo con diabetes insulino-dependiente, sujetos que se vacunan frente a la alergia o que se someten a hemodiálisis). La adherencia de estos microorganismos al epitelio mucoso está regulada por las adhesinas estafilocócicas de superficie celular.

La diseminación de bacterias es frecuente y la responsable de muchas de las infecciones adquiridas en el hospital como consecuencia de la presencia de los estafilococos en la piel y en la nasofaringe. Los estafilococos son sensibles a las temperaturas elevadas, así como a los

desinfectantes y las soluciones antisépticas; sin embargo, los microorganismos pueden sobrevivir en las superficies secas durante períodos de tiempo prolongados. Estas bacterias se pueden transferir a una persona vulnerable por contacto directo o a través de fómites (ropa contaminada, sábanas). Debido a ello, el personal sanitario debe utilizar técnicas adecuadas de lavado de manos para evitar la transmisión de estafilococos a sus pacientes o entre los propios pacientes (KONEMAN, 1992).

2.3.2.5. *Staphylococcus aureus*

S. aureus causa enfermedad mediante la producción de toxina o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina (por ejemplo, SPEE, intoxicación alimentaria estafilocócica y SST),

mientras que otras afecciones son con secuencia de la proliferación de los microorganismos, la cual da lugar a la formación de abscesos y la destrucción tisular (por ejemplo infecciones cutáneas, endocarditis, neumonía, empiema osteomielitis y artritis séptica). La producción de enfermedad en presencia de un cuerpo extraño (por ejemplo, astilla, catéter, anastomosis, prótesis valvular o articular) requiere un número significativamente menor de estafilococos. Del mismo modo, los pacientes con alteraciones congénitas asociadas a defectos en la quimiotaxis o la respuesta fagocítica (como el síndrome de Job-Buckley, el síndrome de Wiskott Aldrich o la enfermedad granulomatosa crónica) son más vulnerables a las enfermedades estafilocócicas (MURRAY, 2002).

a) Síndrome de la piel escaldada estafilocócica (SPEE)

En el año 1878, Gottfried Ritter von Rittershain describió 297 lactantes menores de un mes que presentaban una enfermedad exfoliativa ampollosa. La enfermedad descrita por este investigador, conocida ahora como enfermedad de Ritter o SPEE, se caracteriza por el inicio brusco de un eritema peribucal localizado (enrojecimiento e inflamación alrededor de la lineal que se extiende por todo el organismo a lo largo de los 2 días siguientes. Una ligera presión desprende la piel (signo de Nikolsky positivo), y poco después se forman grandes ampollas y vesículas cutáneas que se siguen de descamación epitelial. Las ampollas contienen un líquido claro, pero no microorganismos ni leucocitos, un hallazgo compatible con la asociación de la enfermedad con una toxina bacteriana. El epitelio recupera

su estructura en un plazo comprendido entre 7 y 10 días, cuando aparecen los anticuerpos protectores. No se forman cicatrices debido a que la necrosis afecta solamente a la capa superior de la epidermis. A pesar de tratarse de una enfermedad fundamentalmente de neonatos y niños pequeños, la tasa de mortalidad es baja. Cuando se produce, la muerte suele deberse a una infección bacteriana secundaria de las zonas de piel afectadas (MURRAY, 2002).

b) Intoxicación alimentaria estafilocócica

La intoxicación alimentaria estafilocócica, una de las enfermedades más frecuentes transmitidas por los alimentos, representa una intoxicación en mayor medida que una infección. La enfermedad se debe a la acción de una toxina bacteriana presente en los alimentos más que al efecto directo de los

microorganismos en el paciente. Los alimentos que se contaminan con mayor frecuencia son las carnes elaboradas, como el jamón y el cerdo curados con sal, los bollos rellenos de crema, la ensalada de patatas y los helados. El crecimiento de **S. aureus** en las carnes curadas con sal se corresponde con su capacidad de proliferar en presencia de concentraciones elevadas de sal. A diferencia de lo que ocurre con muchas otras formas de intoxicación alimentaria, en las que el reservorio animal desempeña una relevante función, la intoxicación alimentaria estafilocócica es consecuencia de la contaminación de los alimentos por un portador humano. Aunque la contaminación se puede evitar al impedir que los sujetos con enfermedades estafilocócicas cutáneas evidentes preparen los comidas, aproximadamente la mitad de las infecciones procede de portadores con colonización

asintomática de la nasofaringe. Cuando los estafilococos se han introducido en los alimentos (a través de un estornudo o una mano contaminada), estos deben permanecer a temperatura ambiente o más elevada para que los microorganismos crezcan y liberen la toxina. Los alimentos contaminados no presentan un aspecto ni un sabor desagradables. El calentamiento posterior de los alimentos ayuda a la destrucción de las bacterias, pero no inactiva las toxinas termoestables (MURRAY, 2002).

El inicio de la enfermedad es abrupto y rápido, con un período medio de incubación de 4 horas tras la ingestión de la comida, lo que también corresponde a una enfermedad producida por una toxina preformada. Los estafilococos ingeridos no producen moléculas adicionales de la toxina, por lo que la evolución de la enfermedad es rápida y sus síntomas

duran generalmente menos de 24 horas. La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por la aparición de vómitos importantes, diarrea, dolor abdominal y náuseas. Se ha descrito la presencia de sudoración y cefalea, pero no de fiebre. La diarrea es acuosa y no sanguinolenta, y puede producirse deshidratación como consecuencia de la importante pérdida de líquidos.

Los microorganismos productores de toxinas se pueden cultivar a partir de los alimentos contaminados cuando el proceso de preparación de los mismos no haya sido capaz de destruirlos (KONEMAN, 1992).

Los anticuerpos capaces de neutralizar la toxina pueden conferir protección y existe una limitada reactividad cruzada entre las diferentes enterotoxinas. Sin embargo, la inmunidad es de corta duración, y pueden

darse episodios posteriores de intoxicación alimentaria estafilocócica, fundamentalmente por enterotoxinas diferentes desde el punto de vista serológico.

c) Síndrome del shock tóxico (SST)

El primer brote del SST se produjo en Australia en el año 1928, donde la enfermedad se desarrolló en 21 niños, 12 de los cuales fallecieron tras haber recibido una vacuna contaminada con **S. aureus**. Transcurridos 50 años desde este episodio, J. K. Todd describió el llamado síndrome del shock tóxico en 7 niños con enfermedad sistémica, y en el verano de 1,980 se publicaron los primeros casos de SST en mujeres menstruantes. Estos datos se siguieron de un aumento espectacular de la incidencia de SST, fundamentalmente en mujeres. Posteriormente se descubrió que las cepas de **S. aureus** productoras de TSST-1 se

podían multiplicar rápidamente en los tampones súper absorbentes y liberar la toxina. Después de la retirada de estos tampones, la incidencia de la enfermedad, fundamentalmente en las mujeres menstruales, descendió rápidamente. En la actualidad, se estima que se producen alrededor de 6,000 casos de SST al año en EE.UU. Aunque en un principio se describió que los estafilococos coagulasa negativos podían originar este síndrome, en la actualidad se cree que la entidad se restringe a ***S. aureus*** (MURRAY, 2002).

Esta enfermedad se inicia con el crecimiento localizado de las cepas de ***S. aureus*** productoras de la toxina en la vagina o la herida, seguida de la liberación de la toxina en la sangre. La producción de la toxina impone una atmósfera aerobia y un pH neutro.

d) Infecciones cutáneas

Dentro de las infecciones estafilocócicas piogénicas localizadas figuran el impétigo, la foliculitis, los forúnculos y el carmíneo. El impétigo, una infección superficial que afecta sobre todo a niños pequeños, se produce fundamentalmente en la cara y las extremidades. Inicialmente se observa una pequeña mácula (una mancha roja aplanada), y luego se desarrolla una pústula (vesícula llena de pus) sobre una base eritematosa. Se forma una costra después de la rotura de la pústula.

Es frecuente la existencia de múltiples vesículas en distintas fases de desarrollo como consecuencia de la extensión secundaria de la infección a zonas adyacentes de la piel. El impétigo se debe generalmente a la infección por ***S. aureus***, aunque estreptococos del grupo

A, de manera independiente o en combinación con ***S. aureus***, originan un 20% de los casos.

La foliculitis es una infección piógena de los folículos pilosos. La base del folículo está elevada y enrojecida, y hay una pequeña acumulación de pus bajo la superficie de la epidermis. Cuando afecta a la base de los párpados se conoce como orzuelo. Los forúnculos, una extensión de la foliculitis, son nódulos elevados, dolorosos y grandes por debajo de los cuales se acumula tejido necrótico. Pueden drenar de forma espontánea o después de una incisión quirúrgica (MURRAY, 2002).

El carbunco aparece cuando los forúnculos coalescen y se extienden hasta el tejido subcutáneo más profundo. Suele estar presente un número elevado de fístulas. A diferencia de los pacientes con foliculitis y

forúnculos, los pacientes con carbunco presentan escalofríos y fiebre, lo que indica una extensión sistémica a otros tejidos a través de una bacteriemia estafilocócica (MURRAY, 2002).

Las infecciones estafilocócicas de las heridas pueden tener lugar con posterioridad a una intervención quirúrgica o a un traumatismo como consecuencia de la introducción en la herida de microorganismos que colonizan la piel. Por lo general, los estafilococos no son capaces de producir infección en un individuo inmunocompetente a no ser que exista un cuerpo extraño en la herida (por ejemplo, grapas, astillas, suciedad). Las infecciones se caracterizan por la presencia de edema, eritema, dolor y acumulación de material purulento. La infección se puede controlar fácilmente mediante la apertura de nuevo de la herida, la extracción del cuerpo extraño y el

drenaje del material purulento. El tratamiento antibiótico específico frente a ***S. aureus*** está indicado cuando se observen signos como fiebre o malestar general, o la herida no mejora después del tratamiento local (MURRAY, 2002).

e) Bacteriemia y endocarditis

S. aureus es una causa frecuente de bacteriemia. Aunque las bacteriemias producidas por la mayor parte de los microorganismos tienen su origen en un foco identificable de infección, como una infección pulmonar, del aparato genitourinario o el aparato digestivo, no se conocen los focos iniciales de la infección en aproximadamente un tercio de los pacientes afectados por una bacteriemia por ***S. aureus***. Lo más probable es que la infección se extienda a la sangre a partir de una infección cutánea de aspecto inocuo.

Más del 50% de los casos de bacteriemia por **S. aureus** se adquieren en el hospital después de una intervención quirúrgica, o como consecuencia del uso continuado de un catéter intravascular contaminado. Las bacteriemias por **S. aureus**, y en especial los episodios prolongados, se asocian a la diseminación a otras partes del organismo, como el corazón.

La endocarditis aguda producida por **S. aureus** constituye una enfermedad grave con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50%. Aunque los pacientes aquejados de endocarditis por **S. aureus** pueden mostrar inicialmente síntomas inespecíficos de tipo gripal, su situación se puede deteriorar rápidamente con alteración del gasto cardíaco e indicios de embolizaciones sépticas periféricas (GARCIA, 1996).

f) Neumonía y empiema

La enfermedad respiratoria por **S. aureus** se puede producir después de la aspiración de secreciones bucales o la diseminación hematógena del microorganismo desde un foco alejado. La neumonía por aspiración se observa fundamentalmente en los sujetos muy jóvenes, los ancianos y los pacientes aquejados de fibrosis quística, gripe, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o bronquiectasias. Las presentaciones clínicas y radiológicas de la neumonía no son características. El examen radiológico pone de manifiesto la presencia de infiltrados parcheados con consolidación o abscesos, los cuales se deben a la capacidad de secreción de toxinas y enzimas citotóxicas y de formar abscesos localizados por parte del microorganismo. La neumonía de diseminación hematógena es frecuente en pacientes con

bacteriemia o endocarditis. En los últimos años se ha descrito una forma grave de neumonía necrosante adquirida en la comunidad con hemoptisis masiva, shock séptico y una elevada tasa de mortalidad. La leucocidina P-V presente en las cepas causantes de esta entidad podría constituir un destacado factor de virulencia. A pesar de que esta enfermedad se ha relacionado más a menudo con niños y adultos jóvenes, no se limita a estos grupos de edades (KONEMAN, 1992).

El empiema afecta al 10% de los pacientes con neumonía, y **S. aureus** es el agente etiológico en un tercio de los casos. En algunos casos resulta difícil llevar a cabo el drenaje del material purulento debido a que los microorganismos se pueden consolidar en áreas loculadas aisladas (GARCIA, 1996).

g) Osteomielitis y artritis séptica

La osteomielitis por ***S. aureus*** puede derivar de la diseminación hematógica en el hueso, o puede constituir una infección secundaria como consecuencia de un traumatismo o bien de la extensión de una infección desde una zona adyacente. La diseminación hematógica en los niños procede generalmente de una infección cutánea estafilocócica, y suele afectar a las metáfisis de los huesos largos, una zona de crecimiento óseo muy vascularizada. Esta infección se caracteriza por la presencia de dolor de inicio brusco en la zona ósea afectada y de fiebre elevada.

La osteomielitis hematógica que se observa en los adultos aparece habitualmente en forma de osteomielitis vertebral, y rara vez en forma de infección de los huesos largos. El

síntoma inicial es un intenso dolor de espalda con fiebre. La evidencia radiológica de osteomielitis en niños y adultos no se observa hasta 2 ó 3 semanas después del comienzo de los síntomas.

S. aureus es la principal causa de artritis séptica en niños pequeños y adultos que reciben inyecciones intraarticulares o portadores de articulaciones con anomalías mecánicas. La afectación secundaria de múltiples articulaciones indica la diseminación hematógena desde un foco localizado. *S. aureus* se ve sustituido por ***Neisseria gonorrhoeae*** como la causa más frecuente de artritis séptica en personas sexualmente activas. La artritis estafilocócica se caracteriza por una articulación dolorosa y eritematosa de la que se obtiene material purulento por aspiración. La infección se demuestra en las grandes articulaciones (por ejemplo, hombro,

rodilla, cadera, codo). El pronóstico en niños es excelente, mientras que en adultos depende de la naturaleza de la enfermedad subyacente y de las complicaciones infecciosas secundarias (MURRAY, 2002).

2.3.3. *Salmonella*

El género salmonela pertenece a la familia enterobacteriaceae. Siendo fiel a su nombre, esta familia se compone de bacterias que se multiplican en el intestino, siendo varios los géneros de enterobacteriaceae que incluye especies patógenas.

Al igual que todos los géneros de enterobacteriaceae, salmonella está formado por bacterias gram negativas flageladas y de forma bacilar. Las salmonelas son microorganismos anaerobios facultativos, presentando las dos rutas metabólicas, la oxidativa y la fermentativa. Son oxidasa negativos, fermentan la glucosa generando ácido y gas, crecen en citrato como única fuente de energía, de

carboxilan la lisina y la ornitina suele producir sulfuro de hidrogeno y no hidroliza la urea .Una de las características de este género es que la mayor parte de sus integrantes no pueden fermentar lactosa ni la sacarosa (AHMEDE, 2006).

Hasta el momento se distinguen las siguientes especies: ***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 ó 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.

2.3.3.1. Patogenia e inmunidad

Salmonella es ingerida, ingresa al estómago, se protege de los ácidos del estómago y el pH ácido gracias a un gen de respuesta de tolerancia a los ácidos (ATR), llega al intestino delgado, se localiza en las placas de peyer mediante fimbrias, específicas de cada especie, se adhiere a las cel M gracias al sistema de secreción tipo III (SPI-1), factor de virulencia de las enterobacterias, invade específicamente las cel M (micropliegues) de la mucosa intestinal, estas células transportan antígenos de cuerpos extraños a los macrófagos

subyacentes para su eliminación, el sistema de secreción SPI-1 introduce proteínas de invasión secretadas por la bacteria a las cel M, dando lugar a reorganización de la actina de las cel del organismo anfitrión con la consiguiente ondulación en la membrana, estas membranas onduladas rodean y engullen a las salmonelas inicia su replicación intracelular en el fagosoma, la cel anfitriona se destruye y la salmonella se extiende a cel epiteliales subyacentes y al tejido linfoide, la respuesta inflamatoria limita la infección al aparato digestivo, liberación de prostaglandinas y estimula secreción de AMPc y líquidos.

Salmonella entra por la vía fecal-oral que al sobrevivir en el ambiente acido 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:

a) Fimbrias tipo 1 (FIM)

Específica α -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

b) Fimbrias largas polar (LPF)

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

c) Agregado fino o fimbrias curli y intestino delgado

d) Plásmidos

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

Salmonella ha desarrollado medidas complejas para invadir las células huésped después de la inserción epitelial. Tras la interacción con las células huésped, la Salmonella puede expresar un sistema de secreción tipo III (T3SS), lo que facilita la absorción del endotelio y la invasión.

La proteína reguladora importante es T3SS Hila, cuya expresión está mediada por una serie de factores ambientales importantes para la supervivencia celular (MURRAY, 2002)

2.3.3.2. *Salmonella typhi*

Al ser los seres humanos los únicos huéspedes de este tipo de salmonellas, la fuente de nuevas infecciones son los enfermos, los enfermos convalecientes (durante tres meses aproximadamente) y los portadores sanos crónicos (2% de las personas que han pasado la enfermedad, más frecuente en mujeres con colelitiasis).

La vía de transmisión es la fecal-oral, a través de aguas contaminadas no higienizadas, alimentos manipulados por portadores, ingestión de crustáceos contaminados o vegetales regados con aguas contaminadas. Todas estas circunstancias hacen que en el momento actual el diagnóstico de casos de fiebre tifoidea en nuestro entorno (Europa), donde se llevan a la práctica medidas socio-sanitarias adecuadas, sea excepcional, y los casos que se ven corresponden a personas que

han viajado a zonas endémicas (África, Sudeste Asiático, América Latina) o que proceden de ellas.

Una vez que la persona ingiere salmonellas el desarrollo de la enfermedad va a depender fundamentalmente de la cantidad de microorganismos ingeridos (inóculo), de su virulencia y de factores dependientes del huésped. Las cepas Vi negativas son menos infecciosas y virulentas que las cepas Vi positivas.

Se precisa, por término medio, un inóculo superior al millón de gérmenes. La acidez gástrica es una barrera natural importante, siendo factores predisponentes aquellas circunstancias que modifican el pH gástrico, como aclorhidria, vagotomía, gastrectomía o la toma de fármacos que lo modifican.

Una vez superada la barrera gástrica las salmonellas pasan al intestino delgado, donde

encuentran un medio más idóneo, más aún si hay una alteración de la flora intestinal normal por el uso previo de antibioterapia. Se adhieren a receptores específicos de las vellosidades intestinales, atraviesan la mucosa, alcanzan los linfáticos de las placas de Peyer donde se multiplican, pasando a la sangre donde son atrapadas por fagocitos y macrófagos del sistema reticuloendotelial, acumulándose en los órganos ricos en él como son hígado, el bazo y la médula ósea. Finalmente vuelven a pasar al intestino y a la vesícula biliar. Las placas de Peyer se muestran tumefactas pudiéndose ulcerar la mucosa intestinal pasada la primera semana y originar una hemorragia o la perforación, las dos complicaciones más graves del cuadro.

La curación de la enfermedad depende del establecimiento de una eficaz inmunidad celular del huésped por parte de los linfocitos T activados. Pacientes con trastornos de su inmunidad, sobre

todo celular, como ocurre en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o en los pacientes oncológicos presentan mayor susceptibilidad y desarrollan procesos más graves (GARCIA, 1996).

a) Manifestaciones clínicas:

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, 1992).

b) 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, 1992).

c) 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 éstos negativos. Títulos de anticuerpos tipo Ig M anti-O superiores a 1/640 o aumento de valores de títulos basales en 4 o más veces tienen valor diagnóstico (KONEMAN, 1992).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Salmonella typhi* ATCC 19430

3.1.2. Material de vidrio

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 15 x 125 mm
- Tubos de ensayo de 13 x100 mm y 40 de 15 x 125 mm
- Balones de vidrio de 100, 250, 500 ml
- Placas Petri de 10 x100 mm
- Matraces de 500 ml
- Matraces de 250 ml
- Matraces de 100 ml.
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 5 ml
- Pipetas de 10 ml.

- Vasos precipitados de 200 ml.
- Frasco de vidrio color ámbar de 100 ml capacidad.
- Frascos de vidrio de 500 ml capacidad.
- Probeta de 100 ml
- Mortero de porcelana

3.1.3. Material de metal y otros

- Pinzas, tijeras
- Hojas de bisturí
- Espátula
- Papel aluminio
- Bombillas de absorción
- Discos de papel para cultivo
- Asa de Kolle
- Asa de Drigalski
- Gradillas
- Papel kraft
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Guardapolvo

- Jeringa de tuberculina
- Algodón
- Pabilo
- Reglas milimetradas
- Marcadores
- Calculadora

3.1.4. Medios de cultivo y reactivos

- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- Agar Müeller Hinton
- Caldo Müeller Hinton
- Dimetil Sulfóxido 10% (DMSO).
- Agua destilada
- Alcohol de 70°
- Ron de quemar

3.1.5. Equipos

- Autoclave
- Estufa

- Incubadora
- Balanza analítica
- Equipo de destilación
- Nefelómetro de Mc Farland
- Equipo de vórtex.
- Estereoscopio
- Contador de colonias
- Microscopio
- Cámara fotográfica

3.1.6. Lugar de experimentación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. El experimento se llevó a cabo de mayo a julio del 2013.

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño experimental

Aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn*

Diseño experimental con 12 tratamientos y 4 repeticiones por microorganismo teniendo así un total de 96 unidades experimentales.

3.2.2. Variables

Variables independientes

- Concentración del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn*** (Canela).

Variables dependientes

- Efecto sobre el agente bacteriano (***S. aureus* ATCC 6538, *S. typhi* ATCC 19430**)

Controles

Como control negativo se utilizó el vehículo líquido dimetilsulfóxido y como control positivo se empleó cultivos de *Staphylococcus aureus* y de *Salmonella typhi*

3.2.3. Recolección de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela).

La corteza de canela en estudio fue obtenida en una comercializadora de especies y condimentos del mercado mayorista “Grau”, comprando 1500 gramos de la muestra para los fines de estudio.

La corteza fue recolectada verificando que no presenten signos de enfermedades que interfieran en el desarrollo de la tesis, y fueron almacenadas en bolsas de papel Kraft para su traslado y conservación hasta su posterior procesamiento.

3.2.4. Extracción y rendimiento del aceite esencial

a) Extracción del aceite esencial

Las cortezas de canela fueron trozadas en tamaños más pequeños para facilitar la extracción, agrupándose luego en muestras de 250 g las cuales fueron embolsadas en papel kraft. La obtención del aceite esencial de la corteza 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, uno de los cuales contuvo agua destilada (700 ml) y fue sometido a calor directo; mientras que en el segundo (Capacidad 1000 ml) contuvo 250 gramos de la corteza de canela, el cual fue el que recibía los vapores de agua, para que luego el vapor producido arrastre los aceites esenciales hasta el refrigerante. Este cambio de temperatura hace que el vapor se condense y se vuelva nuevamente líquido (agua- aceite). El producto destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, observándose un estado bifásico entre agua y aceite esencial, por la diferencia de densidades. Y utilizando las pipetas Pasteur se separó el

aceite esencial para luego almacenarse en un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente y envuelto en papel aluminio para proteger de la luz del ambiente. Los aceites esenciales fueron almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

Tabla 02: Características organolépticas

Especie vegetal <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Breyn</i>	
Aspecto	Líquido traslúcido
Color	Marrón
Olor	Característico
Sabor	Picante

Fuente: Elaboración propia

b) Determinación de la densidad

Donde:

d= densidad (g/ml)

m= masa (g)

v= volumen (ml)

W_1 = Peso probeta (g)

W_2 = Peso probeta con aceite (g)

Vol. Aceite= Volumen de aceite (ml)

Vol. aceite= 1ml.

W_1 = 16,2948 g.

W_2 = 17,1986 g.

$$d=m/v$$

$$d= \frac{W_2 - W_1}{v}$$

$$1,0 \text{ ml}$$

$$d= \frac{(17,1986 \text{ g.} - 16,2948 \text{ g.})}{1,0 \text{ ml}}$$

$$1,0 \text{ ml}$$

$$d = 0,9038 \text{ g/ml} = 903,8 \text{ mg/ml}$$

c) Rendimiento del aceite esencial

Se determinó el porcentaje de rendimiento del aceite esencial (% RAE) por el método de gravimetría-volumétrico, mediante el método de arrastre por vapor de agua. A partir de 250 g de las cortezas de ***Cinamomun Zeylanicum Breyn*** (canela) obteniendo un determinado volumen (con cuatro destilaciones de un total de 1000g de

muestra), lográndose obtener un rendimiento de 0,7 %, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%RAE = \frac{\text{Vol. A.E. (ml)}}{W_{\text{muestra}} \text{ (g)}} \times 100$$

Donde:

% RAE= Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

Vol. A.E.= Volumen del aceite esencial obtenido

W muestra = Peso de la muestra a destilar

% RAE= 7 ml x 100

1000 (g)

% RAE= 0,7 %

3.2.5. Cepas

3.2.5.1. Recolección

Se utilizó microorganismos patógenos de importancia clínica, proporcionada por el Ministerio de Salud-Tacna (Minsa): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430.

3.2.6. Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Cinnamomum Zeylanicum Breyn*

La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó por el método de Kirby Bauer (difusión en disco) (DURAFFOURD, 1983).

En el ensayo se usó volúmenes de aceite esencial puro (0,5 µl – 10 µl) para la determinación de los halos de inhibición, con el fin de saber entre cuales 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 0,5 μ l, 1,0 μ l, 2,0 μ l, 3,0 μ l, 4,0 μ l, 5,0 μ l, 6,0 μ l, 7,0 μ l, 8,0 μ l, 9,0 μ l, 10,0 μ l, 11,0 μ l de aceite esencial respectivamente, teniendo un total de 96 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: Que consiste 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 Cinnamomum Zeylanicum Breyn puro</i>		
N° Tratamiento	Volumen (µl)	[] (mg/ml)
T1	0,5	0,4519
T2	1,0	0,9038
T3	2,0	1,8076
T4	3,0	2,7114
T5	4,0	3,6152
T6	5,0	4,519
T7	6,0	5,4228
T8	7,0	6,3266
T9	8,0	7,2304
T10	9,0	8,1342
T11	10,0	9,038
T12	11,0	9,9418

Fuente: Elaboración propia

b) Preparación del inóculo bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430

Las bacterias que se utilizaron en el trabajo se cultivaron en tubos de agar nutritivo para su mantención; para luego ser activadas en Caldo Müller Hilton e incubadas por el lapso de 6 a 8 horas hasta llegar a una concentración de $1,5 \times 10^8$ y 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 Mueller Hinton, utilizando la suspensión estandarizada de bacterias a una concentración de $1,5 \times 10^8$ (Tubo 0,5 de Mac Farland). Se depositó 100 μ l del inóculo bacteriano sobre la superficie del agar de cada placa correspondientemente, mediante la técnica de diseminación hasta que el inóculo quede distribuido de

modo homogéneo. Se dejó secar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a utilizar las diluciones del aceite esencial, luego se incorporó un disco 6 mm de diámetro de papel Wathman N° 42 previamente esterilizados, los discos fueron embebidos con 0,5 µl, 1,0 µl, 2,0 µl, 3,0 µl, 4,0 µl, 5,0 µl, 6,0 µl, 7,0 µl, 8,0 µl, 9,0 µl, 10,0 µl, 11,0 µl de aceite esencial durante 1 hora para su mejor impregnación. Cada disco impregnado con el aceite esencial, fue tomado con una pinza estéril y se colocó sobre la superficie del agar, se presionó suavemente para asegurar el contacto con el medio.

Las placas se incubaron a 37°C durante 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. Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por Duraffourd, 1983; donde señala como sensibilidad límite de 9 a 14mm, sensibilidad media de 15 a 19mm y sumamente sensible de 20 mm a más.

3.2.7. 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 20 000 μ l totales: 2000 μ l de aceite esencial con 2000 μ l de Dimetilsulfóxido 10% (DMSO) y 16000 μ l de caldo Mueller Hinton (MH). La concentración final se obtuvo de la siguiente manera (DURAFFOURD, 1983).

A partir de la densidad obtenida= 0,9038 g/ml =>
903,8 mg/ml

Sabiendo que:

$$1 \text{ ml} = 1\,000 \mu\text{l} \longrightarrow [\] = 903,8 \text{ mg}$$

$$10 \mu\text{l} \longrightarrow X$$

$$X = 90,38 \text{ mg}$$

Se trabajó con miligramos de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

$$\begin{array}{l}
 1\text{g} \longrightarrow 1\,000\text{ mg} \\
 0,9038\text{ g} \longrightarrow X \\
 X = 903,8\text{ mg}
 \end{array}$$

Se determinó que en 1 ml o en 1000 μl existían 903,8 mg de aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn*** pero en la solución madre se llevó 2 ml o 2000 μl en consecuencia se determinó lo siguiente:

$$\begin{array}{l}
 1\,000\ \mu\text{l} \longrightarrow 903,8\text{ mg de aceite esencial} \\
 2000\ \mu\text{l} \longrightarrow X \\
 X = 1807,6\text{ mg}
 \end{array}$$

Esta concentración fue diluida en 20 000 μl de solución total por lo cual se consiguió una concentración final de:

$$\begin{array}{l}
 1807,6\text{ mg} \longrightarrow 20\,000\ \mu\text{l} \\
 X \longrightarrow 1\,000\ \mu\text{l (1ml)} \\
 X = 90,38\text{ mg}
 \end{array}$$

Esta cifra es la concentración final en la solución madre es decir que en 20 000 µl de solución madre está concentrada 90,38 mg/ml de aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn***

b) Preparación del CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430

Se utilizó el método de la Macro dilución en tubos con medio Caldo Müller Hinton, preparando diluciones del aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn*** a diferentes concentraciones, después de los cual se agregó una suspensión bacteriana constante de acuerdo al estándar de turbidez de 0,5 de McFarland. Se prepararon 15 tubos de 15 x 150 mm a los cuales se les agregó lo siguiente:

Tabla 04: Tratamientos de concentraciones finales para identificación de CMI y CMB

Tratamiento	V. Solución Madre (μ l)	Caldo Müller Hinton (μ l)	Vol. Total de la solución (μ l)	Conc. en 1ml o 1000 μ l	Conc. Final de la solución (mg/ml)
T1	0,5	2999,5	3000	90,38	0,04519
T2	1,0	2999,0	3000	180,76	0,09038
T3	1,5	2998,5	3000	271,14	0,13557
T4	2,0	2998,0	3000	361,52	0,18076
T5	2,5	2997,5	3000	451,90	0,22595
T6	3,0	2997,0	3000	542,28	0,27114
T7	3,5	2996,5	3000	632,66	0,31633
T8	4,0	2996,0	3000	723,04	0,36152
T9	4,5	2995,5	3000	813,42	0,40671
T10	5,0	2995,0	3000	903,80	0,45190

Fuente: Elaboración propia

3.2.8. Determinación de la Concentración Mínima Bacteriana (CMB): Método de difusión en medio sólido.

a) Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Una vez obtenido la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de la macro dilución en medio líquido se procedió a realizar la obtención de la

Concentración Mínima Bactericida (CMB), tomando los tres tubos en donde no se presentó turbidez.

Se procedió a tomar 100 µl de los tubos 7, 8 y 9 para sembrar en placas con Agar Mueller Hinton, con la ayuda de un asa de Drigalsky se diseminó y se incubo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes por cada concentración del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*, *Breyn* y así ubicar el correspondiente CMB (≤ 1 ufc/placa).

b) Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Salmonella typhi* ATCC 19430

Una vez obtenido la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de la macro dilución en medio líquido se procedió a realizar la obtención de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tomando los tres tubos en donde no se presentó turbidez.

Se procedió a tomar 100 µl de los tubos 4, 5 y 6 para sembrar en placas con Agar Müeller Hinton, con la ayuda de un asa de Drigalsky se diseminó y se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes por cada concentración del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*, *Breyn* y así ubicar el correspondiente CMB (≤ 1 ufc/placa).

3.2.9. Procesamiento y análisis estadístico

El presente trabajo de investigación se basó en un estudio cuasi-experimental, 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 significancia de 0,05 y 0,01, finalmente para establecer las diferencias medias entre los tratamientos se utilizó prueba de significación de Tukey al 0,05. Todos los

tratamientos a base de ***Cinnamomum zeylanicum Breyn*** se expresaron en mg/ml, mientras que los promedios de los halos de sensibilidad se expresaron en milímetros (mm).

IV. RESULTADOS

Se realizó el estudio *in vitro* en dos especies bacterianas: ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** y ***Salmonella typhi* ATCC 19430** demostrándose la sensibilidad de las bacterias mencionadas frente al aceite esencial de ***Cinnamomum zeylanicum* Breyn** “canela”; para lo cual se trabajó con 12 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 este es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

CUADRO 01:

Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (“canela”) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por el método de difusión en disco Kirby Bauer.

Tratamiento	Aceite esencial		Diámetro del halo de inhibición (mm)				Promedio de halos (mm)
	Volumen	Conc. (mg/ml)	Repeticiones				
			I	II	III	IV	
T1	0,5 µl	0,4519	30,1	32,9	29,1	32,3	31,1
T2	1,0 µl	0,9038	34,2	35,4	33,9	31,3	33,7
T3	2,0 µl	1,8076	34,0	34,6	34,8	33,1	34,1
T4	3,0 µl	2,7114	34,2	34,3	34,6	35,1	34,6
T5	4,0 µl	3,6152	35,2	34,9	36,1	33,2	34,9
T6	5,0 µl	4,5190	33,3	33,2	34,7	32,6	33,5
T7	6,0 µl	5,4228	36,1	37,0	35,1	34,6	35,7
T8	7,0 µl	6,3266	35,1	36,8	35,4	34,9	35,6
T9	8,0 µl	7,2304	38,9	40,3	35,6	35,7	37,6
T10	9,0 µl	8,1342	35,9	35,7	34,7	35,8	35,5
T11	10,0 µl	9,0380	40,3	41,9	40,1	40,9	40,8
T12	11,0 µl	9,9418	41,9	41,3	42,1	42,0	41,8

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 01 se observa el efecto antibacteriano de las 12 concentraciones probadas que se evidencian con halos de inhibición entre 31,1 mm y 41,8 mm de radio. Siendo la concentración de 9,9418 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño.

CUADRO 02

Determinación del grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela” según Duraffourd (1983).

Aceite esencial			Grado de sensibilidad		
N°	Volumen (μl)	Conc.(mg/ml)	Sensibilidad límite 9 a 14mm (sensible= +)	Sensibilidad media 15 a 19mm (muy sensible=++)	Sumamente sensibilidad 20mm a más (s.s.= +++)
T1	0,50	0,4519			33,1
T2	1,00	0,9038			33,7
T3	2,00	1,8076			34,1
T4	3,00	2,7114			34,6
T5	4,00	3,6152			34,9
T6	5,00	4,5190			33,5
T7	6,00	5,4228			35,7
T8	7,00	6,3266			35,6
T9	8,00	7,2304			37,6
T10	9,00	8,1342			35,5
T11	10,00	9,0380			40,8
T12	11,00	9,9418			41,8

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 02, se determina el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz; observándose que en todas las concentraciones del aceite esencial dan halos de inhibición mayores a 20,0 mm; lo cual indica que *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 es sumamente sensible frente a las

diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela”.

CUADRO 03

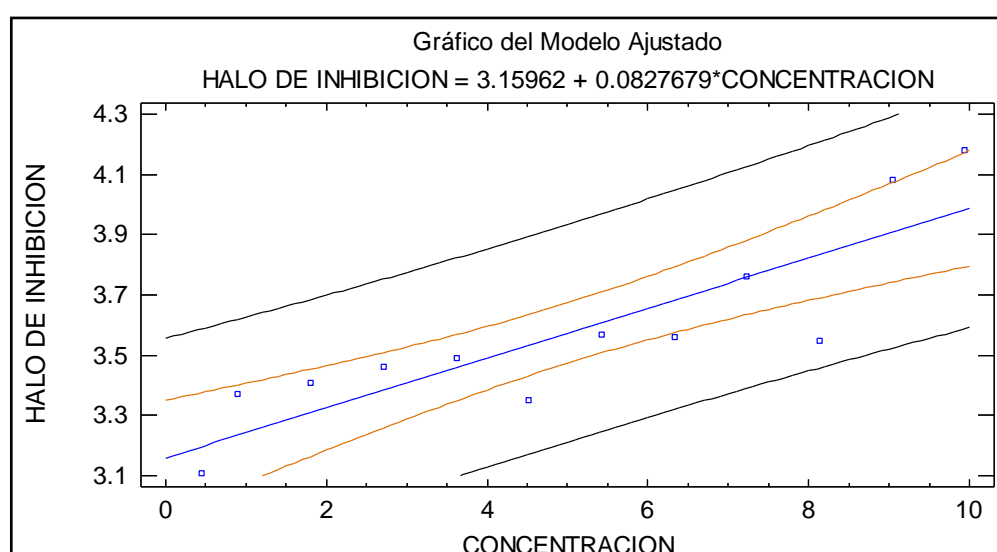
Análisis de varianza de regresión lineal simple para promedio del tamaño de los halos de inhibición entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,08077	11	0,370979	25,14	0,0000
Intra grupos	0,5313	36	0,0147583		
Total (Corr.)	4,61207	47			

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

La Cuadro 03 descompone la varianza de DIAMETRO DEL HALO en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 25,1369, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del DIAMETRO

DEL HALO entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.



Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphic.

Gráfico 01: Análisis de correlación y regresión lineal simple entre el tamaño de los halos de inhibición y la concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

El Gráfico 01, nos muestra que existe una alta correlación entre las variables de estudio, la ecuación señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración de aceite esencial el crecimiento de los halos se

incrementa en 0,827679mm. El coeficiente de Pearson 0,872386 indica una alta correlación entre las variables, el coeficiente de determinación fue de $R^2 = 76,1057$; explica que el crecimiento de los halos está determinada por las concentraciones de aceite esencial.

CUADRO 04

Análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” a través de la variación de promedios de halos de inhibición sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 entre las diferentes concentraciones empleadas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,770716	1	0,770716	31,85	0,0002
Residuo	0,241976	10	0,0241976		
Total (Corr.)	1,01269	11			

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

- Planteamiento de la Hipótesis:

H_0 : No existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos

H_1 : Si existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos

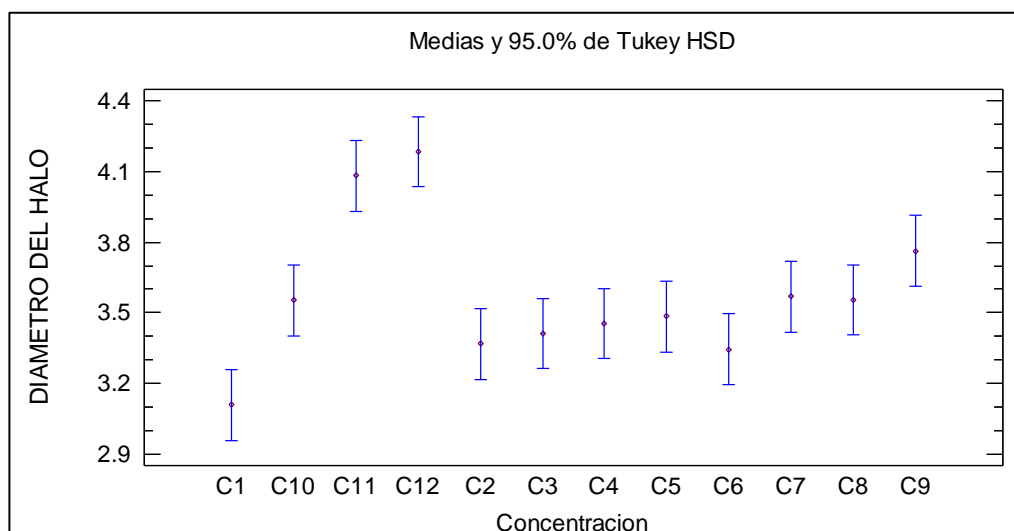
- **Nivel de significancia:** $\alpha = 0,05$
- **Estadístico de prueba:** $F_c = 31,85$
- **Decisión:** $F_c > \alpha = 0,05$ Por lo tanto
- **Conclusión:** Se concluye que la relación es altamente significativa entre la concentración del aceite esencial y el tamaño de los halos, es decir están relacionados linealmente con un nivel de confianza del 95%.

CUADRO 05

Promedios de significancia de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T1	4	31,1	X
T6	4	33,45	X
T2	4	33,7	X
T3	4	34,125	XX
T4	4	34,55	XX
T5	4	34,85	XX
T10	4	35,525	X
T8	4	35,55	X
T7	4	35,7	X
T9	4	37,625	X
T11	4	40,8	X
T12	4	41,825	X

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics



Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

Gráfico 02: Promedio de cada uno de los halos y la concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

En el gráfico 02, se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtiene el tratamiento T12 que alcanzó el mayor promedio de 41,825 mm.

CUADRO 06

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (canela) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	0,04519	T
T2	0,09038	T
T3	0,13557	T
T4	0,18076	T
T5	0,22595	T
T6	0,27114	T
T7	0,31633	NT
T8	0,36152	NT
T9	0,40671	NT
T10	0,45190	NT
TP	Control positivo	T
TN	Control negativo	NT

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro 06, muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn*, donde se observa que a partir del tubo 7 se inhibe el crecimiento bacteriano. Por tanto, la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue de 0,31633 mg/ml.

CUADRO 07

Concentración Mínima Bactericida (CMB) producido por el aceite esencial *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (“canela”) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

N° Tubos	N° Placas	Conc. mg/ml	UFC/placa	Observaciones
7	1	0,31633	2	
8	2	0,36152	1	CMB
9	3	0,40671	0	

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro 07, muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basándonos a partir de los resultados obtenidos del Cuadro N° 06; tomando los tres primeros tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 8 a concentración de 0,36152mg/ml se ubica el CMB ya que se registra un crecimiento de ≤ 1 ufc/placa.

CUADRO 08

Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (“canela”) frente a *Salmonella typhi* ATCC 19430 por el método de difusión en disco Kirby Bauer.

Trata_ miento	Aceite esencial		Diámetro del halo de inhibición (mm)				Promedio de halos (mm)
	Volumen	Conc. (mg/ml)	Repeticiones				
			I	II	III	IV	
T1	0,5 µl	0,4519	25,7	22,6	25,5	26,0	25,0
T2	1,0 µl	0,9038	32,6	31,0	35,1	33,0	32,9
T3	2,0 µl	1,8076	31,5	32,0	37,5	37,6	34,7
T4	3,0 µl	2,7114	32,6	32,9	32,3	33,0	32,7
T5	4,0 µl	3,6152	31,0	32,0	37,0	34,7	33,7
T6	5,0 µl	4,5190	30,0	31,1	31,7	33,1	31,5
T7	6,0 µl	5,4228	33,7	32,6	32,0	32,7	32,8
T8	7,0 µl	6,3266	39,4	38,6	28,0	26,6	33,2
T9	8,0 µl	7,2304	38,1	34,6	33,7	33,5	35,0
T10	9,0 µl	8,1342	38,2	38,1	33,8	34,5	36,2
T11	10,0 µl	9,0380	41,2	53,3	39,4	35,6	42,4
T12	11,0 µl	9,9418	39,5	37,0	39,0	37,0	38,1

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 08 se observa el efecto antibacteriano de las 12 concentraciones probadas que se evidencian con halos de inhibición entre 25,0 y 38,1 mm de radio. Siendo la concentración de 9,0380 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño.

CUADRO 09

Determinación del grado de sensibilidad de *Salmonella typhi* ATCC 19430 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* “canela” según Duraffourd (1983).

Aceite esencial			Grado de sensibilidad		
N°	Volumen (µl)	Conc. (mg/ml)	Sensibilidad límite 9 a 14mm (sensible= +)	Sensibilidad media 15 a 19mm (muy sensible=++)	Sumamente sensibilidad 20mm a más (s.s.= +++)
T1	0,50	0,45			25,0
T2	1,00	0,90			32,9
T3	2,00	1,81			34,7
T4	3,00	2,71			32,7
T5	4,00	3,62			33,7
T6	5,00	4,52			31,5
T7	6,00	5,42			32,8
T8	7,00	6,33			33,2
T9	8,00	7,23			35,0
T10	9,00	8,13			36,2
T11	10,00	9,04			42,4
T 12	11,00	9,94			38,1

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 09, se determina el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz.; observando que en todas las concentraciones del aceite esencial dan halos de inhibición mayores a 20,0 mm; por lo cual indican que *Salmonella typhi* ATCC 19430 es sumamente sensible frente a las

diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela”.

CUADRO 10

Análisis de varianza de regresión lineal simple para el tamaño de los halos de inhibición entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,0675	1	1,0675	13,36	0,0044
Residuo	0,799155	10	0,0799155		
Total (Corr.)	1,86665	11			

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

- **Planteamiento de la Hipótesis:**

H_0 : No existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos

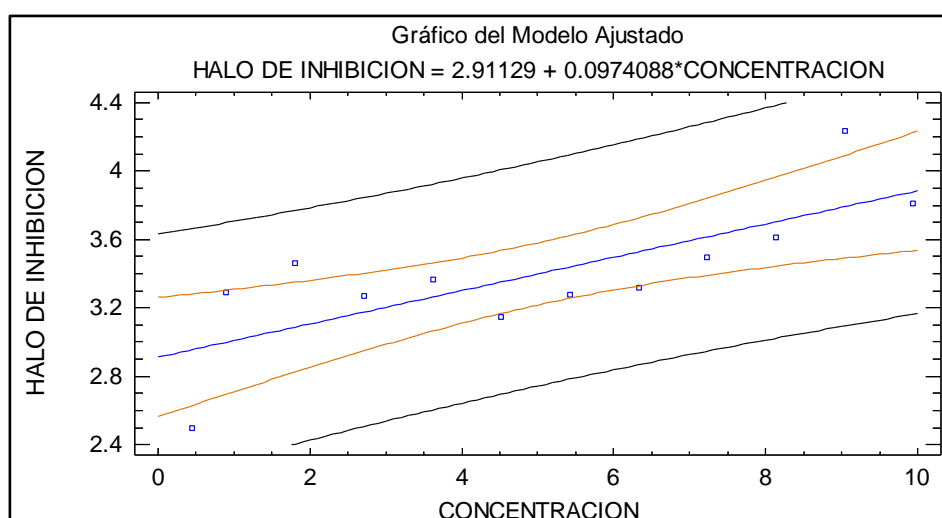
H_1 : Si existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos

- **Nivel de significancia:** $\alpha = 0,05$

- **Estadístico de prueba:** $F_c = 13,36$

- **Decisión:** $F_c > \alpha = 0,05$; Por lo tanto

- **Conclusión:** Se concluye que la relación es altamente significativa entre la concentración del aceite esencial y el tamaño de los halos, es decir están relacionados linealmente con un nivel de confianza del 99%.



Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

Gráfico 03: Análisis de correlación y regresión lineal simple entre el tamaño de los halos de inhibición y la concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Salmonella typhi* ATCC 19430.

El Gráfico N° 03, nos muestra que existe una alta correlación entre las variables de estudio, la ecuación señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración de aceite esencial el crecimiento de los halos se

incrementa en 0,09740mm. El coeficiente de Pearson de 0,756226 indica una alta correlación entre las variables, el coeficiente de determinación fue de $R^2 = 57,1878$; este valor explica que el crecimiento de los halos está determinada por las concentraciones de aceite esencial.

CUADRO 11

Análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” a través de la variación de promedios de halos de inhibición sobre *Salmonella typhi* ATCC 19430 entre las diferentes concentraciones empleadas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,46662	11	0,678783	5,72	0,0000
Intra grupos	4,27495	36	0,118749		
Total (Corr.)	11,7416	47			

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

La tabla ANOVA descompone la varianza de DIAMETRO DEL HALO en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 5.71614, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que

0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de DIAMETRO DEL HALO entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

El análisis de varianza utilizado para Fc fue de 0,05 y 0,01% de probabilidad, de promedios de halos de inhibición, indica que no existen diferencias estadísticas a nivel de halos, es decir fueron uniformes,

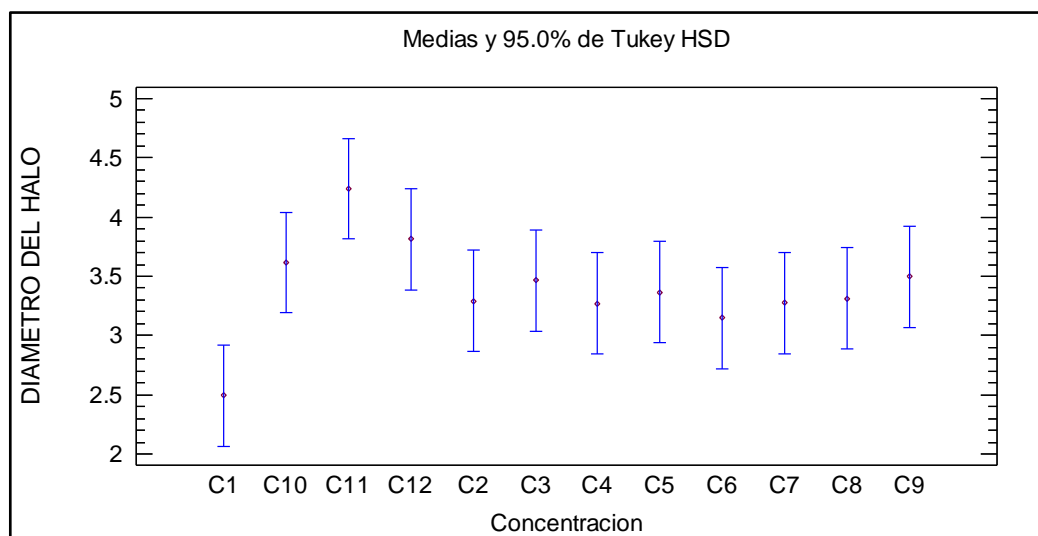
CUADRO 12

Promedios de significancia de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum Breyn* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Concentración	Casos	Media (mm)	Grupos Homogéneos
T1	4	24,95	X
T6	4	31,475	XX
T2	4	32,7	XX
T3	4	32,75	XX
T4	4	32,925	XX
T5	4	33,15	XX
T10	4	33,675	X
T8	4	34,65	XX
T7	4	34,975	XX
T9	4	36,15	XX
T11	4	38,125	XX
T12	4	42,375	X

Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

La prueba de significancia de Tukey registra los promedios de los diferentes tratamientos del aceite esencial, cabe destacar que el mayor promedio lo tiene el tratamiento 11, seguido del tratamiento 12, 10 y 9 que son estadísticamente diferentes.



Fuente: Elaboración propia diseñado en Statgraphics

Gráfico 04: Promedio de cada uno de los halos y la concentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

En el gráfico 04, se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtiene el tratamiento T11 que alcanzó el mayor promedio de 42,375 mm.

CUADRO 13

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (canela) frente a *Salmonella typhi* ATCC 19430

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	0,04519	T
T2	0,09038	T
T3	0,13557	T
T4	0,18076	NT
T5	0,22595	NT
T6	0,27114	NT
T7	0,31633	NT
T8	0,36152	NT
T9	0,40671	NT
T10	0,45190	NT
TP	Control positivo	T
TN	Control negativo	NT

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro 13, muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn*, donde se observa que a partir del tubo 4 se inhibe el crecimiento bacteriano. Por tanto, la CMI para *Salmonella typhi* ATCC 19430 fue de 0,18076 mg/ml.

CUADRO 14

Concentración Mínima Bactericida (CMB) producido por el aceite esencial *Cinnamomun zeylanicum Breyn* (“canela”) frente a *Salmonella typhi* ATCC 19430

N° Tubos	N° Placas	Conc. mg/ml	UFC/placa	Observaciones
4	1	0,18076	3	
5	2	0,22595	2	
6	3	0,27114	0	CMB

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro 14, muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basándonos a partir de los resultados obtenidos del Cuadro 13; tomando los tres primeros tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 6 a concentración de 0,27114mg/ml se ubica el CMB ya que se registra un crecimiento de ≤ 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.

Un aspecto que motiva a la investigación en este campo y en especial con los antibacterianos es el desarrollo de mecanismos de resistencia por algunas especies, se explica en parte porque la mayoría de fármacos son bacteriostáticos y por la administración prolongada de los tratamientos, lo cual permite la aparición de clones resistentes. Por tanto ante este aumento de infecciones bacterianas, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces entre las plantas medicinales (KALEMBA, 2003).

Se reconoce que los efectos de los aceites esenciales dependen de sus propiedades fisicoquímicas. Los terpenoides pueden servir como

un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ejemplo ciertos componentes del aceite esencial pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP (KALEMBA, 2003).

En lo referente a la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios, interviene el carácter lipofílico e hidrofílico de sus grupos funcionales y a la polaridad que poseen, para poder tener propiedades antisépticas, antimicrobianas y antimicóticas, siendo esta actividad biológica de mayor a menor en fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres. Los esfuerzos para encontrar una correlación entre la composición y bioactividad de los aceites esenciales no han sido totalmente dilucidados. Se presume que la actividad biológica de estos aceites esenciales no está determinada por la cantidad de monoterpenos, sino más bien por su tasa de proporcionalidad (KALEMBA, 2003).

Se han reportado que algunos aceites esenciales pueden ser más efectivos que los agentes sintéticos (antimicrobianos) (BURROYS, 1969). Un motivo más para el desarrollo del presente trabajo de investigación

toda vez que a la canela entre muchas propiedades se le atribuye efecto o actividad antimicrobiana muy fuerte, por ello se determinó su actividad antibacteriana *in vitro* frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** y ***Salmonella typhi* ATCC 19430**. La actividad biológica del aceite esencial de canela está relacionada con sus principales componentes, denominados cinamaldehído y eugenol. El primero se cree tiene la más alta actividad antimicrobiana entre los aldehídos alifáticos; mientras que al eugenol se le atribuyen propiedades antisépticas y anestésicas (FONNEGRA, 2006).

Ambos microorganismos evaluados fueron seleccionados por ser agentes patógenos muy comunes en infecciones de origen alimenticio en el ser humano. Las pruebas de sensibilidad proporcionaron datos sobre el efecto del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** (canela), observándose una alta sensibilidad en ambos casos.

El aceite esencial de canela se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, técnica muy utilizada tanto a pequeña escala y a escala industrial debido a su alto rendimiento, pureza del producto obtenido y porque no se requiere tecnología sofisticada dejando de lado

otros métodos como la extracción con solventes volátiles, el método de enflorado o enfleurage y la extracción con fluidos supercríticos.

El aceite esencial de las cortezas de *Cinnamomum zeylanicum* **Breyn** “canela” obtenido por el método de arrastre de vapor tuvo un rendimiento de 0,7%.

Posteriormente se confirmó la presencia de ciertas sustancias específicas relacionadas con las propiedades que se le atribuyen a este aceite, para lo cual se utilizó la técnica de Cromatografía gaseosa.

De acuerdo al informe de ensayo N° ANA12J12.000614A que se realizó en la Universidad Católica de Santa María del Laboratorio de ensayo y Control de Calidad-Arequipa (Anexo 10); por el método de cromatografía gaseosa con detección de masa se observó en forma cualitativa y cuantitativa la presencia de los siguientes compuestos: Alpha pinene (1,52%); Linalool,methyl ether (3,18%); Cinnamaldehyde, (E)- (70,79%); Thymol (1,86%); Eugenol (4,87%); Canyophyllene (3,42%) y 2-propen-1ol,3-phenyl-acetate (14,36%). 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).

Demostrándose así que el compuesto con mayor porcentaje es el cinamaldehído en un 70,79%. Se cree que su mecanismo de acción es generar alteraciones irreversibles en la membrana de la bacteria, especialmente bloqueando la síntesis de esteroides y la actividad de la ATPasa, condicionando sobremanera su futura supervivencia. Esta actividad sobre la ATPasa produce acidificación intracelular y muerte del microorganismo (SHEIKH, 2011).

Al componente cinamaldehído presente en el aceite esencial de canela, según las fuentes bibliográficas, se le atribuye una alta actividad antimicrobiana entre los aldehídos alifáticos ya que probablemente actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como, amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular; por lo que impide el crecimiento bacteriano (SHEIKH, 2011).

El paso siguiente una vez confirmada la presencia de estas sustancias fue observar su efectividad frente los patógenos en estudio; para lo cual se utilizó el método de difusión en Disco (Kirby Bauer) basado

en el grado de sensibilidad en función al tamaño del halo de inhibición, también se utilizó el método de dilución en medio líquido para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y por último el método de difusión en agar para encontrar la concentración mínima bacteriana (CMF). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto, la actividad antibacteriana presentada por el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn*, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430.

En todas 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 Committe for Clinical Laboratory Standars) por no presentar ninguna actividad antibacteriana, no interfiriendo en los resultados (HUAMANI, 2006).

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.

Las observaciones preliminares puestas de manifiesto con la formación de halos de inhibición incentivaron a seguir adelante con el estudio de esta especie botánica. Se determinó la efectividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” versus las bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. 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.

En la primera prueba para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430, se trabajó a concentraciones que inician de 0,4519 mg/ml hasta 9,9418mg/ml, cabe mencionar que paralelamente se contrastó con un control positivo para ambos microorganismos; transcurrido el periodo de incubación de 37°C por 24h se procedió hacer las lecturas de las placas, verificándose la formación de halos de inhibición del crecimiento tanto en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430, con lo que se pudo determinar que ambas bacterias presentan un alto grado de sensibilidad según la escala de Duraffourd y Lapraz (>20mm)

frente al aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** . Posteriormente se identificó el CMI y CMB. Partiendo de la dilución madre, con concentraciones de 0,9038mg/ml hasta 9,038mg/ml (DURAFFOURD, 1983).

En los Cuadros 01 y 08 (pág.88 y 97), se puede apreciar la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** y ***Salmonella typhi* ATCC 19430** respectivamente, por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). La sensibilidad de las cepas empiezan con el T1 (0,4519 mg/ml) con un halo promedio de inhibición de 31,1mm y 25,0 mm para cada caso, alcanzando diámetros promedio de 41,8 mm y 38,1 mm correspondientemente en el T12 (9,9418 mg/ml) lo que indica que es directamente proporcional a la concentración utilizada; a mayor concentración mayor será el diámetro del halo de inhibición.

En el Cuadro 02 (pág. 89), según la escala de aromatógrama de Duraffourd y Lapraz se muestra el grado de sensibilidad para ***Staphylococcus aureus*** en función al halo de inhibición de crecimiento del microorganismo (HICM), desde T1 (0,4519 mg/ml) a T12 (9,9418mg/ml) del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum Breyn***

se aprecian halos de inhibición de 33,1 mm a 41,8 mm evidenciando ser sumamente sensible; lo mismo para ***Salmonella typhi*** en el Cuadro 09 (pág. 98) con halos promedio que van desde 25,0 mm a 38,1 mm.

Comparando estadísticamente mediante regresión lineal en el Cuadro 03 (pág. 90) se tiene que para ***Staphylococcus aureus*** existe una diferencia significativa entre la media del radio del halo entre un nivel de concentración y otro con una significancia del 95%. Y para ***Salmonella typhi*** en el Cuadro 10 (pág. 99) de acuerdo al análisis de varianza se demuestra que existe una diferencia significativa entre el diámetro del halo y la concentración. Con nivel de confiabilidad al 95 % se demuestra que existe diferencias altamente significativas entre los promedios de los halos de inhibición para las concentraciones utilizadas del aceite esencial frente a ***Staphylococcus aureus*** y ***Salmonella typhi***; con un coeficiente de variabilidad 6,410% siendo aceptable como un máximo de 15% para condiciones de laboratorio. Por lo que al realizar la prueba de significación de Tukey según Cuadro 05 y Gráfica 02 (pág. 94, 95) se confirmó que el T12 (9,9418mg/ml) tuvo mayor actividad antibacteriana y de mayor significancia para ambos microorganismos con un halos de inhibición de 41,8mm y 38,1mm en cada caso.

Según el Cuadro 06 (pág. 87, 88). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** se observa en el tratamiento 7 del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum* Breyn** con 0,31633 mg/ml, esto debido a la ausencia de la turbidez y en el Cuadro 11 la concentración mínima inhibitoria para ***Salmonella typhi* ATCC 19430** se presenta en el tratamiento 4 con 0,18076 mg/ml de aceite esencial. Finalmente la concentración mínima bacteriana (CMB) en el tratamiento 8 con una concentración de 0,36152 mg/ml para ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**, y en el tratamiento 6 con 0,27114 mg/ml para ***Salmonella typhi* ATCC 19430**, donde se aprecia la inhibición absoluta del crecimiento de sendas bacterias.

El efecto inhibitor que algunos extractos vegetales pueden tener sobre bacterias de importancia radica en sus complejos activos. Trabajos como el de Hagermann (1981) sugirieron que la mezcla de estos principios activos se caracteriza por un incremento considerable de su concentración en taninos y que posiblemente son estos compuestos los que le dan actividad antibacteriana, ya que los taninos producen precipitación de proteínas (enzimas) implicadas en las diversas rutas metabólicas bacterianas.

En investigaciones realizadas por Youngken (1932) se encontró que los taninos son metabolitos que se encuentran en diferentes partes de la planta. Estos son solubles en agua, etanol, acetona; otorga resistencia a la planta contra parásitos y para el hombre es útil por su actividad farmacológica como antihemorrágico local, antidiarreico y antibacteriano, ya que al combinarse con las proteínas de la membrana celular de las bacterias, las desnaturalizan.

Por último existen diferentes principios activos y que 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 de la canela 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.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que el aceite esencial obtenido de la corteza de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* “canela” posee alta actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430.
- El aceite esencial extraído de las cortezas de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* “canela” por el método de arrastre de vapor, tuvo un rendimiento de 0,7% y una densidad de 0,9038g/ml. Su aspecto fue translúcido, de color marrón, olor característico y sabor picante.
- El aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* tiene un efecto antibacteriano proporcional frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430.
- Tanto *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430 frente al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum Breyn* “canela” son sumamente sensibles a concentraciones de 0,4519 mg/ml – 9,9418 mg/ml.

- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** para ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** fue de 0,31633mg/ml y para ***Salmonella typhi* ATCC 19430** fue de 0,18076mg/ml.
- La concentración mínima bacteriana (CMB) del aceite esencial ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** para ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** fue de 0,36152mg/ml y para ***Salmonella typhi* ATCC 19430** fue de 0,27114mg/ml.

VII. RECOMENDACIONES

- Se debe valorar la actividad antibacteriana del aceite esencial de ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** (canela) frente a otras bacterias de importancia clínica.
- Realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de ***Cinnamomun zeylanicum Breyn*** como también poder determinar sus dosis terapéuticas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APATA, 2001 PR. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Edición1ª. Universitaria.Vol.1.; 46, 317.
2. ARS PHARMACEUTICA, 2001 “Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f.” Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada 44:3;257-269.
3. ARS PHARMACEUTICA, 2003 “Actividad antimicrobiana de *Cuminum cyminum* L.” Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada 44:3;257-269.ALI-SHTAYEH MS, ABU GHDEIB SI. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses.*; 42(11-12): 665-72
4. ARANGO MEJÍA, MARÍA CRISTINA (2007), “Plantas Medicinales”- Botánica de interés Médico. Editorial Forja, Colombia, Bogotá.
5. BANDONI, A.L. 2000. “Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica”; CYTED; editorial de la Universidad de La Plata.
6. BURROYS, WILLIAM (1969). “Tratado de microbiología”- 19ava edición, Editorial Interamericana S.A.
7. BRUNETON, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
8. CAMAQUI A. (2009). Plantas medicinales: La experiencia de Tinguipaya. 2da Edición, Editorial Gente Común. La Paz, Bolivia.

9. CHAMORRO AW.; MORALES E, SEQUEIRA W. Y GUSTAVO, A 2006. Identificación de los componentes del aceite esencial. Grupo de Investigación en Química Orgánica y Biológica QUIMOBÍ. UT. Facultad Regional Resistencia. French 414. Resistencia, Chaco.
10. 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.
11. DIXON DM, RHODES JC, FROMTLING R.A. (1999): Taxonomy, classification, and morphology of fungi. In Murray PR et al, ed 7, editors: *Manual of clinical microbiology*, , Washington, DC, American Society for Microbiology
12. DURAFFOURD, C y J., LAPRAZ (1983). Cuaderno de fitoterapia clínica. Editorial Masson. Francia.
13. FONNEGRA G., RAMIRO Y JIMÉNEZ R. SILVIA (2006) “Plantas Medicinales aprobadas en Colombia” -2da Edición , Editorial Universidad de Antioquia.
14. FUNDACIÓN ALFONSO MARTÍN ESCUDERO (1999)-Las Plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Madrid.
15. GARCÍA-BARRIGA H., (1974), “Flora Medicinal de Colombia”. Tomo I. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Bogotá.

16. GARCIA RJ Y PICAZO JJ. 1996 Microbiología Médica. Editorial Mosby. Tomo 2., 606.
17. HOSS, REINHART. 2000. Recursos botánicos con potencial biocida. Revista publicada por la red de acción en alternativa al uso de agroquímicos (RAAA). Perú.
18. INSTITUTO DE FITOTERAPIA AMERICANO (INFA). 2000. Resumen del 1er congreso internacional de plantas medicinales y fitoterapia. Lima – Perú.
19. KALEMBA D, KUNICKA A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 10(10): 813-29.
20. KONEMAN. ALLEN. JANDA. (1987) "Diagnostico Microbiológico"- Texto y Atlas en color-6ta Edición. Editorial médica Panamericana
21. KUKLINSKI CLAUDIA (2003), Farmacognosia "Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural"-Ediciones Omega.
22. LEHMAN (1998). PF: In Ajello L, Hay RJ, vol 4, editors: Topley and Wilsons Microbiology and microbial diseases, Medical. London.
23. LOCK DE UGAS, O. (1994). Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. 2da Edición. PUCP. Lima – Perú.
24. MOSCOSO CASTILLA M. (2002). Secretos Medicinales de la flora peruana y guía de maternidad, 4ta edición: Editorial Mundi-Prensa. España: Madrid.
25. MURRAY PATRICIA R, ROSENTHAL KEN S. (2012). "Microbiología médica" 4ta Edición- Elsevier science impr.Mosby

26. SÁNCHEZ O. S. (1980) Flora del valle de México. Tomo I. Cuarta edición. Editorial Herrera.

TESIS

27. CANO PÉREZ, CARLOS A. (2008), "Actividad Antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña)" Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado. Lima-Perú.
28. CHAMORRO AW.; MORALES E, SEQUEIRA W. y GUSTAVO, A (2006). Identificación de los componentes del aceite esencial de hojas de *Eugenia caryophyllata*. Grupo de Investigación en Química Orgánica y Biológica QUIMOBIO. UT. Facultad Regional Resistencia. French 414. Resistencia, Chaco-Argentina.
29. 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. Arequipa-Perú
30. CORNEJO, A.V. (1986). "Estudio morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho"-Tesis Universidad San Cristóbal de Huamanga-Perú.

31. 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.
32. 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.
33. MOURA MENDES, JULIANA y COL. (2011), “Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos”. Universidad Federal de Paraíba. Brasil.
34. PADRÓN MÁRQUEZ, BEATRÍZ (2010), “Componentes Químicos con Actividad Bactericida, Fungicida y Citotóxica de Plantas de la Familia Myrtaceae y Lauraceae” Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. México.
35. SALDAÑA, LUIS ELIAS LEIVA “Guía moderna de medicina natural I”, Primera edición 1992, Editorial Publicaciones Asdimor Industria Avanzada, Lima Perú.

36. WILLS, A.M.; RICCIARDI, G.; AGRELO DE NASSIFF, A.E. y TORRES, A. M , A.L. 2000. "Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica"; CYTED; editorial de la Universidad de La Plata.
37. ZAPATA, P.R. 2001. "Plantas de uso Medicinal en Guatemala". Universitaria. Vol.1. P 46, 317.

REVISTAS

38. CATALÁN M, MONTEJO J.C. (2006). Antifúngicos sistémicos: Farmacodinamia y Farmacocinética. Revista Iberoamericana Micol. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2006-23/039049.pdf>
39. GUNDIDZA M. (1993). La Actividad de Antimicrobial de Aceite Esencial de *Eugenia caryophyllata* Linn. Revista médica Africian.. 39 (11): 231-234. Brasil.
40. MESA-ARANGO, A.C., BUENO SANCHEZ, J.G. AND BETANCUR GALVIS, L.A. (2004). Natural products with antimycotic activity. Rev Esp Quimioter 17: 325-331
41. PONTÓN J, MORAGUES MD, GENÉ J, GUARRO J, QUINDÓS G. (2002). Revista iberoamericana de micología: Hongos y actinomicetos alergénicos, 1era Edición. España: Bilbao.
42. SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA (SIIC) 2002. Disponible en:
<http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb534.htm>
43. VILA R, CAÑIGUERAL S. (2006). El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en el tratamiento de vulvovaginitis. Revista de Fitoterapia.

España: Disponible en: http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF6-2_melaleuca.pdf

44. WORLD HEALTH ORGANIZATION-ANTIMICROBIAL RESISTANCE (2002). Fact sheet N°194. Disponible en: [ww.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html)

ENLACES DE INTERNET

45. <http://candidalbicans.blogspot.com/>
46. <http://hongos-alergenicicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
47. <http://lunavital.com/index.php/articulos/terapias/74-la-fitoterapia>
48. <http://medicinaunp2008.blogspot.com/2008/09/fuentes-de-cultura-popular-y-medicina.html>
49. <http://www.briconatur.com/briconaturblog/category/briconatur-2/>

ANEXOS

FOTO 01: Cortezas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela”



FOTO 02, 03, 04, 05 y 06: Extracción del aceite esencial de la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” por el método de destilación por arrastre de vapor.





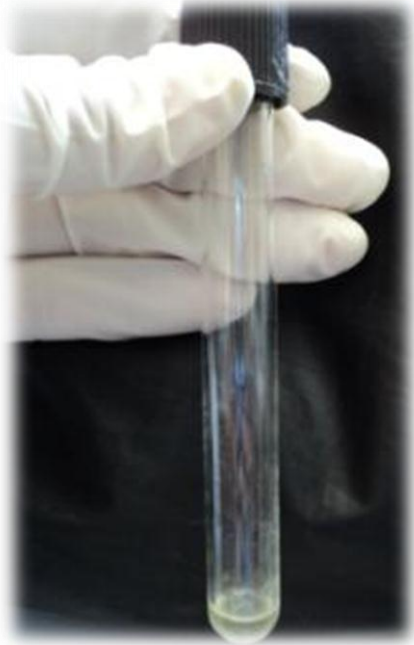


FOTO 07 y 08: Cepa bacteriana en estudio *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430 proporcionada por el MINSATACNA.



FOTO 09, 10 y 11: Activación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella* Tiphya



ESQUEMA 01: Técnica Kirby Bauer

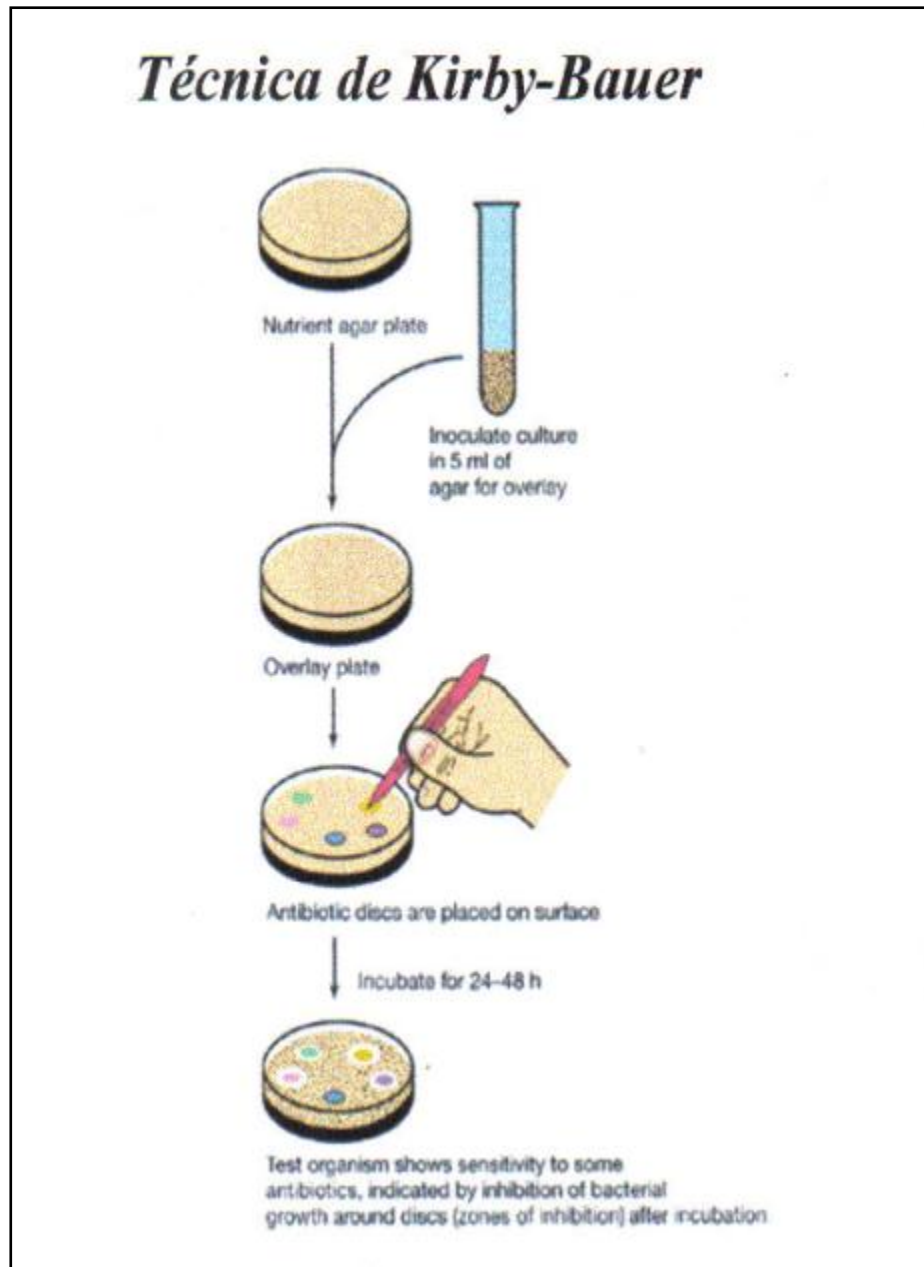


FOTO 12, 13, 14, 15, 16 y 17: Preparación de discos en medio Muller Hinton

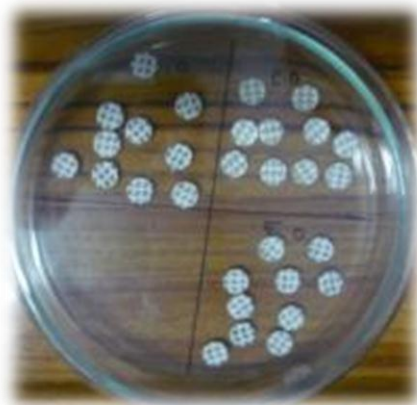
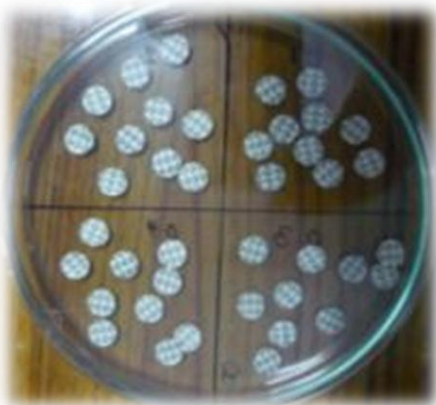




FOTO 18, 19, 20 y 21: Sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al aceite esencial puro de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn "canela"



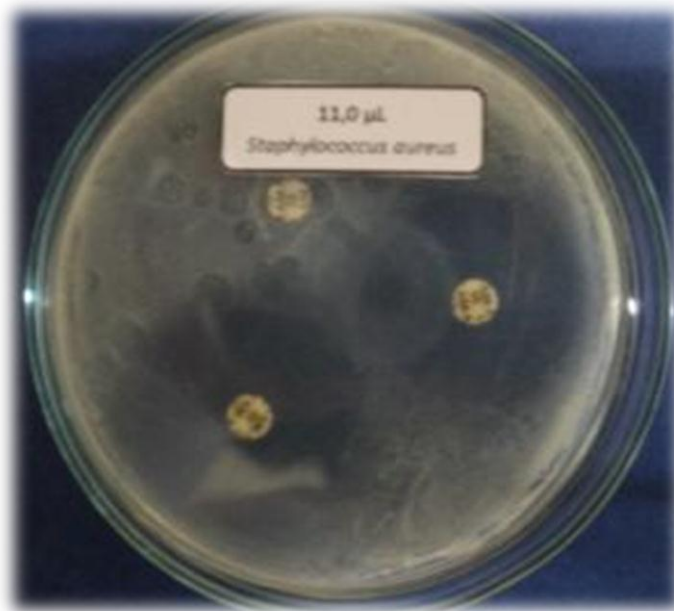
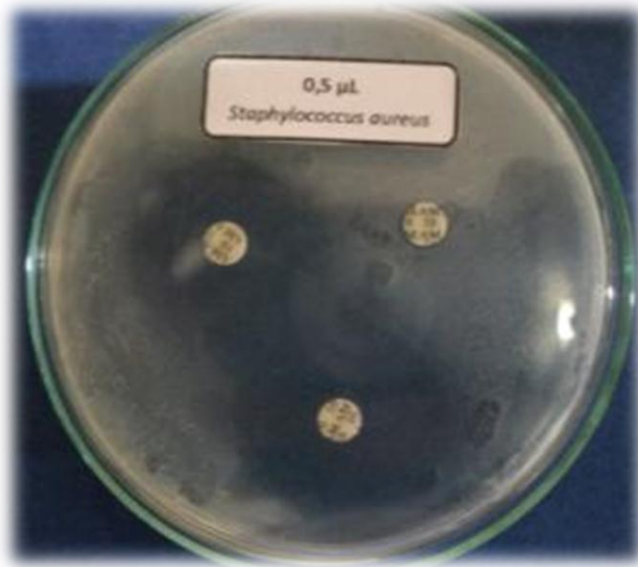
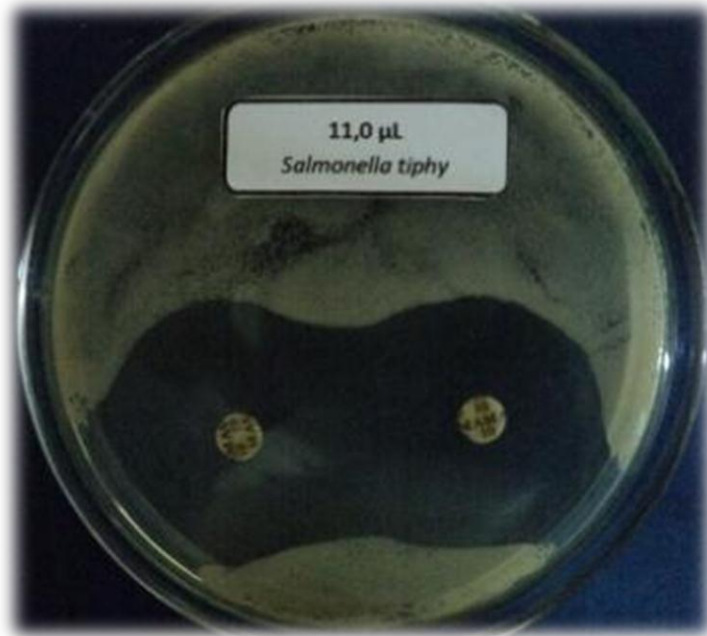


FOTO 22, 23 y 24: Sensibilidad de *Salmonella typhi* ATCC 19430 frente al aceite esencial puro de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela"





ESQUEMA 02: Técnica de susceptibilidad en caldo de dilución

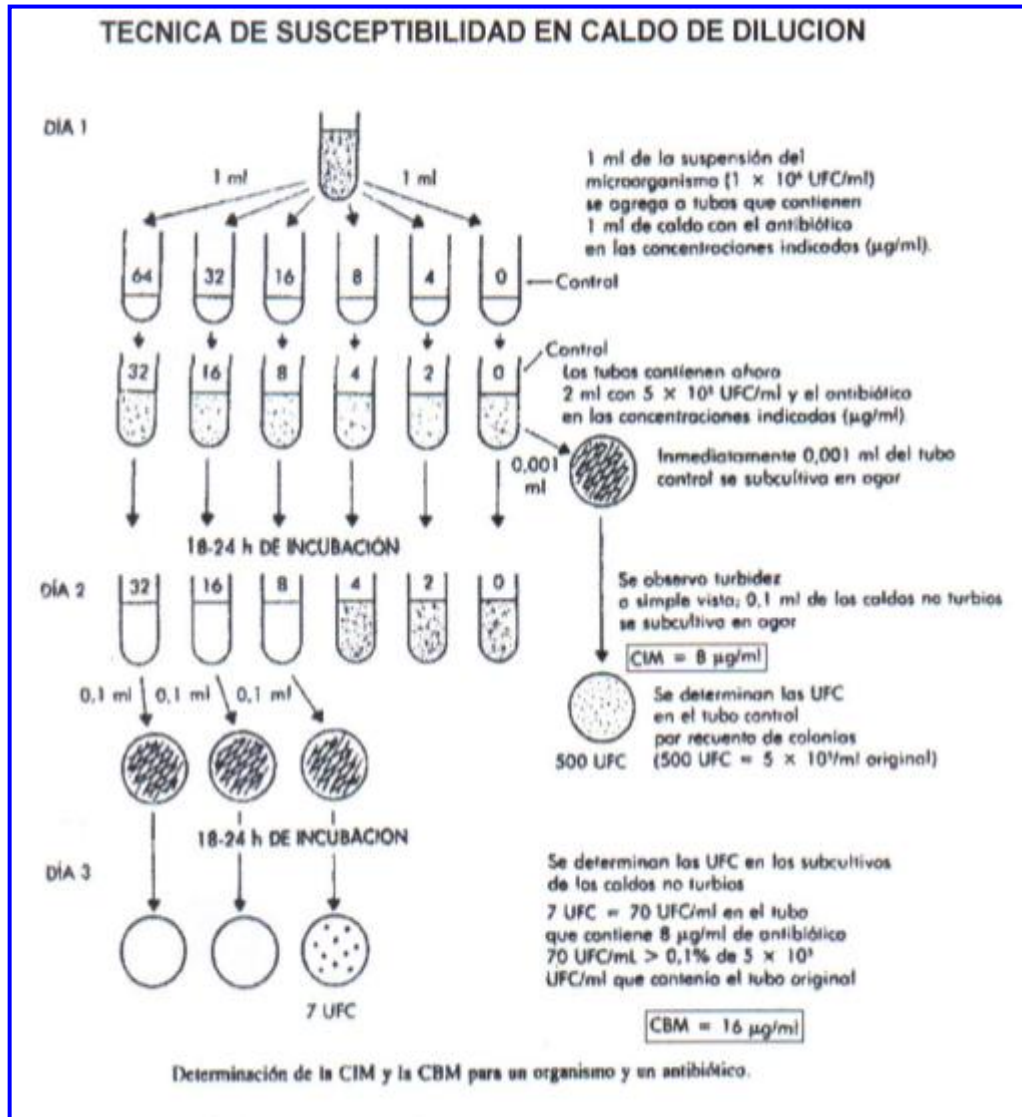


FOTO 25 y 26: Concentración Mínima Inhibitoria de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”

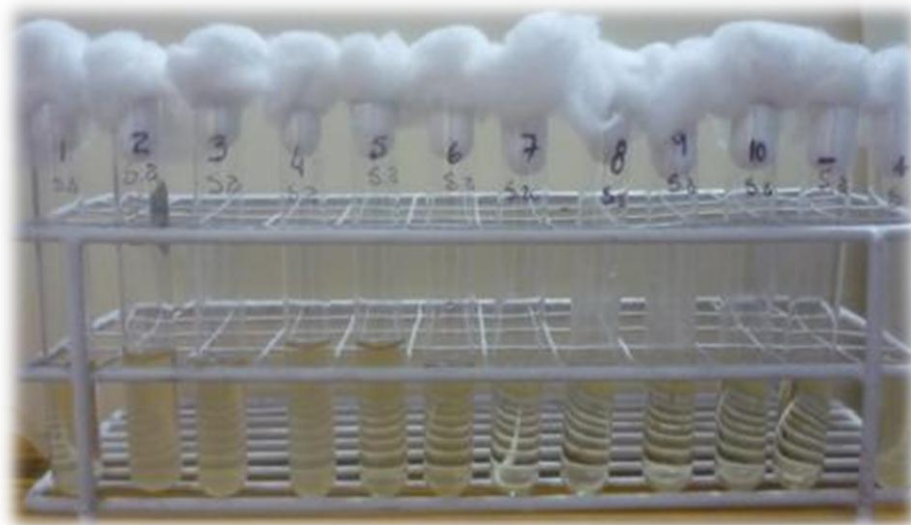
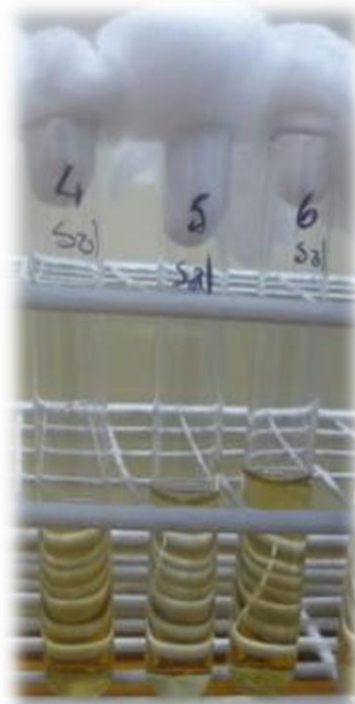
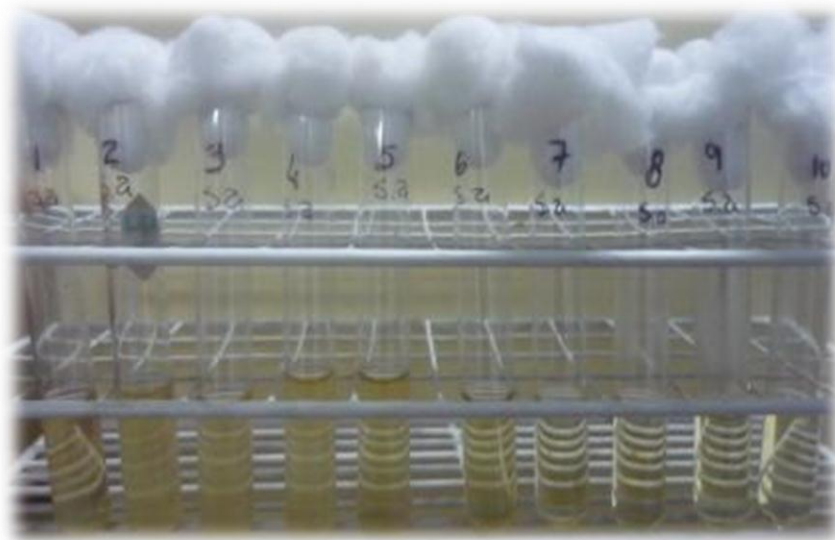


FOTO 27 y 28: Concentración Mínima Inhibitoria de *Salmonella typhi* ATCC 19430 frente al aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* Breyn “canela”





UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José 3/N Urusaco CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1169
laboratorioensayocontrol@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1330
AREQUIPA - PERÚ

INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA12J12.000614A



Nombre del Cliente : TANIA ARIAS CHOQUE
Dirección del Cliente : CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA
Condición del Muestreo : POR EL CLIENTE
Descripción : ACEITE ESENCIAL DE CANELA
Envase : Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
Peso de Muestra : 4,5 mL
Fecha de Recepción : 10/09/13
Fecha de Emisión de informe : 25/09/13
Paginas : Página 1 de 3

I. ANALISIS FISICO QUIMICO

ANALISIS	RESULTADO
Determinación cualitativa de metabolitos secundarios Cromatografía Gaseosa con detección de masas	<ul style="list-style-type: none"> • Alpha. – pinene • Linalool, methyl ether • Cinnamaldehyde, (E)- • Thymol • Eugenol • Caryophyllene • 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate
Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%) Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)	<ul style="list-style-type: none"> • Alpha. – pinene (1,52%) • Linalool, methyl ether (3,18%) • Cinnamaldehyde, (E)- (70,79%) • Thymol (1,86%) • Eugenol (4,87%) • Caryophyllene (3,42%) • 2-propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate (14,36%)



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umachillo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 ☎ +51 94 251210 ANEXO 1188
E2 laboratorioensayo@ucsm.edu.pe | Htp://www.ucsm.edu.pe | Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA12J12.000614A

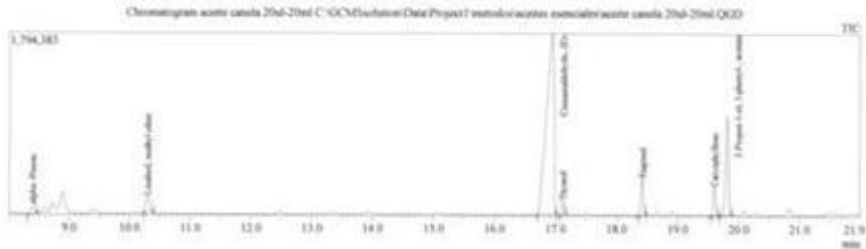
Nombre del Cliente	: TANIA ARIAS CHOQUE
Dirección del Cliente	: CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CANELA
Envase	: Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
Peso de Muestra	: 4,5 mL
Fecha de Recepción	: 10/09/13
Fecha de Emisión de informe	: 25/09/13
Paginas	: Pagina 2 de 3

I. ANEXO

CROMATOGRAMA

Sample Information

Analyzed by	Adrian
Analyzed	16/10/2012 10:22:58 a.m.
Sample Type	Standard
Level #	1
Sample Name	aceite canela 20ul-20ul
Sample ID	aceite canela 20ul-20ul
IS Aliquot	(1)-1
Sample Amount	1
Dilution Factor	1
Vial #	1
Injection Volume	1.00
Data File	C:\GCM\Software\Data\Project1\metodos\aceite esencial\aceite canela 20ul-20ul QGD
Orig. Data File	C:\GCM\Software\Data\Project1\metodos\aceite esencial\aceite canela 20ul-20ul QGD
Method File	C:\GCM\Software\Data\Project1\metodos\aceite esencial\aceite canela 20ul-20ul QGD
Orig. Method File	C:\GCM\Software\Data\Project1\metodos\aceite esencial\aceite canela 20ul-20ul QGD
Report File	C:\GCM\Software\System\Temp\30092011_28-09-2012.qpr
Timing File	C:\GCM\Software\System\Temp\30092011_28-09-2012.qpr
[Comment]	
16/10/12	
Modified by	Adrian
Modified	16/10/2012 10:44:09 a.m.



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. Bar. José S/N Umaccillo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
 ✉ laboratorioensayocsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO

N° DE INFORME: ANA12J12.000614A

Nombre del Cliente	: TANIA ARIAS CHOQUE
Dirección del Cliente	: CIUDAD NUEVA COMITÉ 38 MZNA 162 LOTE 2 - TACNA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CANELA
Envase	: Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
Peso de Muestra	: 4,5 mL
Fecha de Recepción	: 10/09/13
Fecha de Emisión de informe	: 25/09/13
Paginas	: Pagina 3 de 3

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC				A/H	Mark	Name
				Area	Area%	Height	Height%			
1	8.793	8.710	8.465	328171	1.52	68266	1.82	4.81	MI	alpha-Pinene
2	16.301	16.240	16.400	687406	3.18	159931	4.25	4.30	MI	Linalool, methyl ether
3	16.958	16.705	17.015	15288644	70.79	1779127	47.31	8.59	MI	Cinnamylaldehyde, (E)-
4	17.126	17.055	17.165	400995	1.86	136751	3.64	2.93	MI	Thymol
5	18.426	18.355	18.490	1050785	4.87	364544	9.69	2.88	MI	Eugenol
6	19.610	19.550	19.675	739602	3.42	276743	7.36	2.67	MI	Caryophyllene
7	19.816	19.683	19.890	3102560	14.36	975037	25.93	3.18	MI	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-, acetate

[Handwritten Signature]
 Q.F. Juan Ramirez Orellana
 CQFA 052
 DIRECTOR TECNICO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad