

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de  
hojas de *Aloysia triphylla* P. "Cedrón" frente a *Escherichia coli*  
ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923

TESIS

Presentada por:

Bach. Patricia Alexandra Aliaga Mamani

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN"

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

Tesis N° 196

TITULO PROFESIONAL DE:  
BIOLOGO MICROBIOLOGO

La secretaría Académica Administrativa de la Facultad de Ciencias, certifica que el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la Tesis "Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. "Cedrón" frente a *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923".

El mismo que estuvo conformado por:

**Presidente** : MSc. Roberto Castellanos Cabrera  
**Secretario** : Mgr. Isabel Ancco Oliva  
**Vocal** : MSc. Angela Veronica Choque Miranda

Para examinar y calificar la Tesis sustentada en acto Público el día 17 de Julio del Año 2013. Presentada por el Bachiller: Patricia Alexandra Aliaga Mamani de la Escuela Académica Profesional de Biología - Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador en forma individual y secreta emitieron su calificación sobre la tesis expuesta, aprobando por UNANIMIDAD con el calificativo de BUENO y promedio de 15/20 de conformidad con el artículo 18 y 20 del reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Para ratificar lo detallado firman:

\_\_\_\_\_  
MSc. Roberto Castellanos Cabrera  
PRESIDENTE

\_\_\_\_\_  
Mgr. Isabel Ancco Oliva  
SECRETARIO

\_\_\_\_\_  
MSc. Angela Choque Miranda  
VOCAL

## **DEDICATORIA**

*A mis padres Eva y Atilio, por ayudarme a seguir adelante.*

*Por su comprensión e infinito amor, gracias por enseñarme  
desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas.*

*Mi triunfo es el de ustedes, ¡los amo!*

*A mi hijo Sebastián, la luz de mi vida, estrella de mi cielo,  
desde que llegaste a mi vida llenaste mi mundo de magia y*

*de sueños. Gracias hijo, por prestarme el tiempo*

*que te pertenecía para terminar y motivarme*

*con tus palabritas "Te amo".*

*A mis hermanos Alex y Diego por ser grandes amigos.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*En primer lugar a Dios por darme la fuerza para seguir adelante día a día.*

*A la Facultad de Ciencias, por la posibilidad de realizar esta Tesis de grado  
en el laboratorio de Microbiología.*

*Muy especialmente al MSc. Julio César Cáceda Quiroz, por sus enseñanzas  
y por ser guía durante esta última etapa de mi carrera universitaria.*

*Al Blgo. Edwin Obando por haber aportado a este trabajo.*

*A ellos dos, gracias por transmitirme el amor a la ciencia e investigación e  
infundirnos que las cosas se consiguen con mucho esfuerzo  
y dedicación.*

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>DEL PROBLEMA</b>	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Justificación del problema	3
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Hipótesis	7
1.5. Operacionalización de variables	8
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. Antecedentes	9
2.2. Cedrón	11
2.2.1. Referentes históricos	11
2.2.2. Sinonimia	12
2.2.3. Nombres comunes	12
2.2.4. Botánica	12
2.2.5. Origen y extensión	13
2.2.6. Uso etnomedicinal	13
2.3. Aceites esenciales	13
2.3.1. Concepto	13

2.3.2. Composición química general de los AE	15
2.3.3. Propiedades físico-químicas de los AE	17
2.3.4. Propiedades biológicas de los AE	18
2.3.4.1. Actividad antioxidante	19
2.3.4.2. Actividad antimicrobiana de los AE	19
2.3.5. Aplicaciones de los aceites esenciales	20
2.3.6. Mercado mundial de los aceites esenciales	22
2.4. Composición química del AE de <i>Aloysia triphylla</i>	23
2.4.1. Citral	24
2.4.2. Limoneno	25
2.4.3. Otros componentes	26
2.5. Métodos de extracción de aceites esenciales	27
2.5.1. Extracción por extrusión	27
2.5.2. Hidrodestilación	28
2.5.3. Destilación por arrastre con vapor	28
2.5.4. Hidrodestilación asistida por radiación de microondas	29
2.6. Pared celular bacteriana	30
2.6.1. Pared celular de bacterias gramnegativas	30
2.6.2. Pared celular de bacterias grampositivas	32
2.7. <i>Escherichia coli</i>	34
2.7.1. Caracterización morfológica y bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	35
2.7.2. Estructura antigénica de <i>Escherichia coli</i>	36
2.7.3. Patogenicidad por <i>Escherichia coli</i>	37
2.7.3.1. Infecciones intestinales	37
2.7.3.2. Infecciones hospitalarias	37
2.7.3.3. Infección urinaria	38
2.7.3.4. Meningitis neonatal	38

2.7.3.5. Bacteriemias	39
2.7.3.6. Septicemia	39
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.8.1. Caracterización morfológica y bioquímica de <i>S. aureus</i>	41
2.8.2. Estructura antigénica de <i>S. aureus</i>	42
2.8.3. Patogenicidad por <i>S. aureus</i>	43
2.8.3.1. Intoxicación alimentaria	43
2.8.3.2. Síndrome del shock tóxico (SST)	44
2.8.3.3. Síndrome de la piel escaldada	44
2.8.3.4. Neumonía	44
2.9. Actividad antimicrobiana	45
2.9.1. Sensibilidad antimicrobiana por método de disco difusión	45
2.9.2. Sensibilidad antimicrobiana por método de dilución en medio líquido	46
2.9.3. Sensibilidad antimicrobiana por método de difusión en agar	46

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Lugar de estudios	47
3.2. Tipo de estudio	47
3.3 Unidades de estudio	47
3.3.1. Biológico	47
3.3.2. Microbiano	47
3.4. Material de laboratorio	48
3.4.1. Materiales de vidrio	48
3.4.2. Equipos	48
3.4.3. Medios de cultivo	49

3.4.4. Reactivos	49
3.4.5. Otros materiales	49
3.5. Diseño experimental	50
3.6. Análisis estadístico	50
3.7. Metodología	51
3.7.1. Materia prima	51
3.7.1.1. Naturaleza de la materia prima	51
3.7.1.2. Características de la materia prima	51
3.7.1.3 Secado	52
3.7.2 Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor	52
3.7.3. Obtención y preparación de cepas bacterianas	55
3.7.3.1 Cepas bacterianas	55
3.7.3.2. Activación de cepas	55
3.7.3.3. Estandarización del inóculo	56
3.7.4. Determinación de sensibilidad antibacteriana por el método de disco difusión	57
3.7.4.1. Preparación del medio para la prueba de sensibilidad	57
3.7.4.2. Inoculación bacteriana para disco difusión	57
3.7.4.3. Aplicación de los discos en las placas inoculadas	58
3.7.4.4. Incubación	59
3.7.4.5. Lectura de las placas	60
3.7.5. Determinación de sensibilidad antimicrobiana por el método de dilución en medio líquido	61
3.7.5.1. Preparación de la solución madre	61
3.7.5.2. Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62

3.7.5.3. Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64
3.7.5.4 Inoculación bacteriana para CMI	66
3.7.5.5. Incubación	66
3.7.5.6. Lectura de los tubos	66
3.7.6. Determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar (CMB)	67
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESULTADOS</b>	69
<b>CAPITULO V</b>	
<b>DISCUSIÓN</b>	91
<b>CONCLUSIONES</b>	98
<b>RECOMENDACIONES</b>	100
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	101
<b>ANEXOS</b>	114

## INDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro N° 01.-</b> Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales	16
<b>Cuadro N° 02.-</b> Principales áreas de aplicación de los AE	21
<b>Cuadro N° 03.-</b> Ranking de aceites esenciales exportados por el Perú - año 2007	22
<b>Cuadro N° 04.-</b> Concentraciones del aceite esencial de cedrón en discos de sensibilidad	59
<b>Cuadro N° 05.-</b> Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	63
<b>Cuadro N° 06.-</b> Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	65
<b>Cuadro N° 07.-</b> Evaluación antimicrobiana <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> P. “cedrón” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	70
<b>Cuadro N° 08.-</b> Determinación del grado de sensibilidad de <i>E. coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones del AE de hojas de <i>Aloysia triphylla</i> , P. “cedrón” según pautas de Duraffourd y Lapraz (1983)	72
<b>Cuadro N° 09.-</b> Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> “cedrón” a través de la variación de tamaños de halos de inhibición frente a <i>E. coli</i>	74
<b>Cuadro N° 10.-</b> Comparación múltiple de Tukey de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> P. “cedrón” frente <i>E. coli</i> ATCC 25922	75
<b>Cuadro N° 11.-</b> CMI y CMB producido por la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del AE de hojas de <i>Aloysia triphylla</i> “cedrón” frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922.	77

- Cuadro N° 12.-** Evaluación antimicrobiana *in vitro* del AE de *A. triphylla* “cedrón” frente a *S. aureus* ATCC 25923 por el método de disco difusión. 79
- Cuadro N° 13.-** Determinación del grado de sensibilidad de *S. aureus* ATCC 25923 a diferentes concentraciones del AE de hojas de *Aloysia triphylla* “cedrón” según pautas de Duraffourd y Lapraz (1983) 81
- Cuadro N° 14.-** Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del AE de hojas de *A. triphylla* “cedrón” a través de la variación de tamaños de halo de inhibición frente a *S. aureus* ATCC 25923 82
- Cuadro N° 15.-** Comparación múltiple de Tukey de la actividad antibacteriana del AE de hojas de *A. triphylla* “cedrón” frente a *S. aureus* ATCC 25923... 84
- Cuadro N° 16.-** CMI y CMB producido por la actividad antibacteriana *in vitro* del AE de hojas de *A. triphylla* “cedrón” frente a *S. aureus* ATCC 25923. 86
- Cuadro N° 17.-** Comparación de la actividad antibacteriana del AE de hojas de *A. triphylla*, “cedrón” frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, por el método de disco difusión. 88
- Cuadro N° 18.-** Comparación de la actividad antibacteriana del AE de hojas de *Aloysia triphylla*, “cedrón” frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, por el método de dilución en medio líquido y difusión en agar. 89

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura N° 01.-</b> Isómeros geométricos del citral: geranial y neral.	24
<b>Figura N° 02.-</b> Isómeros ópticos del limoneno.	26
<b>Figura N° 03.-</b> Clasificación de las bacterias de acuerdo a la tinción Gram.	30
<b>Figura N° 04.-</b> Diferencia estructural entre las bacterias Gram positivas y gramnegativas.	33

## INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
<b>GRÁFICO 01.-</b> Promedio de diámetros de halo de inhibición Vs. concentraciones del AE de hojas de <i>A. triphylla</i> “cedrón” frente a <i>E. coli</i> ATTC 25922.	71
<b>GRÁFICO 02.-</b> Gráfico de Medias e intervalos HSD de Tukey al 95,0%	76
<b>GRÁFICO 03.-</b> CMB producido por la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del AE de hojas de <i>Aloysia triphylla</i> , “cedrón” frente a <i>E. coli</i> ATTC 25922.	78
<b>GRÁFICO 04.-</b> Promedio de Diámetros de halo de inhibición Vs. concentraciones del AE de hojas de <i>A. triphylla</i> “cedrón” frente a <i>S. aureus</i> ATTC 25923.	80
<b>GRÁFICO 05.-</b> Gráfico de Medias e intervalos HSD de Tukey al 95,0%	85
<b>GRÁFICO 06.-</b> CMB producido por la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del AE de hojas de <i>Aloysia triphylla</i> “cedrón” frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	87

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo N° 01.-</b> Partes del cedrón	115
<b>Anexo N° 02.-</b> Variación de la composición química del AE de <i>A. triphylla</i> , cultivada en diferentes partes del mundo	116
<b>Anexo N° 03.-</b> Equipo de extracción por arrastre de vapor	117
<b>Anexo N° 04.-</b> División de fases: el aceite esencial y agua	118
<b>Anexo N° 05.-</b> Cepas bacterianas: a) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y b) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	118
<b>Anexo N° 06.-</b> Activación de cepas bacterianas en Caldo BHI	119
<b>Anexo N° 07.-</b> Activación de cepas bacterianas en agar Müeller Hinton	119
<b>Anexo N° 08.-</b> Aplicación de aceite esencial de cedrón en discos de papel filtro	120
<b>Anexo N° 09.-</b> Susceptibilidad antimicrobiana <i>E. coli</i> ATCC 25922 frente al aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> , por el método de disco difusión	121
<b>Anexo N° 10.-</b> Susceptibilidad antimicrobiana <i>S. aureus</i> ATCC 25923 frente al aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> , por el método de disco difusión	123
<b>Anexo N° 11.-</b> Control negativo de Agar Müeller Hinton	125
<b>Anexo N° 12.-</b> Control positivo de cultivos bacterianos en Agar Müeller Hinton	126

<b>Anexo N° 13.-</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922	127
<b>Anexo N° 14.-</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923	128
<b>Anexo N° 15.-</b> Concentración Mínima Bactericida (CBM) del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922	129
<b>Anexo N° 16.-</b> Concentración Mínima Bactericida (CBM) del aceite esencial de hojas de <i>A. triphylla</i> frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923	130
<b>Anexo N° 17.-</b> Características organolépticas y físico-químicas del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> P.	131
<b>Anexo N° 18.-</b> Densidad del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> P.	131
<b>Anexo N° 19.-</b> Concentración del aceite esencial de <i>A. triphylla</i> , P.	132
<b>Anexo N° 20.-</b> Identificación taxonómica de <i>A. triphylla</i> P.	133
<b>Anexo N° 21.-</b> Análisis de cromatografía gaseosa del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> P.	134

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla P.*** “cedrón” de la región de Tacna (distrito de Tarata), frente a las bacterias patógenas ***Escherichia coli ATCC 25922*** y ***Staphylococcus aureus ATCC 25923***.

Para la obtención del aceite esencial de ***Aloysia triphylla P.*** “cedrón”, se utilizó la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, la cual nos permitió obtener buen rendimiento de aceite.

Se determinó la sensibilidad antibacteriana de ***Escherichia coli ATCC 25922*** y ***Staphylococcus aureus ATCC 25923*** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla P.***, “cedrón” por el método de disco difusión, por el método de dilución en medio líquido y difusión en agar.

Los resultados indican que el aceite esencial de ***Aloysia triphylla P.*** “cedrón”, contiene actividad antibacteriana significativa frente a ***Escherichia coli ATCC 25922*** y moderada frente a ***Staphylococcus aureus ATCC 25923***. Así, el estudio reveló la Concentración Mínima

Inhibitoria de ***Escherichia coli* ATCC 25922** siendo de 3,701 mg/mL mientras que para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue 15,167 mg/mL (dosis cinco veces mayor). También se precisó la Concentración Mínima Bactericida de ***Escherichia coli* ATCC 25922** siendo de 4,186 mg/mL, mientras que para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue 16,259 mg/mL (dosis cuatro veces mayor).

Palabras claves: Sensibilidad antibacteriana, CMI, CMB, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## I. INTRODUCCION

Las plantas han sido siempre una fuente indispensable para la obtención de productos beneficiosos en la historia de la humanidad (Bandoni y cols., 2000). Las antiguas civilizaciones usaron las especies vegetales tanto para fines alimenticios, como en medicina y cosmética. En ese sentido, algunos de los productos con mayor relevancia histórica son las especias aromáticas, sus esencias y fragancias figuran en escritos tan memorables como el Génesis de la Biblia (RVR, 1960), que hace referencia de mercaderes madianitas que comercializaban aromas, bálsamo y mirra, posiblemente su peso en oro o plata; también, los egipcios, mesopotámicos, hindúes y chinos tenían vastos conocimientos sobre la extracción y uso de las esencias con las que fabricaban pomadas, bálsamos mortuorios e infusiones. Incluso, el médico griego Hipócrates recomendaba masajes con aceites esenciales (Díaz, 2007).

En la actualidad, se ha revalorado el campo de aplicación de las plantas y especias aromáticas, en farmacología y biotecnología; la investigación científica le abre un nuevo espacio a los aceites esenciales,

evaluando su efecto antibacteriano, antimicótico e insecticida, por medio de pruebas *in vitro* y evaluaciones en tejidos vivos.

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, muchas de sus especies vegetales pueden ser aprovechadas de forma sostenible por la industria, una clara alternativa es *Aloysia triphylla* P., conocida popularmente como “cedrón”, un árbol con aplicaciones medicinales y propiedades nematocidas, antibacterianas y antifúngicas demostradas (Díaz y cols., 2007; Zygaldó y cols., 1999; Bellakhdar, 1993; Ozek y cols., 1996; Ohno y cols., 2003; Sánchez y cols., 2010).

El objetivo general de este trabajo, fue evaluar las propiedades antibacteriana del aceite esencial de las hojas de cedrón de la región de Tacna (distrito de Tarata). Los objetivos específicos fueron, extraer el aceite esencial de la materia prima por el método de arrastre con vapor de agua; determinar la sensibilidad antibacteriana por el método de disco difusión, determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de enfermedades; éstas últimas llamadas plantas medicinales eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose sus virtudes de generación en generación; nadie buscaba el saber por qué o como actuaban, pero era un hecho incontestable y que parecía mágico.

De acuerdo a la nueva tendencia en la investigación de explorar las propiedades proporcionadas por la flora de nuestro país, se ha venido buscando opciones que permitan encontrar nuevas alternativas que favorezcan la acción frente a las diversas bacterias que han venido desarrollando resistencia a los antibióticos como mecanismo de defensa propio y que por lo tanto hace que crezca la dificultad para su tratamiento; por ello que la investigación científica le abre un nuevo espacio a los aceites esenciales, evaluando su efecto anti-antibacteriano, antimicótico e insecticida, por medio de pruebas *in vitro* y evaluaciones en tejidos vivos.

El “Cedrón” es una planta que refiere diversos usos en la medicina popular, la ingesta por vía oral de la infusión o decocción de las partes aéreas de esta planta se utiliza como antiespasmódico, tranquilizante,

calmante nervioso, expectorante y estomacal. Estudios científicos han demostrado la presencia de importantes componentes terpenoides (citrinal y limoneno) en la planta, que le conferirían su potente acción antimicrobiana.

Es por ello, el interés de conocer la actividad curativa de esta planta. Por lo tanto, el presente estudio plantea evaluar las propiedades antibacterianas del aceite esencial de cedrón frente a bacterias patógenas de importancia comunitaria y hospitalaria, para ello se plantea la siguiente pregunta:

¿Poseerá actividad antibacteriana *in vitro* el aceite esencial de las hojas de ***Aloysia triphylla P.***, “cedrón” frente a ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**?

## 1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la región de Tacna existen especies de plantas con propiedades medicinales que no han sido estudiadas por completo; con el fin de generar conocimiento en cuanto a las posibles propiedades terapéuticas se ha seleccionado a la especie vegetal *Aloysia triphylla* P. conocida popularmente como “cedrón” ya que especies de su misma familia y género han sido estudiadas preliminarmente por tener principios activos bactericidas y fungicidas.

Este trabajo se basa en evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P., “cedrón”, para demostrar la capacidad inhibitoria que ejerce esta sustancia frente a las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, para formar parte del desarrollo científico de la sociedad; estudiar microbiológicamente las propiedades terapéuticas de las plantas propias de la región de Tacna ya que resulta imprescindible descubrir nuevas sustancias con actividad antibiótica frente a microorganismos resistentes y con alta capacidad infectiva, aumentando la calidad de vida del hombre.

### 1.3. OBJETIVOS

#### 1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla P.***, “cedrón” frente a ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**.

#### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer el aceite esencial de las hojas de ***Aloysia triphylla P.***, “cedrón” por método de arrastre con vapor de agua.
- Precisar la sensibilidad antibacteriana *in vitro* de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla P.***, “cedrón” por el método de disco difusión.

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla* P.**, “cedrón” por el método de dilución en medio líquido.
  
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla* P.**, “cedrón” por el método de difusión en agar.

#### 1.4. HIPOTESIS

De acuerdo al problema planteado, es que presento a continuación la siguiente hipótesis:

El aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla* P.**, “cedrón” tienen actividad antibacteriana *in vitro* frente a ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**.

## 1.5. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

- Variable Independiente: Aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla P.*, “cedrón”.
- Variables Dependiente: Actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## 1.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

VARIABLES	INDICADORES	TECNICA	UNIDAD
Variable independiente	Concentración	Disco Difusión	Halo de inhibición (mm)
Variable dependiente	Crecimiento	N.C.C.L.S. (*)	Turbidez
			UFC/mL

(\*) N.C.C.L.S.: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. ANTECEDENTES

Díaz y cols. (2007) en un estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla* en tres regiones de Colombia, reconoció la presencia de geranial (17-25%), neral (14-20%) y limoneno (6-10%) como compuestos principales, seguidos por sesquiterpenos oxigenados como el espatulenol (4-10%) y óxido de cariofileno (2-7%), variando en proporción de acuerdo con su lugar de origen.

Zygaldo y cols. (1999), reconoció como compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Aloysia triphylla* en Argentina, la mircenona y  $\alpha$ -tujona, mientras que Duschatzky y col., (2004) encontraron la  $\alpha$ -tujona y el *cis*-carveol como componentes principales. Posteriormente, Oliva y cols., (2010) encontró que el aceite esencial de hojas, presentaba como componentes predominantes a los compuestos geranial (20-28%), neral (16-20%) y limoneno (12-18%).

En Marruecos, Bellakhdar (1993) identificó al 1,8-cineol (12%) o eucaliptol, como uno de los componentes principales del aceite esencial, y en poca cantidad al citral: geranial (10%) y neral (7%). En Turquía, Ozek y cols., (1996) reconoció como componentes mayoritarios del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* al limoneno (18,6%) y geranial (11,9%).

Ohno y cols. (2003), estudió el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* de Colombia, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Reportando el efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* a 4,375 mg/ml de AE, con halo de 9,05 mm y sobre *Staphylococcus aureus* a 100 mg/ml de AE de con halo de 20 mm, por el método de difusión en disco.

Sánchez y cols. (2010), estudió el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite esencial mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus*, observándose que a mayor volumen se presenta un mayor halo de inhibición, esto debido a que la mayor cantidad de aceite puede difundirse en una mayor área sobre la superficie del agar.

## 2.2. CEDRÓN

### 2.2.1. REFERENTES HISTÓRICOS

El cedrón es originario de América de Sur. Su nombre “Aloysia” es en honor a María Luisa de Parma (1754-1819), reina de España por su matrimonio con Carlos IV, y “triphylla” (tres hojas) por el número de hojas de cada verticilo.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenáceas

Género: Aloysia

Especie: ***Aloysia triphylla P.***

Fuente: Pensiero y col., 2002.

### 2.2.2. SINONIMIA

La especie vegetal ***Aloysia triphylla P.*** es también conocida como: *Lippia citriodora* (Ort. ex Pers.), *Aloysia citriodora* Ort. ex Pers., *Verbena triphylla* L'Hérit, *Lippia triphylla* (L'Hérit) Kunze, *Aloysia sleumeri* Mold (Muñoz, 2002).

### 2.2.3. NOMBRES COMUNES

En América algunos nombres comunes de ***Aloysia triphylla P.*** son: cedrón, cidrón, verbena olorosa, verbena citronela, verbena de tres hojas, verbena de olor, hierba cidrera, hierba de las tres hojas, hierba de la primavera, Reina Luisa. En España: hierba Luisa, hierba de la princesa (Muñoz, 2002).

### 2.2.4. BOTÁNICA

El “cedrón” es una planta arbustiva, que puede alcanzar una altura hasta 2,00 m. Sus tallos son largos leñosos y angulosos cuando son jóvenes y cilíndricos cuando son adultos, presenta ramas secundarias en la parte superior (Fernández, 2008).

Las hojas son simples, rugosas, reunidas en verticilos de tres, raro cuatro, su limbo, entero o un poco dentado, de color verde claro,

presenta una nervadura mediana, saliente en la cara inferior, de la cual se destaca una serie de nervaduras secundarias paralelas, que se reúnen para formar una especie de cordón paralelo al borde foliar (Fernández, 2008).

Las flores son pequeñas, con la corola ensanchada superiormente y bilabiada, blancas por fuera y azul violáceo por dentro, y se ubican al extremo de los tallos en espigas agrupadas en panojas. Las flores se encuentran en el extremo de los tallos agrupadas en panojas (Fernández, 2008).

El fruto es una drupa, que encierra dos granos que a veces no llegan a la madurez (Fernández, 2008).

#### **2.2.5. ORIGEN Y EXTENSIÓN**

El “cedrón” es una planta nativa de Sudamérica, crece de forma silvestre en los países andinos, principalmente en Colombia y Argentina. Se extiende a Perú, Chile, Bolivia, Brasil (Río Grande del Sur), Paraguay, Uruguay y México desde donde los conquistadores la introdujeron a Europa en el siglo XVII. En Europa puede cultivarse en regiones templadas (Pomilio y col., 1985).

### 2.2.6. USO ETNOMEDICINAL

El “cedrón” es una de las plantas medicinales más populares en el país. La decocción o infusión de sus hojas y tallos se usa preferentemente para el tratamiento de afecciones gastrointestinales como deatonía digestiva, espasmos gastrointestinales, dispepsias, meteorismos, gastritis, vómitos, inapetencias, dismenorreas, digestiones pesadas y dolores de estómago; como calmante el sistema nervioso (ansiedad, insomnio) y en los resfriados febriles (Pensiero y col., 2002).

## 2.3. ACEITES ESENCIALES

### 2.3.1. CONCEPTO

Los **aceites esenciales** son mezclas complejas de componentes volátiles, que resultan del metabolismo secundario de plantas; están compuestos por hidrocarburos del grupo de los terpenos, y por compuestos oxigenados de bajo peso molecular como los son los alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres y ácidos, éstos son los que le dan a los aceites esenciales el aroma que los caracteriza (Díaz, 2007).

Los **aceites esenciales** se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las plantas; por ejemplo, se biosintetizan en los tricomas glandulares (hojas) o en glándulas (cáscaras), en las plantas se pueden ubicar en general, en pelos glandulares del tallo y hojas (menta, lavanda, salvia), en las células modificadas del parénquima como en las piperáceas (pimienta), en tubos oleíferos (canela), en tubos esquizógenos (anís, hinojo), o canales lisígenos (pino), entre otros (Díaz, 2007; Vargas y Bottia, 2008).

### **2.3.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA GENERAL DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los metabolitos secundarios volátiles que componen los aceites esenciales se pueden clasificar en base a los grupos funcionales que contienen sus moléculas, como se muestra en el cuadro N° 01.

**Cuadro N° 01:** Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales.

GRUPO FUNCIONAL	NATURALEZA QUIMICA	EJEMPLO
<b>HIDROCARBUROS</b>	Terpénicos	Limoneno, $\alpha$ -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, p-cimeno
	Sesquiterpénicos	trans- $\beta$ -Cariofileno
<b>ALDEHÍDOS</b>	Monoterpénicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, octadenal
	Aromáticos	Cinamaldehido
<b>ALCOHOLES</b>	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-Decanol
	Sesquiterpénicos	Espatuleno, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
<b>FENOLES</b>	Aromáticos	Timol, carvacrol

Fuente: Díaz, 2007.

### **2.3.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano, pero siempre pronunciados y penetrantes, que nos recuerdan el olor del vegetal del que provienen. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. Tienen sabor cáustico, acre e irritante y a veces aromático, dulce y delicado (Cerpa, 2007; Albarracín y Gallo, 2003; Bandoni, 2000).

Según 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 más espesos, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Tienen

propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena (Albarracín y Gallo, 2003; Cerpa, 2007).

Los aceites esenciales no son inocuos mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Y son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) de E.E.U.U. (Cerpa, 2007).

#### **2.3.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Desde la antigüedad, las especies aromáticas y sus aceites esenciales se han empleado en preparaciones culinarias no sólo como agentes saborizantes y aromatizantes, sino también como conservantes naturales en alimentos y en otros productos, donde los aceites esenciales pueden detener, prevenir o inhibir el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros microorganismos. De esta manera, y debido a la creciente presión de los consumidores, actualmente las industrias de alimentos y cosméticos han disminuido el uso de conservantes sintéticos en sus productos, reemplazándolos por sustancias de origen natural (Vargas y Bottia, 2008).

#### **2.3.4.1. Actividad antioxidante**

En muchos estudios sobre especies vegetales se ha aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos lo cual los coloca en la categoría de los antioxidantes más interesantes y promisorios, en general flavonoides. Estos antioxidantes son sustancias importantes en el área de farmacología, principalmente por su capacidad de contrarrestar la formación de radicales, cuya influencia se ve reflejada en las propiedades que poseen, así como antivirales, antialérgicas, anti-inflamatorias, antimicrobianas, etc. (Díaz, 2007).

Cabe resaltar que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las plantas aromáticas depende de su estructura y, particularmente, del número y la posición el grupo hidroxilo (Díaz, 2007).

#### **2.3.4.2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales**

Desde hace más de tres décadas se ha descrito a los antimicrobianos de origen natural, como agentes de gran capacidad biodegradable y de efectos secundarios menores,

en comparación a los antimicrobianos comúnmente comercializados (Dikshit y col., 1986) Así por ejemplo, se ha comprobado la aplicación aceite esencial de árbol de té constituye una alternativa eficaz para el control en postcosecha de *Penicillium italicum* en naranjas (Sánchez y col., 2007). También, el aceite esencial de jengibre puede ejercer una acción antimicrobiana sobre el *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Vásquez y col., 2001). Y el aceite esencial de la “hierba de limón” (*Cymbopogon citratus*) mostró una notable actividad antifúngica frente a *Trichophyton rubrum* (Guerra y col., 2004).

Para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos. Existen dos técnicas básicas usadas, el método de difusión en agar y el método de diluciones (Vargas y Bottia, 2008).

#### **2.3.5. APLICACIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales tienen un amplio rango de aplicación en la industria. Los aceites pueden ser empleados como materia

prima en diferentes tipos de industria en general, cosmética, alimenticia, bebidas, textil, etc.; mientras que en otras industrias, como la farmacéutica, se pueden usar productos aislados de las mismas esencias (Díaz, 2007).

**Cuadro N° 02:** Principales áreas de aplicación de los AE.

<b>INDUSTRIAS</b>	<b>APLICACIONES</b>
<b>Farmacéutica</b>	Medicina: Antibacteriales, antifúngicos, analgésicos, descongestionantes y aromaterapia.
	Veterinaria: Fármacos.
<b>Productos industriales</b>	Crayones, tinta, etiquetas, papeles.
	Cauchos, plásticos y tapicería.
	Agroquímicos: Bioinsecticidas.
<b>Industrias de aromas y sabores</b>	Alimentos y bebidas: Saborizantes, perseverantes, confitería, salsas, condimentos y bebidas.
	Industria del tabaco: Saborizantes y fijadores.
<b>Cuidado personal</b>	Cosméticos y aseo personal: Perfumes, colonias, cremas, jabones, desodorantes y shampoos.
	Productos dentales: Pasta dental, enjuague bucal y antisépticos.

Fuente: Vargas y Bottia, 2008; Díaz, 2007.

### 2.3.6. MERCADO MUNDIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Estados Unidos es el principal mercado de las exportaciones de aceites esenciales. El registro de compras en el año 2007 fue por US\$ 463,69 millones, de los cuales el 24% es decir US\$ 111,29 millones provenían de Sudamérica (Veritrade L.T.D., 2007).

**Cuadro N° 03:** Ranking de AE exportados por el Perú - año 2007.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	US\$ FOB Total	Kg netos
Aceite esencial destilado del limón	12 146 623,70	480 806,92
Aceite esencial de molle	25 164,86	168,60
Aceite esencial de arrayan	11 545,33	44,03
Esencia de menta natural para golosinas	8 133,98	181,40
Aceite esencial de cedrón	<b>7 693,38</b>	<b>11,96</b>
Aceites esenciales muña, hinojo, molle,..	6 040,00	13,00
Esencia limón california	3 500,00	100,00
Esencia de vainilla	3 314,92	1 520,11
Sentiva Suave Bar (barra facial)	2 319,49	264,98
Aceite esencial de jojoba	1 811,70	79,10
Aceite esencial de naranja	1 522,50	150,00
Esencia de aceites aromáticos	365,20	85,64
Aceite/resina de copaiba	330,00	20,00
<b>Total General (Kg.)</b>	<b>12 218 392,46</b>	<b>483 451,98</b>

Fuente: Veritrade L.T.D., 2007.

Como lo muestra el cuadro N° 03, en el año 2007, Perú exportó una cantidad total de 483 451,98 kg netos de aceites esenciales por el valor de 12 218 392,46 US\$ FOB total, teniendo como principales destinos a los Estados Unidos, al Reino Unido y a Los Países Bajos. Se puede apreciar que el quinto lugar en exportaciones peruanas de esencias, lo ocupa el aceite esencial de cedrón, con un valor de US\$ 7 693,38 FOB total registrado por cada 11,96 kg netos de aceite esencial, para el año 2007 (Veritrade L.T.D., 2007).

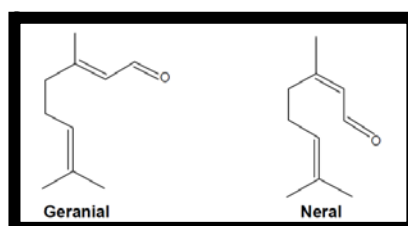
#### **2.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla***

Si bien la composición química del cedrón es compleja y varía en función del órgano o parte de la planta estudiados, múltiples estudios reflejan que la variabilidad se puede atribuir en gran medida a factores intrínsecos de quimiotipo (estado de desarrollo fenológico de la especie, parte de la planta estudiada, etc.), y a factores de naturaleza extrínseca (condiciones climáticas, labores culturales, tratamiento de postcosecha, etc.) además de los métodos y condiciones de extracción usados (Zeng Yueqin, 2006; Vargas y Bottia, 2008).

En el Anexo N° 02, se muestra un cuadro de los principales componentes encontrados por Stashenko, 2003; Santos-Gómez, 2005; Figueredo, 2004; Lamaison y col., 1993; Ozek y col., 1996; Zygadlo y col., 1994; Duschatzky, 2004; Bellakhdar y col., 1993; Vogel y Silva, 1999; Argyropoulou y col. 2007, en muestras de aceite esencial de cedrón de Colombia, Portugal, Brasil, Francia, Turquía, Argentina, Marruecos, Chile y Grecia; en dicho resumen se puede notar que los compuestos citral (geranial y neral) y limoneno son los más comunes, estos mismos se describirán a continuación.

#### 2.4.1. CITRAL

El citral es una mezcla de dos aldehídos monoterpénicos isoméricos, geranial y neral. El isómero trans- se conoce como geranial o citral A, (*E*)- 3,7-dimetil-2,6- octadienal y el isómero cis- se conoce como neral o citral B, (*Z*)- 3,7- dimetil-2,6-octadienal (Figura N° 01).



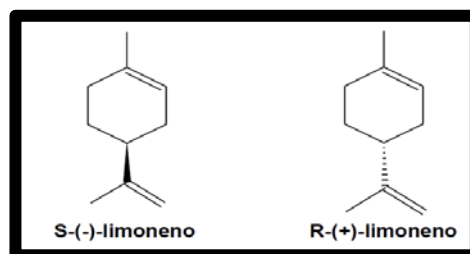
**Figura N° 01.** Isómeros geométricos del citral: geranial y neral.

El citral es el componente mayoritario del AE de *Aloysia triphylla* (38-40%), se caracteriza por un fuerte olor a limón; su sensibilidad a la exposición de la luz, calor, oxígeno y pH bajos y altos, provoca, con el paso del tiempo, un aumento en la densidad del AE (Rodríguez, 2003; Masuda, 2002). Este compuesto, es materia prima para la síntesis de iononas, vitaminas A y E, así como un ingrediente importante en la industria de alimentos y perfumes (Masuda, 2002; Ijima, 2006).

Este compuesto, además de su aroma característico, tiene propiedad de ser: antibacterial, antihistamínico, fungicida, expectorante y anticancerígeno (Masuda, 2002; Ijima, 2006).

#### 2.4.2. LIMONENO

El limoneno es el otro componente abundante en el AE de *Aloysia triphylla* (7-11%), es un monoterpeno de fórmula  $C_{10}H_{16}$ , presenta dos isómeros ópticos, el R-(+)-limoneno y el S-(-)-limoneno (Figura N° 02). Tiene una gran importancia en la industria, se emplea en la producción de *p-cimeno*, como disolvente de resinas, pigmentos, tintas, en la fabricación de adhesivos y en la obtención de carvona (Rodríguez, 2003; Masuda, 2002).



**Figura N° 02.** Isómeros ópticos del limoneno.

Este compuesto tiene propiedades antibacterianas, anticancerígenas, antiespasmódicas y expectorantes (Masuda, 2002; Iijima, 2006).

#### 2.4.3. OTROS COMPONENTES

Los siguientes son componentes presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, que muestran actividad biológica:

- ✓ **Linalol** : antibacterial.
- ✓ **Canfeno** : antioxidante.
- ✓  **$\alpha$ -Terpineol** : antibacterial.
- ✓ ***trans*- $\beta$ -Cariofileno**: antibacterial.

## **2.5. MÉTODOS DE EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES**

Son muy variados y diferentes los métodos utilizados para la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos; a continuación se describen por orden de complejidad sólo los métodos de mayor difusión en el mundo, los más usados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas.

### **2.5.1. EXTRACCIÓN POR EXTRUSIÓN**

La extrusión es un método simple por medio del cual es posible obtener un aceite esencial de características muy cercanas al producto natural, porque no se realizan tratamientos térmicos. Sin embargo, esta técnica sólo es aplicable a materiales vegetales que contienen la esencia en grandes cantidades en las células superficiales, por lo general el pericarpio de los frutos cítricos. Este proceso puede ser efectuado manualmente (prensa) o por medios mecánicos “cold pressing” e involucra la perforación de las glándulas aceiteras en el pericarpio del fruto, la extrusión mecánica y el lavado con agua. El producto como emulsión agua-aceite es impuro debido a la presencia de sustancias proteicas y mucilaginosas, lo que implica una posterior centrifugación (Marín y Ordoñez, 2008; Vargas y Bottia, 2008).

### **2.5.2. HIDRODESTILACIÓN**

En la hidrodestilación el material vegetal se sumerge en el agua, se lleva a ebullición para que penetre los tejidos de la planta y disuelva una parte del aceite esencial contenido en las estructuras, la disolución acuosa se difunde a través de las membranas de las células, y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. El proceso continúa hasta remover todo el aceite contenido en las glándulas de la planta, a fin de que los vapores puedan ser condensados y colectados. Es necesario evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del material vegetal, entonces se requiere de tiempos de calentamiento largos y adición de agua en grandes cantidades, lo cual incrementa el costo y el tiempo de operación (Marín y Ordoñez, 2008; Vargas y Bottia, 2008).

### **2.5.3. DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR**

Es el método más usado a nivel industrial, permite obtener aceite esencial con buenos rendimientos, y además se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Aquí, la materia prima vegetal (molido, cortado, entero) es cargada de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno y próximo a su base (Cerpa, 2007).

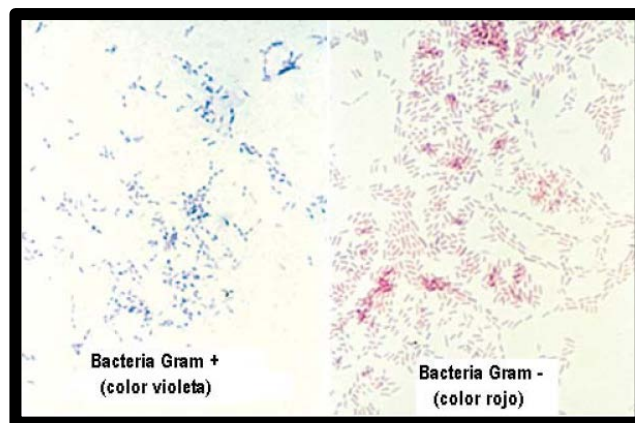
Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia vegetal se calienta y va liberando el aceite esencial, el cual debido a su alta volatilidad se evapora y al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador mediante una prolongación curvada del conducto de salida del destilador. En el condensador, la mezcla es enfriada hasta la temperatura ambiental, a su salida, se obtiene una **emulsión agua - aceite**, la cual es separada en un decantador o florentino debido a la diferencia de densidades (Cerpa, 2007).

#### **2.5.4. HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN DE MICROONDAS**

En este método, el material vegetal se sumerge al agua (aproximadamente una tercera parte del material) en un equipo de destilación tipo “Clevenger” y se somete a la acción de la radiación de microondas. Los aceites esenciales conseguidos se encuentran libres de los productos de combustión y de otros contaminantes, lo que favorece especialmente a la obtención de las esencias de interés en la perfumería (Vargas y Bottia, 2008).

## 2.6. PARED CELULAR BACTERIANA

Las paredes celulares de las bacterias permiten resistir a la presión de turgencia; consecuencia de la concentración de solutos disueltos dentro de la célula, además son las responsables de la forma y rigidez de la célula. Las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares, permite distinguir a las bacterias en gram positivas (Gram+) o gram negativas (Gram-) mediante una tinción diferencial denominada tinción de Gram (Gram, 1884).



**Figura 03.** Clasificación de las bacterias de acuerdo a la tinción Gram.

### 2.6.1. PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas son más complejas debido a que presentan tres capas principales: la membrana citoplasmática, el peptidoglicano y la capa externa o capa L (Lipopolisacárido).

a) **La membrana citoplasmática**, que rodea el citoplasma de la célula y contiene proteínas y fosfolípidos. La membrana citoplasmática sirve como una barrera de permeabilidad selectiva para las sustancias que entran o salen de la célula, también se considera el sitio donde se produce la energía de la célula. Dentro del citoplasma celular también se encuentran los cromosomas, ribosomas y otras estructuras internas.

b) **El peptidoglicano**, es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina entrelazados; esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular, y es responsable de mantener la forma del organismo, y está localizada dentro del espacio periplásmico. El espacio periplásmico, localizado entre la membrana externa y la membrana citoplasmática contiene proteínas periplásmicas que incluyen: proteínas de enlace para sustratos específicos, enzimas hidrolíticas y enzimas detoxificantes.

c) **La capa externa o capa L (Lipopolisacárido)**, representa una segunda bicapa lipídica; sin embargo, hay que destacar que no consta solamente de fosfolípidos como la membrana citoplasmática, sino que contiene polisacáridos y proteínas, lo que justifica su

nombre. También sirve como una barrera de permeabilidad de la célula, ya que ayuda a retener proteínas en el espacio periplasmático. Contiene proteínas embebidas, llamadas porinas, estos canales llenos de agua facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos. Los polisacáridos; localizados en la superficie de la célula, son los componentes esenciales de las endotoxinas (estos contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad), y son la causa de la carga neta de las bacterias Gram negativas.

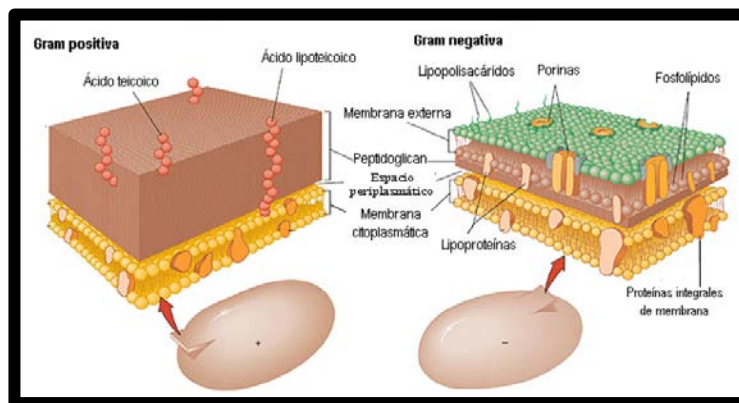
#### 2.6.2. PARED CELULAR DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Por otro lado, las bacterias Gram positivas son menos complejas debido a que únicamente contienen dos capas: la membrana citoplasmática y la capa de peptidoglicano.

a) **La membrana citoplasmática**, el citoplasma, y otros componentes internos son similares tanto en bacterias Gram positivas como en bacterias Gram negativas.

b) **La capa de peptidoglicano** es mucho más gruesa que la de las bacterias Gram negativas, y es la responsable de mantener la forma

del organismo; por lo que se conoce como la pared celular. Dentro de la capa de mureína se encuentran los ácidos teicoicos, que son polímeros que están entrelazados en la capa de péptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células Gram positivas. Estos son también antígenos importantes de superficie en aquellos organismos que los poseen.



**Figura 04.** Diferencia estructural entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. A la izquierda: pared celular de bacterias Gram positivas (Gram+), derecha: pared celular de bacterias Gram negativas (Gram-).

## 2.7. *Escherichia coli*

*E. coli* es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos de microbiología y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas tanto en pacientes con inmunidad conservada como en inmunodeprimidos y son causantes de diferentes tipos de infecciones tanto de adquisición en la comunidad como nosocomiales (Hernández y col., 2003).

Dominio: Bacteria o Eubacteria

Filo: Proteobacteria

Clase:  $\gamma$ -Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

**Fuente:** Manual de Bergey's. 2005.

### 2.7.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (**gram negativo**), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Hernández y col., 2003).

Su pared celular es del tipo didermo y está constituida por la membrana citoplasmática, una capa fina de peptidoglicano, entre ambas se encuentra el espacio periplásmico o periplasma, por encima se sitúa la membrana citoplasmática externa constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como el lipopolisacárido (LPS), lipoproteínas y porinas (Mandell y col., 2005).

*E. coli* produce reacciones positivas para el rojo de metilo, indol, lisina descarboxilasa, fermenta el manitol y produce gas a partir de la glucosa (Mandell y col., 2005).

Se trata de un enterobacteria catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, siendo negativa la reacción de ureasa y fenilalanina desaminasa (Mandell y col., 2005).

### 2.7.2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *Escherichia coli*

La estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos:

a) **Antígeno O (somática)**, son cadenas de polisacárido procedente del LPS capsular que están presentes en todas las bacterias gram negativas, son resistentes al calor y alcohol, generalmente se detecta mediante aglutinación bacteriana (Mandell y col., 2005).

b) **Antígenos H (flagelar)**, se localiza sobre los flagelos y se desnaturalizan o retiran mediante calor o alcohol, se aglutinan con anticuerpos H, principalmente IgG. Los determinantes de los antígenos H son una función de secuencia de aminoácidos en la proteína flagelar (flagelina) (Mandell y col., 2005).

c) **Antígenos K (capsular)**, presentes en cepas con cápsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, son un factor de virulencia fundamental porque impide la fagocitosis (Mandell y col., 2005).

### **2.7.3. PATOGENICIDAD POR *Escherichia coli***

Posee numerosos factores de virulencia que no están presentes en todas las cepas. Así la mayoría de las cepas solo son capaces de producir infecciones en inmunodeprimidos, mientras que otras tienen factores específicos de virulencia (Prieto-Fraile, 1997).

#### **2.7.3.1. Infecciones intestinales**

Diferentes tipos de *E. coli* causan distintos tipos de infecciones intestinales. Aunque el papel de *E. coli* como causante de diarreas infantiles se conoce desde hace muchos años, hasta hace poco no se ha identificado su papel como responsable en muchas ocasiones de la llamada diarrea de viajero (Jawetz y col, 2002).

#### **2.7.3.2. Infecciones hospitalarias**

En pacientes hospitalizados *E. coli* puede colonizar el tracto respiratorio y la piel de los enfermos, al igual que otras enterobacterias o microorganismos ambientales. Esta colonización puede ser el origen de neumonías (por aspiración de secreciones respiratorias contaminadas), infecciones de

heridas quirúrgicas, etc. En algunos casos, desde un foco de infección puede pasar a la sangre y originar bacteriemia y sepsis (Prieto - Fraile, 1997).

#### 2.7.3.3. **Infección urinaria**

La causa más frecuente de infección urinaria es *E. coli* (cistitis, pielonefritis). La mayoría de las infecciones urinarias no complicadas (que no evolucionan a pielonefritis ni sepsis) causadas por *E. coli* ocurren en mujeres jóvenes, se debe a la penetración en la vejiga de las bacterias que colonizan la región periuretral (Prieto-Fraile, 1997).

#### 2.7.3.4. **Meningitis neonatal**

*Escherichia coli* y estreptococos del grupo B son las principales causas de meningitis en los lactantes. Casi el 75% de *E. coli* proceden de casos de meningitis posee el antígeno K1, el cual muestra reacción cruzada con el polisacárido capsular del grupo B de la meningitidis (Jawetz y col., 2002).

#### 2.7.3.5. **Bacteriemias**

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia se aísla de hemocultivos, sobre todo en enfermedades con infección nosocomial. Estas bacteriemias pueden dar lugar – como todas las bacteriemias por gram negativos – a sepsis, y en último extremo a shock séptico desencadenando por la acción tóxica de la endotoxina o lipopolisacáridos capsular (Prieto-Fraile, 1997).

#### 2.7.3.6. **Septicemia**

Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, *E. coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia. Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por *E. coli* debido a que carecen de anticuerpos IgM. La septicemia también puede presentarse como consecuencia de infección del aparato urinario (Jawetz y cols. 2002).

## 2.8. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana, pudiendo estar colonizada por esta bacteria entre el 30 y el 50% de la población, siendo la localización más frecuente la colonización nasal. La frecuencia de colonización es más frecuente en el medio hospitalario, especialmente en pacientes sometidos a hemodiálisis, diabéticos tipo I, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados por el VIH y en adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) (Wenzel, 1998).

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Micrococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *Staphylococcus aureus*

**Fuente:** Manual de Bergey's. 2005.

### 2.8.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Staphylococcus aureus*

Es un coco que reacciona positivamente a la tinción de Gram (**gram positivo**), aerobios y anaerobios facultativos, tienden a agruparse en forma de racimos, inmóviles, no forman esporas y generalmente no están capsulados (Dan, 2010).

Su pared celular es del tipo monodermo y está constituida por la membrana citoplasmática y la capa de peptidoglicano; componente que le confiere la resistencia y tolerancia osmótica; asociado a los ácidos teicoicos (Bannerman, 2003).

Su característica bioquímica es la fermentación de azúcares, entre los que destaca el manitol, para producir ácido láctico, lo que le diferencia de los demás estafilococos. *S. aureus* producen catalasa y es resistente a altas concentraciones de sal, por lo que el medio Chapman (agar manitol salado) es útil para su aislamiento e identificación (García y Picazo, 2000).

En agar pueden formar colonias de color dorado, debido a la producción de carotenoides durante su crecimiento, y pueden ser  $\beta$ -hemolíticas (Pumarola, 1995).

### 2.8.2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *Staphylococcus aureus*

La capacidad antigénica más importante radica en la pared celular, donde se localiza el peptidoglicano asociado a los ácidos teicoicos.

a) **El polisacárido A**, es un antígeno específico de la especie, constituido por ácidos teicoicos y polímeros de fosfato de robitol. El determinante antigénico está unido al peptidoglicano e induce la aparición de anticuerpos (García y Picazo, 2000).

b) **La proteína A**, se caracteriza por unirse a la región Fc de las cadenas H de las IgG, provocando diversos efectos biológicos como es la actividad antifagocítica, anticomplementaria y de hipersensibilidad (García y Picazo, 2000).

c) **El factor de agregación** (clumping factor) es una proteína asociada a la pared celular que posee la capacidad de unirse al

fibrinógeno, es la parte fija de la coagulasa y es fácilmente detectable en pocos segundos (García y Picazo, 2000).

d) Algunas cepas poseen una capa de polisacáridos externa llamada “slime” o cápsula mucosa, que confiere una mayor adherencia a sustancias orgánicas e inorgánicas, y un mayor efecto antifagocitario (García y Picazo, 2000).

### **2.8.3. PATOGENICIDAD POR *Staphylococcus aureus***

Los mecanismos de defensa del huésped, el tamaño, y la virulencia de la dosis infecciosa determinan la probabilidad del desarrollo de una infección estafilocócica (Mins y col., 1995).

#### **2.8.3.1. Intoxicación alimentaria**

La contaminación de alimentos por *S. aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de casos) y diarrea (77% de casos). El corto período de incubación de 1-6 horas orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más enterotoxinas de *S. aureus* (Dinges y col., 2000).

#### **2.8.3.2. Síndrome del shock tóxico (SST)**

Esta infección sistémica es causada por cepas de *S. aureus* que producen la toxina del síndrome de shock tóxico. Existen septicemia y toxemia y las manifestaciones cutáneas incluyen un exantema seguido por descamación cutánea, sobre todo en las palmas de las manos y las plantas de los pies (Mins y col., 1995).

#### **2.8.3.3. Síndrome de la piel escaldada**

Comprende un espectro de enfermedades dermatológicas con una etiología común, la toxina exfoliativa estafilocócica; dermatitis exfoliativa generalizada (enfermedad de Ritter, necrosis epidérmica), impétigo ampollar, escarlatina estafilocócica. Afecta sobre todo a neonatos y niños menores de 4 años (Mins y col., 1995).

#### **2.8.3.4. Neumonía**

Es una enfermedad importante por su alta tasa de mortalidad. Se observa en pacientes con defensa deterioradas (quimioterapia anticancerosa, hospitalizados tratados con

antimicrobianos, fibrosis quística). La necrosis, con formación de múltiples abscesos, es característica de esta infección (Mins y *col.* 1995).

## **2.9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

Actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de población bacteriana o para eliminarla, se puede expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro* (Thaweboon, 2009).

Las pruebas *in vitro*, proporcionan un resultado cuantitativo de la concentración de agente antimicrobiano, necesaria para inhibir el desarrollo de un organismo dado, entre las que se encuentran:

### **2.9.1. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN (NCCLS, 2000)**

La determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por difusión o método de Kirby Bauer, se basa en la aplicación de discos que tiene una cantidad específica de antimicrobiano sobre la superficie de agar inoculado con un microorganismo; produciendo una zona de inhibición por difusión, en la cual una concentración crítica de

antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano, la zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI (Andrews, 2001).

### **2.9.2. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MÉTODO DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO (NCCLS, 2000)**

La determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por dilución, consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones y observar el crecimiento de los microorganismos para definir la Concentración Mínima Inhibitoria (Andrews, 2001).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en  $\mu\text{g/ml}$  (Andrews, 2001).

### **2.9.3. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR (NCCLS, 2000)**

La Concentración Mínima Bactericida (CBM) es la menor concentración de un antibiótico que reduce al 0,1% o menos el número de bacterias del inóculo original, reduciéndolo en un 99,9% (Giunta, 1976).

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. LUGAR DE ESTUDIOS

Las pruebas y ensayos se realizaron en los laboratorios de Microbiología General y Química Analítica, pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

### 3.2. TIPO DE ESTUDIO

De tipo experimental prospectivo de corte longitudinal.

### 3.3. UNIDADES DE ESTUDIO

#### 3.3.1. BIOLÓGICO

- Aceite esencial de las hojas de *Aloysia triphylla* P., “cedrón”.

#### 3.3.2. MICROBIANO

- Las cepas bacterianas usadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **3.4. MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **3.4.1. MATERIALES DE VIDRIO**

- Asa de drigalski
- Balones de vidrio de 100, 250, 500 ml.
- Matraces de 100 y 250 ml.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Placas petri de 10 x 150 mm
- Probetas de 25 y 50 ml
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm y 15 x 150 mm
- Vasos de precipitación de 250 y 500 ml

#### **3.4.2. EQUIPOS**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Estufa de cultivo a 35°C
- Mechero Bunsen
- Micro pipetas de rango de 5-10 µl, 20-200 µl y 100-1000 µl
- Refrigerador

- Equipo de Destilación por arrastre de vapor
- Contador de colonias

#### 3.4.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Nutritivo
- Agar Müeller Hinton
- Caldo Müeller Hinton
- Caldo Cerebro Infusión Corazón (BHI)

#### 3.4.4. REACTIVOS

- Alcohol etílico de 96°
- Agua destilada
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

#### 3.4.5. OTROS MATERIALES

- Discos de papel filtro
- Espátula
- Gradillas
- Pinzas estériles
- Vernier

### 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar debido a que éste es un diseño útil para métodos y técnicas del laboratorio.

Se aplicó ocho **concentraciones de aceite esencial** (tratamientos) cada uno con ocho repeticiones, frente a ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus***.

### 3.6. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron procesados a través del software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 20.0 para Windows.

Para el análisis estadístico se realizó el análisis de varianza (**ANDEVA**), usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 y 0,01; y para establecer las diferencias entre los tratamientos se utilizó prueba de **Tukey** a un nivel de significación de 0,05.

## **3.7. METODOLOGIA**

### **3.7.1. MATERIA PRIMA**

#### **3.7.1.1. Naturaleza de la materia prima**

Las muestras vegetales para este estudio estuvieron conformadas por las hojas frescas del cedrón (*Aloysia triphylla*).

Se recolectaron hojas frescas de cedrón durante su época de floración entre los meses de noviembre del 2012 a febrero del 2013 pertenecientes al distrito de Tarata (sector de andenería de “Chacawira”) en la Provincia de Tarata. Se recolectó 5 kilogramos aproximadamente de materia prima, entre tallos, hojas y flores (Anexo N° 01).

#### **3.7.1.2. Características de la materia prima**

En este trabajo se empleó como materia prima solamente a las hojas del cedrón, debido a que es la parte de la planta más usada en la medicina tradicional. Por esta razón, luego de la recolección se realizó una selección de las hojas que

no se encontraban con signos de haber sido dañadas por insectos u hongos o racimos infestados por plagas.

#### **3.7.1.3. Secado**

Se limpiaron de impurezas de las hojas de cedrón para la conservación de los componentes del vegetal y de esta manera se evitó la proliferación de microorganismos. Se dejó secar por un tiempo de 2 semanas, a condiciones atmosféricas normales: temperatura ambiental en rango de 11,1 – 27,9 °C, humedad relativa de 66 – 84%, y presión atmosférica de 948,4 – 954,1 mb (SENAMHI-Tacna, 2012), y bajo sombra (para evitar que la exposición constante de los rayos solares produzca la modificación de los aceites contenidos).

#### **3.7.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR ARRASTRE DE VAPOR** (Lock de Ugaz, 1994)

Antes de iniciar el proceso se verificó el correcto armado del equipo de extracción (Anexo N° 03), el cual estuvo compuesto por una caldera, un contenedor de la materia prima (alambique), un

condensador de vidrio tipo serpentín, un colector de líquidos dispuesto inmediatamente a la salida del condensador.

Por consiguiente, se depositó 3 000 ml de agua destilada en el generador de vapor, agua que entró en ebullición cuando alcanzó la temperatura de 96°C.

Luego 5 kg de muestra vegetal fueron colocados en el alambique, la muestra fue sometida (durante una hora) al flujo de vapor producido, así, conforme el vapor entra en contacto directo con el lecho la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido, dicho aceite debido a su alta volatilidad se evapora, y al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador.

La mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluye a través del ducto de vidrio y es dirigida hasta el serpentín interno del condensador, donde es precisamente condensada y enfriada por efecto del intercambio de calor con el agua corriente que lo circunda, dicho líquido de refrigeración es inyectado al condensador con un caudal de 0,016 l/s y sale del mismo con un caudal de 0,004 l/s.

A la salida del condensador se obtuvo una emulsión líquida inestable que fue recibida en un colector de vidrio volumétrico, donde ocurre la división de fases a causa de la diferencia de densidades, entre el agua y el aceite.

Mientras el agua descendió a la parte inferior del colector y fue expulsada (por efectos de presión y acumulación), el aceite esencial se mantiene en la cima de la acumulación de líquidos, hasta finalizado el tiempo de proceso (Anexo N° 04).

Al completar el tiempo de extracción, se detuvo el proceso y registró el volumen final del aceite esencial en mililitros, el cual fue recibido en un colector volumétrico de donde es retirado y almacenado en un frasco de vidrio color ámbar y a temperatura ambiente (Anexo N° 04).

### 3.7.3. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

#### 3.7.3.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fueron obtenidas del laboratorio de Referencia del Instituto Nacional de Salud (INS) (Anexo N° 05).

#### 3.7.3.2. Activación de cepas (García y Picazzo, 2000)

Las cepas se almacenaron a una temperatura 2 – 8 °C hasta el momento de su activación en el laboratorio. Se procedió a coger una asada bacteriana y se inoculó en un tubo con Caldo Cerebro Infusión Corazón (BHI) se dejó incubar por 24 horas a 37°C (Anexo N° 06).

Luego se sembró en agar Müeller Hinton por 24 horas a 37°C, para su posterior resembrado; de aquí en adelante las cepas bacterianas tanto *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se encontraban en actividad metabólica (cultivos jóvenes) (Anexo N° 07).

### 3.7.3.3. Estandarización del inóculo

Se seleccionó 4 – 5 colonias bien aisladas de igual morfología, tocando la parte superior de cada colonia, se procedió a inocularlas en el Caldo Cerebro Infusión Corazón (BHI). Se incubó a 37°C hasta que el tubo alcanzó la turbidez del estándar (por 2 a 6 horas).

La turbidez del inóculo se ajustó hasta el tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland por comparación visual con el estándar. Para ello, se visualizó los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Dicha suspensión contendrá aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml para *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 25923.

### **3.7.4. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL METODO DE DISCO DIFUSIÓN (NCCLS, 2000)**

#### **3.7.4.1. Preparación del medio para la prueba de sensibilidad**

Se empleó el agar Müller Hinton, dado que se considera el mejor medio para las pruebas de sensibilidad de rutina y se preparó como indica la casa comercial.

#### **3.7.4.2. Inoculación bacteriana para disco difusión**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo bacteriano y con ayuda de la micropipeta, se transfirieron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de agar Müller Hinton, con el asa Digrafsky se diseminó en la superficie para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Este procedimiento se realizó para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos.

#### **3.7.4.3. Aplicación de los discos en las placas inoculadas**

Para esta prueba se prepararon discos de papel filtro (Wathman N° 42) de aproximadamente 6 mm de diámetro, que se colocaron en un vaso pequeño con agua destilada para su esterilización en autoclave (121°C, 15 lb por 15 minutos). Luego se retiraron del agua y se los colocó en la estufa a 170 °C por 1 hora para su secado y finalmente ser usados.

Se incorporó a los discos de papel filtro, con ayuda de la micropipeta, los siguientes volúmenes: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0 µl del aceite esencial de hojas de cedrón que correspondieron a las ocho diferentes concentraciones planteadas en el diseño. Todos estos discos se embebieron en un recipiente por separado, para evitar que las sustancias difundan directamente en la placa.

Usando pinzas estériles, se procedió a colocar los discos embebidos en la superficie de las placas de Müller Hinton conteniendo el inóculo; a una distancia no menor de 25 mm entre ellos y a 1,5 cm del borde de la placa, presionándolos

firmemente sobre la superficie del agar. Se dejó secar durante una hora para su mejor impregnación (Anexo N° 08).

Se colocó un disco control que no contenía aceite esencial en cada placa para descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

**Cuadro N° 04:** Concentraciones del aceite esencial de cedrón en discos de sensibilidad.

Tratamiento	Volumen Solución Madre (µl)	Concentración (mg/mL)
T-1	2,5	2,275
T-2	5,0	4,550
T-3	7,5	6,825
T-4	10,0	9,100
T-5	12,5	11,375
T-6	15,0	13,650
T-7	17,5	15,925
T-8	20,0	18,200

Fuente: Elaboración propia.

#### 3.7.4.4. Incubación

Las placas fueron llevadas a incubar en posición invertida a 35 °C por 24 horas.

#### 3.7.4.5. Lectura de las placas

La lectura se realizó midiendo el diámetro de los halos de inhibición (en milímetros) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 alrededor del disco. La medición se hizo utilizando un vernier.

Para la interpretación de los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por Duraffourd y Lapraz (1983):

- **Resistente (-)** para un diámetro inferior o igual a 9 mm.
- **Sensibilidad límite (sensible = +)** para un diámetro entre 9 a 11 mm.
- **Sensibilidad media (muy sensible = ++)** para un diámetro comprendido entre 11 a 20 mm.
- **Sumamente sensible (sumamente sensible = +++)** para un diámetro superior o igual a 20 mm.

**3.7.5. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA  
POR EL METODO DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO  
(CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA) (NCCLS, 2000)**

**3.7.5.1. Preparación de la solución madre**

Se preparó una solución madre de 20 000  $\mu\text{l}$ ; la cual contenía 17 600  $\mu\text{l}$  de caldo Müeller Hinton, 1 600  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfóxido (DSMO) y 800  $\mu\text{l}$  de aceite esencial de cedrón.

Se determinó que en 1 ml o 1000  $\mu\text{l}$  existían 910 mg de aceite esencial de cedrón, pero en la solución madre se llevó 0,8 ml o 800  $\mu\text{l}$  de aceite esencial, en consecuencia se obtuvo lo siguiente:

$$\begin{array}{rcl} 910 \text{ mg} & \longrightarrow & 1\ 000 \mu\text{l} \\ X & \longrightarrow & 800 \mu\text{l} \end{array}$$

$$X = 728 \text{ mg/mL}$$

Esta concentración fue diluida en 20 000  $\mu\text{l}$  de solución por lo cual se consiguió una concentración de:

$$\begin{array}{lcl} 728 \text{ mg} & \longrightarrow & 20\,000 \mu\text{l} \\ X & \longrightarrow & 1\,000 \mu\text{l} \end{array}$$

$$X = 36,4 \text{ mg/mL}$$

### 3.7.5.2. Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *Escherichia coli* ATCC 25922

Se utilizó el caldo Müeller Hinton y un sistema de 11 tubos de 15 X 125 mm que contenían 3 000  $\mu\text{l}$  de solución total (entre caldo, solución madre a diferentes volúmenes y 300  $\mu\text{l}$  (10%) de *Escherichia coli* ATCC 25922) (Cuadro N° 05).

Las concentraciones se obtuvieron a partir de la solución madre de la siguiente manera:

$$\begin{array}{lcl} 36,4 \text{ mg} & \longrightarrow & 1\,000 \mu\text{l} \\ X & \longrightarrow & 185 \mu\text{l} \end{array}$$

$$X = 6,734 \text{ mg}$$

Esta concentración se diluyó en 3 000  $\mu\text{l}$  y tuvo una concentración final para el MIC de 2,245 mg/mL.

**CUADRO N° 05:** Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Escherichia coli* ATCC 25922.

<b>Trat.</b>	<b>Volumen Solución Madre (µl)</b>	<b>Caldo Mueller Hinton (µl)</b>	<b>Total del Volumen (µl)</b>	<b>Concentración inicial del aceite (mg/mL)</b>	<b>Concentración final del aceite (mg/mL)</b>
<b>T-1</b>	185	2815	3 000	6,734	2,245
<b>T-2</b>	205	2795	3 000	7,462	2,487
<b>T-3</b>	225	2775	3 000	8,190	2,730
<b>T-4</b>	245	2755	3 000	8,918	2,973
<b>T-5</b>	265	2735	3 000	9,646	3,215
<b>T-6</b>	285	2715	3 000	10,374	3,458
<b>T-7</b>	305	2695	3 000	11,102	3,701
<b>T-8</b>	325	2675	3 000	11,830	3,943
<b>T-9</b>	345	2655	3 000	12,558	4,186
<b>T-10</b>	365	2635	3 000	13,286	4,429
<b>T-11</b>	385	2615	3 000	14,014	4,671
<b>CONTROL</b>	Control (+)	CON /ACEITE ESENCIAL			Control (+)
	Control (-)	SIN /ACEITE ESENCIAL			Control (-)

Fuente: Elaboración propia

### 3.7.5.3. Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Se utilizó el caldo Müeller Hinton y un sistema de 11 tubos de 15 X 125 mm que contenían 3 000 µl de solución total (entre caldo, solución madre a diferentes volúmenes y 300 µl (10%) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Las concentraciones se obtuvieron a partir de la solución madre de la siguiente manera:

$$36,4 \text{ mg} \longrightarrow 1\ 000 \text{ µl}$$

$$X \longrightarrow 1\ 100 \text{ µl}$$

$$X = 40,040 \text{ mg}$$

Esta concentración se diluyó en 3 000 µl y tuvo una concentración final para el MIC de 13,347 mg/mL.

**CUADRO N° 06:** Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria  
(CMI) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Trat.	Volumen Solución Madre ( $\mu$ l)	Caldo Mueller Hinton ( $\mu$ l)	Total del Volumen ( $\mu$ l)	Concentración inicial del aceite (mg/mL)	Concentración final del aceite (mg/mL)
T-1	1100	1900	3 000	40,040	13,347
T-2	1130	1870	3 000	41,132	13,711
T-3	1160	1840	3 000	42,224	14,075
T-4	1190	1810	3 000	43,316	14,439
T-5	1220	1780	3 000	44,408	14,803
T-6	1250	1750	3 000	45,500	15,167
T-7	1280	1720	3 000	46,592	15,531
T-8	1310	1690	3 000	47,684	15,895
T-9	1340	1660	3 000	48,776	16,259
T-10	1370	1630	3 000	49,868	16,623
T-11	1400	1600	3 000	50,960	16,987
<b>CONTROL</b>	Control (+)	CON /ACEITE ESENCIAL			Control (+)
	Control (-)	SIN /ACEITE ESENCIAL			Control (-)

Fuente: Elaboración propia

#### **3.7.5.4. Inoculación bacteriana para CMI**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo bacteriano (tubo N° 0.5 de Mc Farland) y con ayuda de la micropipeta, se transfirieron 10 µl de la suspensión bacteriana en tubos con caldo Müller Hinton. Este procedimiento se realizó para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### **3.7.5.5. Incubación**

Los tubos fueron llevados a incubación por 24 h a 35°C.

#### **3.7.5.6. Lectura de los tubos**

Al cabo de 24 horas se observa la turbidez de los tubos que indicara desarrollo bacteriano. La concentración del aceite esencial que presente ausencia de crecimiento, es detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

### **3.7.6. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR (CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA) (NCCLS, 2000)**

Una vez obtenida la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, se procedió a la obtención de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se tomó en cuenta a los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible de las bacterias (inhibición de crecimiento). Entonces, a partir del primer tubo que no presentó crecimiento, se procedió a inocular 100 µl de esta suspensión en placas con agar Mueller Hinton debidamente rotuladas con la concentración correspondiente.

Se consideró usar una placa control negativo, con agar Mueller Hinton, sin inóculo y sin aceite esencial.

Las placas se dejaron secar por 5 minutos para luego incubarlas en posición invertida durante 24 horas a 35°C.

En la lectura se evidenció el poder bactericida del aceite esencial de cedrón frente a los microorganismos en estudio, ya que fue capaz de eliminar completamente su crecimiento *in vitro*.

## IV. RESULTADOS

Los ensayos en laboratorio permitieron evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de las hojas de cedrón. Para ello se aplicó el método de sensibilidad antibacteriana por disco difusión de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite esencial de cedrón con ocho repeticiones para las diferentes concentraciones.

La CMI de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite esencial de hojas de cedrón se determinaron por el método de sensibilidad antibacteriana por dilución en medio líquido. La CMB de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite esencial de hojas de cedrón se determinaron por el método de sensibilidad antibacteriana por difusión en agar.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas han sido agrupados en Cuadros y Gráficos para una mejor interpretación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que éste es un diseño útil para métodos y técnicas de laboratorio.

**CUADRO N° 07:** Evaluación antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *Escherichia coli* ATTC 25922 por el método de disco difusión.

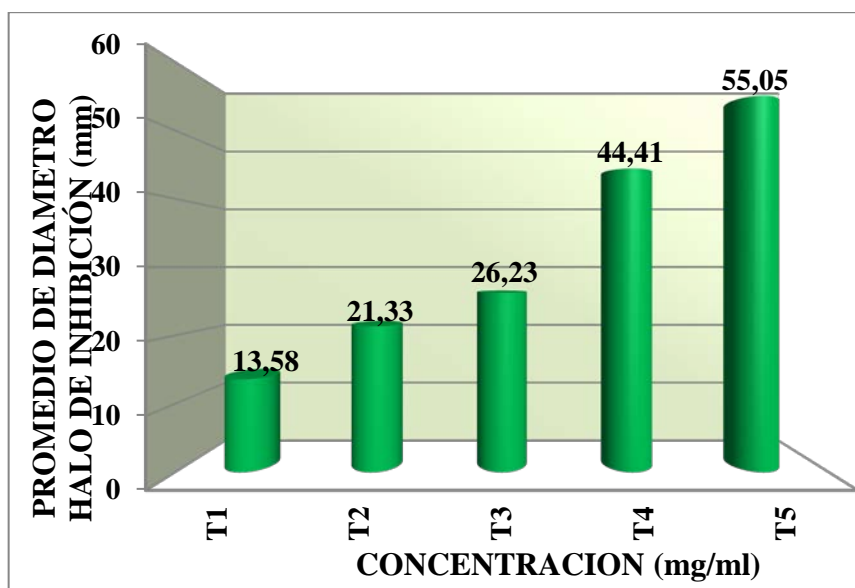
TRAT.	Aceite Esencial		Repeticiones								PROMEDIO
	Vol.	C <sub>i</sub>	Halo de inhibición (mm)								
	(μl)	(mg/ml)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
T-1	2,5	2,275	11,20	9,11	17,10	22,30	12,20	12,10	12,70	11,90	13,58
T-2	5,0	4,550	15,40	32,62	20,30	17,90	21,31	19,81	22,30	21,00	21,33
T-3	7,5	6,825	19,21	27,33	39,81	38,33	18,90	19,31	21,71	25,22	26,23
T-4	10,0	9,100	48,80	38,80	36,40	43,90	45,40	48,20	52,20	41,60	44,41
T-5	12,5	11,375	64,44	73,84	56,42	59,44	43,22	47,64	47,50	47,90	55,05
T-6	15,0	13,650	Ausencia de crecimiento bacteriano								
T-7	17,5	15,925	Ausencia de crecimiento bacteriano								
T-8	20,0	18,200	Ausencia de crecimiento bacteriano								
Control	+		Con aceite esencial								
	-		Sin aceite esencial								

Fuente: Elaboración propia

Se presentan los datos obtenidos de aplicar los ocho tratamientos (concentraciones del aceite esencial de cedrón) con las ocho repeticiones; y el promedio de halos de inhibición para cada tratamiento. En las placas con los tratamientos T-6, T-7 y T-8 hubo ausencia de crecimiento bacteriano, esto debido a que existe una relación directa entre la

concentración del aceite esencial de cedrón y la inhibición del crecimiento de la bacteria.

Se evidencia el poder inhibitorio del aceite esencial de las hojas de cedrón de Tarata, en el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 2,275 mg/mL (T-1), representando una buena actividad antibacteriana para éste.



**GRÁFICO 01:** Promedio de Diámetros de halo de inhibición Vs. concentraciones del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Fuente: Elaboración propia

Se observa que la inhibición del crecimiento bacteriano tiene una relación directa con la concentración del aceite esencial embebido en el disco (mg/ml), es decir, cuanto mayor es la concentración del aceite esencial mayor será el tamaño de halo de inhibición. En las placas con los tratamientos T-6, T-7 y T-8 hubo ausencia de crecimiento bacteriano.

**CUADRO N° 08:** Determinación del grado de sensibilidad de *Escherichia coli* ATTC 25922 a diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” según pautas de Duraffourd y Lapraz (1983).

TRAT.	Aceite Esencial		Grado de Sensibilidad		
	Vol.	Ci	Sensibilidad límite entre 9 a 11 mm	Sensibilidad media entre 11 a 20 mm	Sumamente s. de 20 mm a más
	( $\mu$ l)	(mg/ml)	(sensible = +)	(muy sensible = ++)	(sumamente s. = +++)
T-1	2,5	2,275		13,58	
T-2	5,0	4,550			21,33
T-3	7,5	6,825			26,23
T-4	10,0	9,100			44,41
T-5	12,5	11,375			55,05
Control	+		Con aceite esencial		
	-		Sin aceite esencial		

Fuente: Elaboración propia

Se clasificó el promedio de los halos producidos por el aceite esencial de cedrón frente a *Escherichia coli* ATTC 25922, de acuerdo a la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz (1983). Entonces, se reporta sensibilidad media (11 – 20 mm) a partir del tratamiento T-1 (2,275 mg/ml) con un halo promedio de 13,58 mm; hasta los tratamientos T-2 (4,55 mg/ml), T-3 (6,82 mg/ml), T-4 (9,10 mg/ml), T-5 (11,37 mg/ml) donde el grado de sensibilidad es sumamente sensible (> a 20 mm).

Por lo tanto, podríamos afirmar que el aceite esencial de cedrón del distrito de Tarata, posee moderada actividad antibacteriana frente a *E. coli*, debido a que los halos de inhibición se clasifican en el grado de sensibilidad media de las escalas de sensibilidad para aceites esenciales de Duraffourd y Lapraz.

**CUADRO N° 09:** Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” a través de la variación de tamaños de halos de inhibición frente a *E. coli* ATCC 25922.

Tamaño de halo de inhibición	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F cal.	Significación 0,05	0,01
<b>Tratamientos</b>	4	9375,250	2343,813	46,178	2,71	4,07*
<b>Error</b>	28	1421,167	50,756			
<b>Total</b>	39	11144,664				

(\*) Diferencia altamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

#### Planteamiento de hipótesis:

- $H_0$ : Los tratamientos no difieren entre sí.
- $H_1$ : Los tratamientos difieren entre sí.

Siendo  $\alpha = 0,05$  y el punto crítico que delimita la zona de aceptación y rechazo de  $H_0$  es  $F(4,28; 0,95) = 2,71$ . Puesto que,  $F = 46,178 > F_{crítica}$  se concluye, con un nivel de significación del 5%, que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

De igual manera, si  $\alpha = 0,01$  y el punto crítico que delimita la zona de aceptación y rechazo de  $H_0$  es  $F(4,28; 0,99) = 3,36$ . Puesto que,  $F = 46,178 > F_{crítica}$  se concluye, con un nivel de significación del 1%, que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de igualdad en el efecto de los tratamientos, es decir, al menos uno es diferente.

**CUADRO N° 10:** Comparación múltiple de Tukey de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente *Escherichia coli* ATCC 25922.

Orden	Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Significancia $\alpha = 0,05$ (*)
1	T-5	55,05	a
2	T-4	44,41	b
3	T-3	26,22	c
4	T-2	21,33	c d
5	T-1	13,57	d

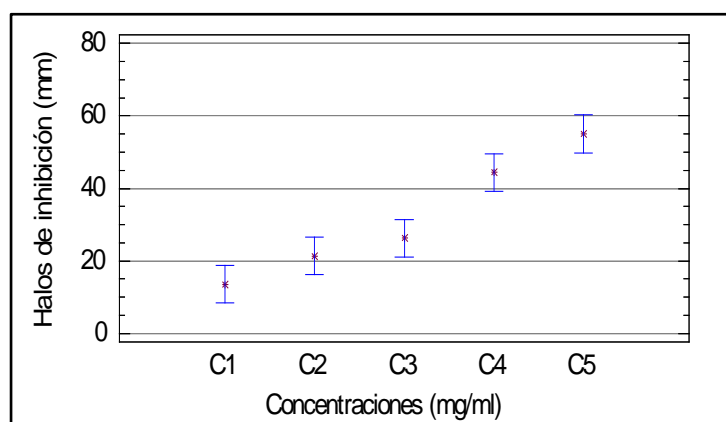
(\*) El tratamiento con letra diferente, es significativamente diferente.

Fuente: Elaboración propia.

La prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), muestra los promedios de tamaños de halos de inhibición por tratamiento (concentración del aceite esencial). No hubo diferencia en el tamaño de halo de inhibición que se generó

entre el T-3 (26,22 mm) y el T-2 (21,33 mm). De igual forma, no hubo diferencia en el tamaño de halo de inhibición generado entre T-2 (21,33 mm) y el T-1 (13,57 mm).

Sin embargo, cuando se aplican los tratamientos T-4 y T-5 se produce un efecto inhibitorio con promedios significativamente diferentes al resto.



**GRÁFICO 02.** Gráfico de Medias e intervalos HSD de Tukey al 95,0%

Fuente: Elaboración propia.

Se muestra los intervalos y medias de los tamaños de halos de inhibición por tratamiento (concentración del aceite esencial) con un nivel de confianza de 95%. Además, no se aprecia diferencias estadísticas

significativas entre la Media de los tratamientos T-1 y T-2, lo mismo para las concentraciones T-2 y T-3. El resto de los tratamientos difieren estadísticamente entre sí.

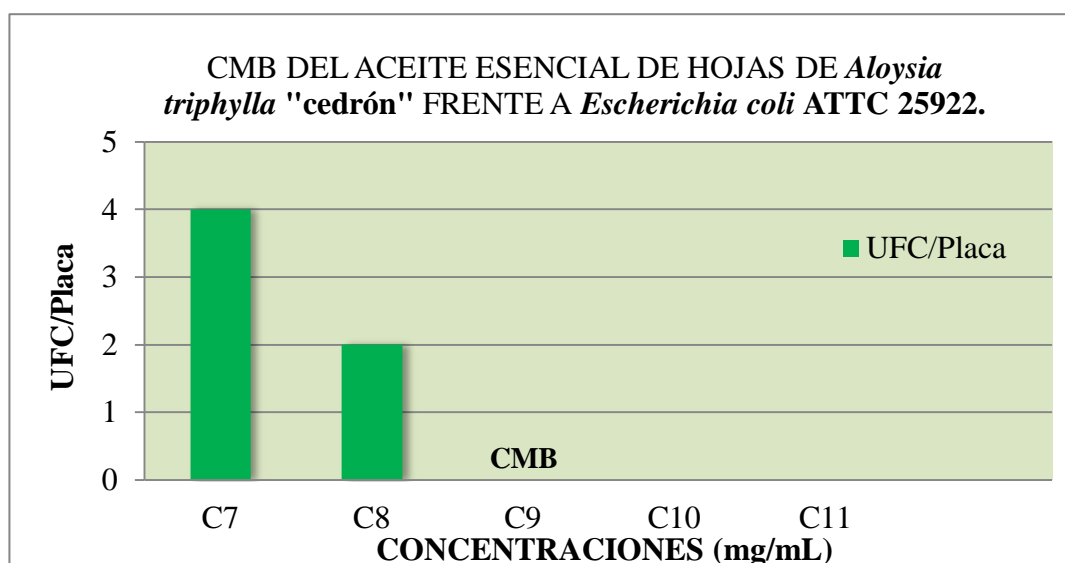
**CUADRO N° 11:** CMI y CMB producido por la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *Escherichia coli* ATTC 25922.

Nº tubo	C <sub>i</sub> (mg/mL)	UFC/Placa	Turbidez	Observación
W-1	2,245		T	
W-2	2,487		T	
W-3	2,730		T	
W-4	2,973		T	
W-5	3,215		T	
W-6	3,458		T	
W-7	3,701	4	NT	<b>CMI</b>
W-8	3,943	2	NT	
W-9	4,186	0	NT	<b>CBM</b>
W-10	4,429	0	NT	
W-11	4,671	0	NT	
CONTROL	Control (+)	CON/ Aceite Esencial	+	Control (+)
	Control (-)	SIN/ Aceite Esencial	-	Control (-)

Fuente: Elaboración propia.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cedrón frente a *E. coli* ATTC 25922, siendo de 3,701 mg/mL (W-7).

En seguida, se determinó la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de cedrón frente a *Escherichia coli* ATTC 25922, siendo de 4,186 mg/mL (W-9).



**GRÁFICO 03.** CMB producido por la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, “cedrón” frente a *Escherichia coli* ATTC 25922.

Fuente: Elaboración propia.

En el Gráfico 03 se muestra la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a partir de la concentración 4,186 mg/mL del aceite esencial de cedrón, debido a la ausencia de UFC bacterianas de *Escherichia coli* ATTC 25922.

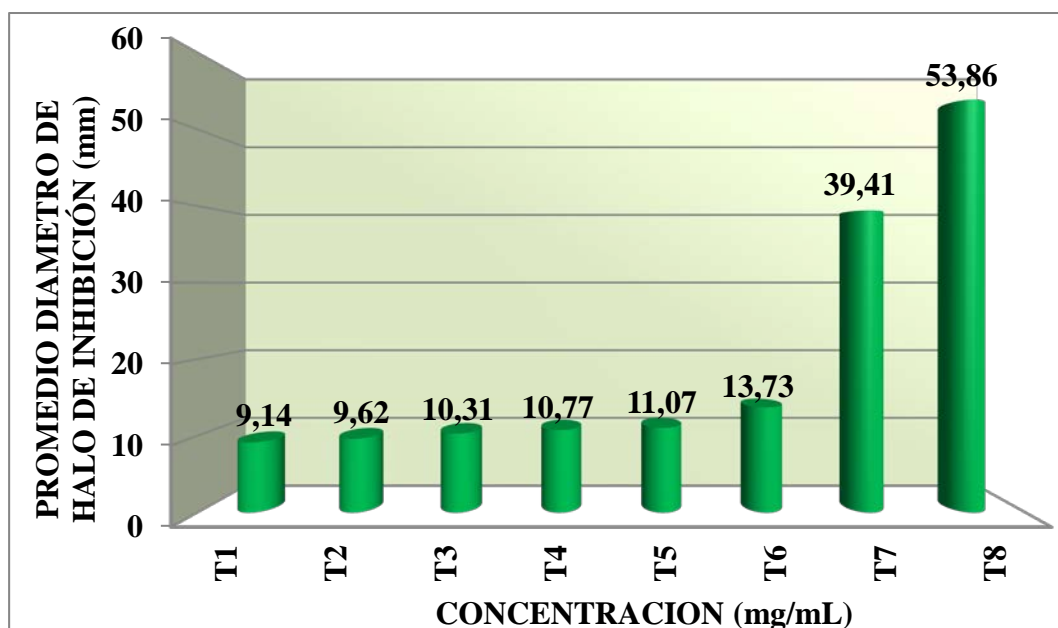
**CUADRO N° 12:** Evaluación antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* “cedrón” frente a *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 por el método de disco difusión.

TRAT.	ACEITE ESENCIAL		REPETICIONES								PROMEDIO
	Vol.	C <sub>i</sub>	Halo de inhibición (mm)								
	(µl)	(mg/ml)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
<b>T-1</b>	2,5	2,275	8,33	9,11	9,63	9,93	9,96	7,40	9,36	9,40	9,14
<b>T-2</b>	5,0	4,550	7,82	8,21	11,81	14,23	8,40	9,13	8,62	8,76	9,62
<b>T-3</b>	7,5	6,825	10,83	8,57	9,57	12,63	9,23	9,11	11,43	11,10	10,31
<b>T-4</b>	10,0	9,100	11,00	10,36	10,36	10,95	11,00	12,95	9,90	9,61	10,77
<b>T-5</b>	12,5	11,375	10,37	11,13	10,63	11,51	11,57	9,76	12,13	11,46	11,07
<b>T-6</b>	15,0	13,650	16,46	12,45	13,10	16,13	14,76	13,97	10,53	12,46	13,73
<b>T-7</b>	17,5	15,925	40,90	48,86	52,66	26,46	28,90	49,43	33,46	34,62	39,41
<b>T-8</b>	20,0	18,200	53,46	48,00	55,72	54,72	51,66	56,66	54,82	55,80	53,86
<b>Control</b>	+		Con aceite esencial								
	-		Sin aceite esencial								

Fuente: Elaboración propia.

Se presentan los datos obtenidos de aplicar los ocho tratamientos (concentraciones del aceite esencial de cedrón) con las ocho repeticiones; y el promedio de halos de inhibición para cada tratamiento.

Se evidencia el poder inhibitorio del aceite esencial de cedrón de Tarata, en el caso de *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 fue de 11,375 mg/ml (T-5), confirmando la propiedad antibacteriana de éste.



**GRÁFICO 04.** Promedio de Diámetros de halo de inhibición Vs. concentraciones del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *Staphylococcus aureus* ATTC 25923.

Fuente: Elaboración propia

Se observa que la inhibición del crecimiento bacteriano tiene una relación directa con la concentración del aceite esencial embebido en el disco (mg/ml), es decir, cuanto mayor es la concentración del aceite esencial mayor será el tamaño de halo de inhibición.

**CUADRO N° 13:** Determinación del grado de sensibilidad de *S. aureus* ATCC 25923 a diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” según pautas de Duraffourd y Lapraz (1983).

TRAT.	ACEITE ESENCIAL		GRADO DE SENSIBILIDAD		
	Vol.	C <sub>i</sub>	Sensibilidad límite entre 9 a 11 mm	Sensibilidad media entre 11 a 20 mm	Sumamente s. de 20 mm a más
	(μl)	(mg/ml)	(sensible = +)	(muy sensible = ++)	(sumamente s. = +++)
T-1	2,5	2,275	-		
T-2	5,0	4,550	-		
T-3	7,5	6,825	-		
T-4	10,0	9,100	-		
T-5	12,5	11,375		11,07	
T-6	15,0	13,650		13,73	
T-7	17,5	15,925			39,41
T-8	20,0	18,200			53,86
Control		+		Con aceite esencial	
		-		Sin aceite esencial	

Fuente: Elaboración propia.

Se clasificó el promedio de los halos producidos por el aceite esencial de cedrón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De acuerdo a la escala de sensibilidad para aceites esenciales de Duraffourd y Lapraz (1983), se reporta sensibilidad a partir del tratamiento T-5 con un halo promedio de 11,07 mm a la concentración de 11,37 mg/ml, hasta el tratamiento T-8 donde el grado de sensibilidad es sumamente sensible (> a 20 mm).

**CUADRO N° 14:** Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” a través de la variación de tamaños de halos de inhibición frente a *S. aureus* ATTC 25923.

Tamaño de halo de inhibición	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F cal.	Significación 0,05	0,01
<b>Tratamientos</b>	7	16 370,000	2 338,572	147,019	2,205	3,030*
<b>Error</b>	49	779,425	15,907			
<b>Total</b>	63	17 223,540				

(\*) Diferencia altamente significativa.

Fuente: Elaboración propia

**Planteamiento de hipótesis:**

- $H_0$ : Los tratamientos no difieren entre sí.
- $H_1$ : Los tratamientos difieren entre sí.

Siendo  $\alpha = 0,05$  y el punto crítico que delimita la zona de aceptación y rechazo de  $H_0$  es  $F(7,49; 0.95) = 2,205$ . Puesto que,  $F = 147,019 > F_{crítica}$  se concluye, con un nivel de significación del 5%, que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

De igual manera, si  $\alpha = 0,01$  y el punto crítico que delimita la zona de aceptación y rechazo de  $H_0$  es  $F(7,49; 0.99) = 3,030$ . Puesto que,  $F = 147,019 > F_{crítica}$  se concluye, con un nivel de significación del 1%, que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula de igualdad en el efecto de los tratamientos, es decir, al menos uno es diferente.

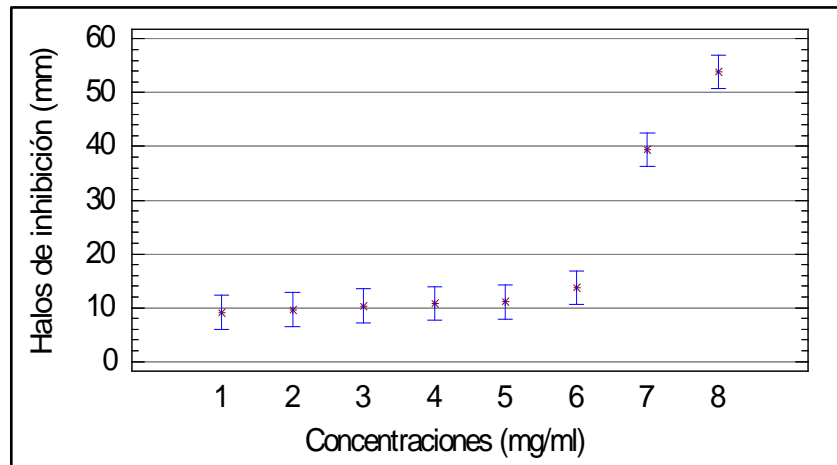
**CUADRO N° 15:** Comparación múltiple de Tukey de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *S. aureus* ATTC 25923.

Orden	Tratamiento	Halo de inhibición (mm)	Significancia $\alpha = 0,05$ (*)
1	T-8	53,85	a
2	T-7	39,41	b
3	T-6	13,73	c
4	T-5	11,07	c
5	T-4	10,77	c
6	T-3	10,31	c
7	T-2	9,62	c
8	T-1	9,14	c

(\*) El tratamiento con letra diferente, es significativamente diferente.

Fuente: Elaboración propia.

La prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), muestra los promedios de tamaños de halos de inhibición por tratamiento (concentración del aceite esencial). No hubo diferencia en el tamaño de halo de inhibición que se generó entre el T-1 hasta el T-6. Sin embargo, cuando se aplican los tratamientos T-7 y T-8 se produce un efecto inhibitorio con promedios significativamente diferentes al resto (39,41 y 53,85 mm respectivamente).



**GRÁFICO 05.** Gráfico de Medias e intervalos HSD de Tukey al 95,0%

Fuente: Elaboración propia.

Se muestra los intervalos y medias de los tamaños de halos de inhibición por tratamiento (concentración del aceite esencial) con un nivel de confianza de 95%.

No se aprecia diferencias estadísticas significativas entre la Media de los tratamientos T-1 hasta el T-6. El resto de los tratamientos difieren estadísticamente entre sí.

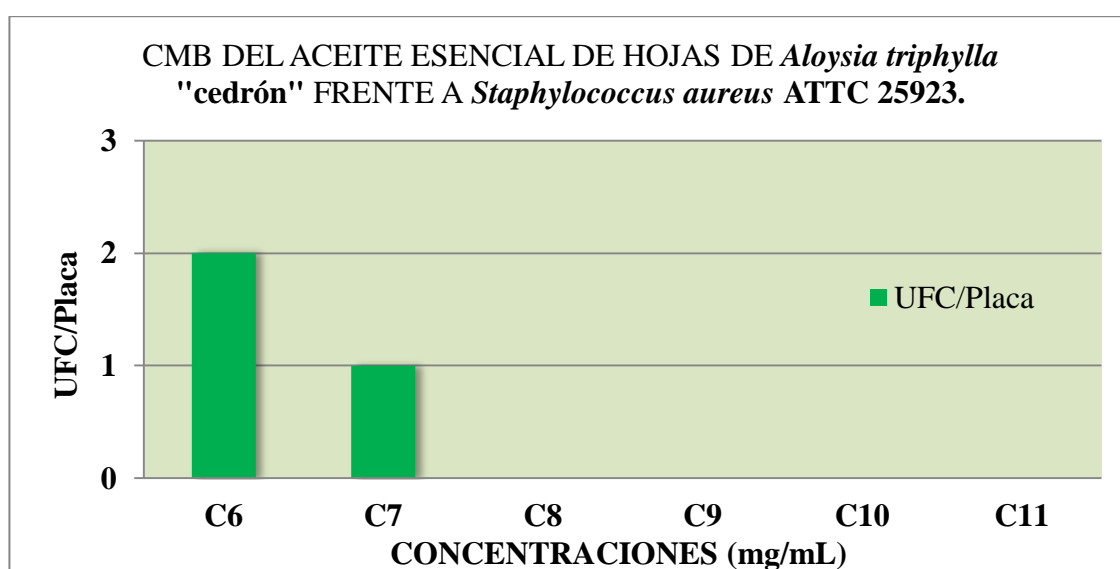
**CUADRO N° 16:** CMI y CMB producido por la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. “cedrón” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Nº tubo	C <sub>i</sub> (mg/mL)	UFC/Placa	Turbidez	Observación
W-1	13,347		T	
W-2	13,711		T	
W-3	14,075		T	
W-4	14,439		T	
W-5	14,803		T	
W-6	15,167	2	NT	<b>CMI</b>
W-7	15,531	1	NT	
W-8	15,895	0	NT	<b>CBM</b>
W-9	16,259	0	NT	
W-10	16,623	0	NT	
W-11	16,987	0	NT	
CONTROL	Control (+)	CON/ Aceite Esencial	+	Control (+)
	Control (-)	SIN/ Aceite Esencial	-	Control (-)

Fuente: Elaboración propia.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cedrón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, siendo de 15,167 mg/mL (W-6).

En seguida, se determinó la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de cedrón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, siendo de 16,259 mg/mL (W-8).



**GRÁFICO 06.** CMB producido por la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. "cedrón" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fuente: Elaboración propia.

En el Gráfico 06 se muestra la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a partir de la concentración 15,895 mg/mL del aceite esencial de cedrón, a razón de ausencia de UFC bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923.

**CUADRO N° 17:** Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, P. “cedrón” frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, por el método de disco difusión.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE CEDRÓN POR MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN (mm)								
Volumen (µl)	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
Concentración (mg/ml)	2,27	4,55	6,82	9,10	11,37	13,65	15,92	18,2
Tratamiento	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8
<i>Escherichia coli</i>	13,58	21,33	26,23	44,41	55,05	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,14	9,62	10,31	10,77	11,07	13,73	39,41	53,86

(-): Ausencia de Crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro N° 17 compara la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, P. “cedrón” frente a los microorganismos evaluados, observándose mayor efecto inhibitorio frente a *E. coli* ya que logró generar halos con diámetro superior a 11,0 mm a la concentración de 2,275 mg/mL (T-1). También se muestra que el microorganismo con menor efecto inhibitorio fue *S. aureus* ya que el promedio de halos de inhibición fue tan solo 11,07 mm a la concentración de 11,375 mg/mL (T-5).

**CUADRO N° 18:** Comparación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, P. “cedrón” frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, por el método de dilución en medio líquido y difusión en agar.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE CEDRÓN POR MÉTODO DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO Y DIFUSIÓN EN AGAR (mg/mL)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	3,701	15,167
Concentración Mínima Bactericida (CMB)	4,186	15,895

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro N° 18 compara la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, P. “cedrón” por el método de dilución en medio líquido y difusión en agar, frente a los microorganismos evaluados, observándose mayor efecto bacteriostático y bactericida frente a *E. coli*. El crecimiento bacteriano de *E. coli* se inhibió a la concentración de 3,701 mg/mL, mientras que la disminución en un 99,9% del número bacteriano se produjo a la concentración de 4,186 mg/mL de aceite esencial. Mientras que para *S. aureus* se aplicó mayor concentración para producir ambos efectos (bacteriostático y bactericida).

## V. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales representan el único recurso terapéutico disponible para los sectores más desfavorecidos de esta población (Sharapin, 2002). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las dos terceras partes de la población mundial, recurren al uso de las plantas medicinales.

El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de las hojas de *Aloysia triphylla*, P. “cedrón” con el fin de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta planta en la Medicina Tradicional Peruana como afecciones digestivas y respiratorias.

El método de destilación por arrastre con vapor de agua es utilizado por su uso a pequeña escala, alto rendimiento y la pureza del aceite obtenido. Aunque existe otros métodos de extracción como: extracción por extracción, hidrodestilación e hidrodestilación asistida por radiación de microondas; los equipos requeridos son costosos y requieren

de tecnología sofisticada (Marín y Ordoñez, 2008; Vargas y Bottia, 2008). Por lo expuesto se tomó la decisión de extraer el aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla, P.*** mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, una vez obtenido, se hizo la caracterización organoléptica, y se midió la densidad y concentración del producto (Anexo N° 17, 18 y 19).

Para determinar la sensibilidad antibacteriana *in vitro* por el método de disco difusión, se consideró el método recomendado por la NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2000), que se basa en los estudios de Bauer y col. (1966). El principio del método involucra el uso de un volumen de antimicrobiano (aceite esencial) en un disco de papel aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio.

Para ello, se tomó como referencia las pautas dadas por Duraffourd y Lapraz (1983) que consideran que la actividad de los aceites esenciales es como sigue: a) sensibilidad límite, cuando presenta un diámetro entre 9 y 11 mm b) sensibilidad media, cuando presenta un diámetro entre 11 a

20 mm y c) sumamente sensible, cuando presenta un diámetro mayor a 20 mm.

De igual manera, para determinar la sensibilidad antibacteriana *in vitro* por el método de dilución en medio líquido y difusión en agar, se consideró el método recomendado por la NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2000). Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antimicrobiano (aceite esencial) en distintas concentraciones. Luego se inoculan, cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 horas a 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado.

Se evidencia el poder inhibitorio del aceite esencial de las hojas de cedrón de Tarata, para el caso de ***Escherichia coli* ATCC 25922** fue de 2,275 mg/mL (T-1) y según la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz (1983) clasifica la actividad antibacteriana del aceite esencial de cedrón del distrito de Tarata, como moderada frente a la bacteria en mención (Cuadro N° 07, 08 y Anexo N° 09).

Esto se puede fundamentar por el hecho de que el aceite esencial de cedrón tiene entre sus principales componentes, al grupo de los hidrocarburos monoterpénicos y aldehidos monoterpénicos (Anexo N° 21), los cuales actúan en la membrana celular bacteriana aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos tres efectos produce la muerte en la célula bacteriana. Sin embargo, el hecho de que *Escherichia coli* presente mayor sensibilidad, también podría deberse a que la pared celular de esta bacteria es menos compleja, dado que tiene una capa simple (red de mureína delgada) de peptidoplicano (Maguna, 2006).

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cedrón frente a ***Escherichia coli* ATTC 25922**, siendo de 3,701 mg/mL. En seguida, se determinó la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de cedrón frente a ***Escherichia coli* ATTC 25922**, la que fue 4,186 mg/mL (Cuadro N° 11).

Así también, se evidencia el poder inhibitorio del aceite esencial de cedrón frente a ***Staphylococcus aureus* ATTC 25923** siendo de 11,375 mg/mL (T-5), según la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz (1983) clasifica como moderada (Cuadro N° 12, 13 y Anexo N° 10).

Entre las posibles razones para que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se viera poco afectado están: la compleja estructura de la pared celular de multicapa (red de mureína muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas) (Maguna, 2006); y la existencia de mecanismos de resistencia, la cual está relacionada con la activación de una síntesis de la pared celular, con hiperproducción de proteínas ligadoras de penicilinas, engrosamiento de la pared celular y el encarcelamiento de fármacos por hiperproducción de los componentes de pared celular (Tavares, 2000).

Otros mecanismos que posee *Staphylococcus aureus* son: la producción de la enzima coagulasa que hace que se deposite el material de fibrina sobre los cocos protegiéndoles del ataque por las células del hospedador, producción de proteasas, nucleasas y lipasas que sirven para despolimerizar las proteínas del hospedador, los ácidos nucleicos y las grasas, el desarrollo de una vía bioquímica resistente la cual puede tener lugar por intercambio genético bloqueando el agente antimicrobiano y por eflujo donde el microorganismo es capaz de bombear hacia afuera el antimicrobiano que va entrando en la célula. Además, estudios previos han demostrado que *Staphylococcus aureus* posee genes que le permiten generar resistencia contra biocidas (agentes químicos y antibióticos) (Tavares, 2000).

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de cedrón frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, siendo de 15,167 mg/mL. En seguida, se determinó la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de cedrón frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, siendo de 16,259 mg/mL (Cuadro N° 16).

Comparando el efecto antibacteriano del aceite esencial de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón” frente a ambas bacterias patógenas, se observó mayor sensibilidad de *Escherichia coli* (Gram negativa) y mayor resistencia por parte de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) (Cuadro N° 17, 18).

De acuerdo al análisis de cromatografía gaseosa con detección de masas (Anexo N° 21) que se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa; se registró que los componentes mayoritarios del aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** (procedente del distrito de Tarata) fueron: citral o geranial (26,78%), limoneno (20,57%) y citronellal (7,57%), eucaliptol (5,45%).

Los elementos identificados en la muestra también concuerdan con los componentes característicos para el aceite esencial de *Aloysia triphylla* de Colombia y de Argentina, registrado por Díaz (2007), Zygaldó y cols. (1999), Duschatzky y col. (2004), Oliva y cols. (2010) respectivamente, a excepción del neral, mircenona,  $\alpha$ -tujona y cis-carveol. Así también, los compuestos químicos del aceite esencial de *Aloysia triphylla* de Marruecos y Turquía, reportados por Bellakhdar (1993) y Ozek y cols. (1996), coinciden con los del presente estudio.

No hay trabajos reportados en el Perú respecto al efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de las hojas de ***Aloysia triphylla***, P. “cedrón” frente a ***Escherichia coli*** y ***Staphylococcus aureus***, solo se conoce la eficacia de otras especies vegetales frente a las bacterias en mención.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de la especie vegetal ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón” de la región de Tacna (distrito de Tarata), frente a las bacterias patógenas ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**, por el método de disco difusión, dilución en medio líquido y difusión en agar.
2. Se obtuvo aceite esencial a partir de las hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón”, por el método de arrastre con vapor de agua.
3. Se precisó la sensibilidad antibacteriana *in vitro* de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla* P.** “cedrón”, por el método de disco difusión, resultando ser *Escherichia coli* más sensible al poder inhibidor del aceite esencial y *Staphylococcus aureus* más resistente.

4. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón” por el método de dilución en medio líquido, obteniendo inhibición bacteriana para *Escherichia coli* a la concentración de 3,701 mg/mL, mientras que para *Staphylococcus aureus* se necesitó una dosis cinco veces mayor (15,167 mg/mL).
  
5. Se determinó la Concentración Mínima Bactericida de ***Escherichia coli* ATCC 25922** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al aceite esencial de hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón” por el método de difusión en agar, obteniendo disminución bacteriana de *Escherichia coli* en un 99,9% a la concentración de 4,186 mg/mL, mientras que para *Staphylococcus aureus* se necesitó una dosis cuatro veces mayor (16,259 mg/mL).

## VII. RECOMENDACIONES

1. Tomando el presente trabajo, se recomienda realizar pruebas experimentales in vitro del aceite esencial de las hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón”, frente a otros microorganismos de importancia clínica.
2. Realizar otros métodos de extracción de las hojas de ***Aloysia triphylla*, P.** “cedrón”, para las pruebas de comparación del aceite esencial, de este modo lograr cuan efectiva son las diferentes extracciones y como variarán su actividad antibacteriana.
3. Realizar estudios de bioensayos en otras especies nativas de la región, para la valoración y preservación de los recursos naturales debido que nuestro país está entre los 12 países considerados como megadiversos (UNEP/ROLAC, 2005).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **ALBARRACÍN, G. y GALLO, S. 2003.** Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia.
2. **ANDREWS, J. 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Inglaterra).vol.48.
3. **ARBUTHNOT J. 1992.** Staphylococcus: Skin and wound infections; abscess; osteomyelitis; food poisoning. *Medical Microbiology*. 14th ed. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, editors. Churchill Livingstone.
4. **ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. 2007.** Chemical composition of the oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B.

K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochem. System. Ecol.*

5. **BANDONI, A.; RETTA, D.; DI LEO LIRA, P.; VAN BAREN, C. 2000.** Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Ed, Editorial U. Nacional de la Plata, La Plata.
6. **BANNERMAN, T. 2003.** Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A: Manual of Clinical Microbiology. 8º Ed. Editor: P.R. Murray. ASM Press, Washington D.C (EEUU).
7. **BAUER, KIRBY; SHERRIS, J.; TURCK, M. 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am Journal Clin. Pathol.*
8. **BELLAKHDAR, J.; IDRISSE, A.; CANIGUERAL, S. 1993.** Analysis of the essential oil from odorant verbena (*Lippia H.B. and K*). *Plan. Med. Phytother*, 26(4),
9. **CERPA, M. 2007.** Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Universidad de Valladolid.

10. **DAN, Y. 2010.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). BMC Infectious Diseases (China).vol.10.
11. **DÍAZ, O. 2007.** “Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en tres regiones de Colombia”. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia.
12. **DIKSHIT, A.; NAQVI, A.; HUSAIN, A. (1986).** *Schinus molle*: a New Source of Natural Fungitoxicant. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants of India. Revisado el 8 de mayo de 2012.
13. **DINGES, M.; ORWIN, P.; SCHLIEVERT, P. 2000.** “Exotoxins of *Staphylococcus aureus*”. Clin. Microbiol. Rev. 13:16-34.
14. **DURAFFORD, C. y LAPRAZ, J. 1983.** Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson S.A. Barcelona.
15. **DUSCHATZKY, C.; MARTINEZ, A.; ALMEIDA, N. 2004.** Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *J. Essent. Oil Res.* 16(6).

16. **FERNÁNDEZ O, ALE O. 2008.** Cultivo de Plantas Aromáticas y Medicinales de la Región Tacna. Primera Edición. Tacna: Escuela de Campo de FCAG/UNJBG.
17. **FIGUEREDO, R. O.; STEFANINI, M. B.; MING, L.; FACANALI, R. 2004.** Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton leaves cultivated in Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Acta Hort. (ISHS): XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants, 629.
18. **GARCÍA J. y PICAZZO J. 2000.** "Compendio de Microbiología Medica". Ediciones Harcourt, S.A. Madrid España.
19. **GIUNTA, JOSÉ. 1976.** Patología Bucal. México, McGraw-Hill. p.p.34-35
20. **GUERRA, M.; RODRÍGUEZ, J.; GARCÍA, G.; LLERENA, C. 2004.** Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos de La Habana.

21. **HERNÁNDEZ, J. R., PASCUAL, A., y col. 2003.** "Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002)". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(2): 77-82.
22. **HERNÁNDEZ, T. y RODRÍGUEZ, M. 1991.** Estudio "in vitro" de la acción fungicida y bactericida del aceite esencial Camazuleno (obtenido de la manzanilla), frente a microorganismos aislados de lesiones buco-faríngeas. *Revista cubana*.
23. **HUGUET, J. 2002.** Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* Enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Revista Peruana Medicina Experimental (Perú)*.vol.19(2).
24. **IJIMA, Y.; WANG, G.; FRIEDMAN, E. P. 2006.** Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Arch. Biochem Biophys*.
25. **JAWETZ, MELNICK; ADELBERG. 2002.** "Microbiología Médica". 17ª edición, Editorial El Manual Moderno, México.

26. **KLOOS W.; LAMBE D. 1991.** Staphylococcus. Manual of clinical microbiology. 5th edition. Balows A, Hausler Jr W, Herman K, Isenberg H, Shadomy J, editors. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
27. **LAMAISON, J.; PETIT C.; CARNAT, A. 1993.** Verbascoside, major phenolic compound of ash leaves (*Fraxinus excelsior*) and Vervain (*Aloysia triphylla*). *Plant Med. Phytother.* 26 (3).
28. **LOCK DE UGAZ, O. 1994.** Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da Edición. Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
29. **MAGUNA, F. P.; ROMERO, A. M.; GARRO, O. A.; OKULIK, N. B. 2006.** Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Resumen E. 057 N° 355. Argentina. Universidad Nacional del Nordeste.
30. **MALACHOWA, N. 2010.** Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cellular and Molecular Life Sciences (USA).vol.67.
31. **MANDELL, G.; BENNETT, J. y col. 2005.** "Principles and Practice of Infectious Diseases " 1: 881-883.

32. **MARÍN, N. y ORDÓÑEZ, S. 2008.** Determinación de metabolitos secundarios volátiles y semi volátiles, y ácidos aristolóquicos en *Aristolochia ringens* Vahl. Universidad Industrial de Santander.
33. **MASUDA, H.; UENO, T. y MURANISHI, S. 2002.** Inhibition of citral deterioration. ACS Symp. Ser. Free radicals in Food Chemistry, Nutrition and Health Effects, 807.
34. **MINS, C.; PLAYFAIR, J.; ROIT, I.; WAKELIN, D.; WILIM, R. 1995.** "Microbiología Médica". Mosby/Doyma Libros División de Times Mirror de España. S.A.
35. **MUÑOZ, L. 2002.** Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 4a Ed.,
36. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2000.** Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. Wayne, PA.
37. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2000.** Methods for dilution antimicrobial

susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. Wayne, Pa.

38. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 1997.** Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard M11-A4. Wayne, PA.
39. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2000.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. Wayne, Pa.
40. **OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. University of Medicine, Kyoto - Japan.
41. **OZEK, T.; KITIMER, N.; BASER, K.; TUMEN, G. 1996.** Composition of the essential oil *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 8 (5).
42. **PIEDRASANTA, B. 1997.** Extracción de aceite esencial de romero con la aplicación del método de destilación por arrastre de vapor,

variando los tamaños de Batch a partir de pruebas a nivel de laboratorio y pruebas a nivel de planta piloto. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.

43. **POMILIO, A.; SELDES, A.; BURTON, G. 1985.** Introducción al estudio de los productos naturales. Monografías OEA. Washington, D.C, 1985, 54 (30).
44. **PRIETO, P.; FRAILE, M. 1997.** “Microbiología en Ciencias de la Salud” Conceptos y Aplicaciones. 1era Edición. Madrid-España.
45. **PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. 2005.** Oficina Regional para América Latina y el Caribe UNEP/ROLAC.
46. **PENSIERO, J.; MUÑOZ, J.; MARTINEZ, V. 2002.** Proyectos de Investigación aplicada a los recursos forestales nativos (PIARFON). Alternativas de sustentabilidad del bosque nativo del Espinal. Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas. Área Etnobotánica. Argentina.

47. **PUMAROLA A.; RODRÍGUEZ-TORRES, J.; GARCÍA, G. 1995.** Microbiología y Parasitología Médica. 2ª Edición. Salvat Editores, Barcelona.
48. **REINA VALERA REVELACIÓN (RVR). 1960.** La Biblia de las Américas.
49. **RODRÍGUEZ, C. J.; FUENTES, L.; PARDO, R. Z. 2003.** Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. *Rev. Cub. Plant. Med.*
50. **SÁNCHEZ, F. 2010.** Extracción de Aceites esenciales: Experiencia Colombiana, II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira: I – 8.
51. **SÁNCHEZ, C. 2007.** Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de la semilla de Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
52. **SANTOS-GOMEZ, P. C.; FERNÁNDEZ, F. M.; VICENTE, A. M. 2005.** Composition of the essential oils from flowers and leaves of

vervain *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton, grow in Portugal. *J. Essent. Oil Res.*, 17 (1).

53. **SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA DEL PERÚ – SENAMHI. 2011.** Reporte de temperatura, presión y humedad relativa del ambiente en Tacna, meses de agosto-diciembre del 2012. Dirección Regional de Tacna: Ministerio del Ambiente del Perú.
54. **SHARAPIN, N. 2002.** Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia* 1 (3).
55. **SHEAGREN, J. 1984.** *Staphylococcus aureus* the persistent pathogen. *The New England. Journal of Medicine*.
56. **STASHENKO, E.; JARAMILLO, B. 2003.** Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb: Cienc.*
57. **TAVARES, W. 2000.** Bacterias gram-positivas problemas: Resistencia do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Rio de Janerio, Brasil.33 (3).

- 58. THAWEBOON S. 2009.** In vitro Antimicrobial Activity of *Ocimum americanum* L. Essential Oil against Oral Microorganisms. Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health (Tailandia), vol. 40(5).
- 59. VÁSQUEZ, O.; ALVA, A.; MARREROS, J. (2001).** Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Revisado el: 28 de diciembre de 2012.
- 60. VARGAS, A. y BOTTIA, E. 2008.** Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia.
- 61. VERITRADE L.T.D. 2007.** Estudio de Aceites Esenciales. Revisado el 30 mayo de 2012. Disponible en:  
[http://www.amcham.org.pe/tradecenter/veritrade/samples/Customize  
d%20Reports%20Sample%20-%20A.pdf](http://www.amcham.org.pe/tradecenter/veritrade/samples/Customize%20Reports%20Sample%20-%20A.pdf)  
Consultado: 15/12/2012

- 62. VOGEL, H. y SILVA, M. 1999.** Seasonal fluctuation of essential oil content in lemon verbena (*Aloysia triphylla*). Acta Hort. (ISHS): II Congress Medical and Aromatic Plants, part 1: Biological resources, sustainable use, conservation and Ethnobotany. Universidad de Talca. Chile.
- 63. WENZEL, R.; REAGAN D.; BERTINO, J.; BARON, E; ARIAS, K. 1998.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and guidelines. Am J Infection Control.
- 64. ZYGADLO, J.; LAMARQUE, A.; MAESTRI, D. 1994.** Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton. *J. Essen. Oils Res.*

## **IX. ANEXOS**

**ANEXO N° 01.**



**a)**



**b)**



**c)**

**Figura N° 01.** Partes del cedrón: a) árbol, b) flores y c) ramas y hojas de *Aloysia triphylla* P.

**ANEXO N° 02.**

**Cuadro N° 01.** Variación de la composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en diferentes partes del mundo.

COMPUESTO	CANTIDAD RELATIVA, % (PAÍS)									
	Colombia	Portugal	Brasil	Francia	Turquía	Argentina		Marruecos	Chile	Grecia
					IV	I	II	III		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	
Limoneno	11,9	15,4	16	19	18,6	-	3,7	3,7	13	5,8
1,8 – Cineol	-	-	-	-	-	-	12	12	6	-
cis – Carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mircenona	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-
α-Tujona	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-
Neral	19	23,3	27,0	10	147,6	-	7	7	18	24,5
Geranial	38	29,5	29,5	40	11,9	-	10	10	24	38,7
Espatulenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

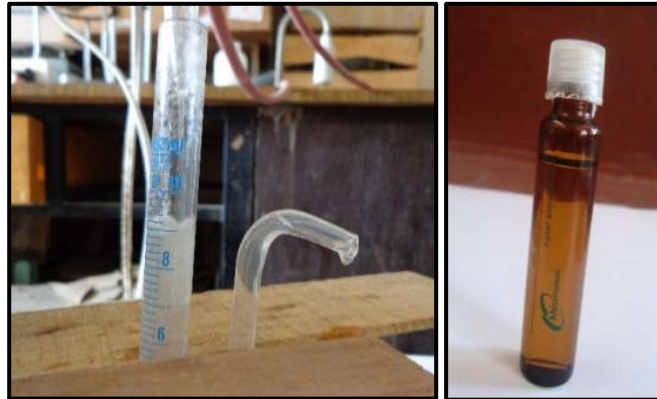
Fuente: Adaptado de Stashenko, 2003(1); Santos-Gómez, 2005(2); Figueredo, 2004(3); Lamaison y col., 1993(4); Ozek y col., 1996(5); Zygadlo y col., 1994(6); Duschatzky, 2004(7); Bellakhdar y col., 1993(8); Vogel y Silva, 1999(9); Argyropoulou y col. 2007(10).

### ANEXO N° 03.



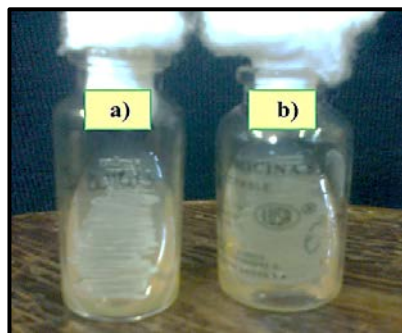
**Figura N° 02.** Equipo de extracción por arrastre de vapor, que consta de las siguientes partes: a) caldera, b) un alambique, c) un condensador de vidrio tipo serpentín, d) un colector de líquidos dispuesto inmediatamente a la salida del condensador.

#### ANEXO N° 04.



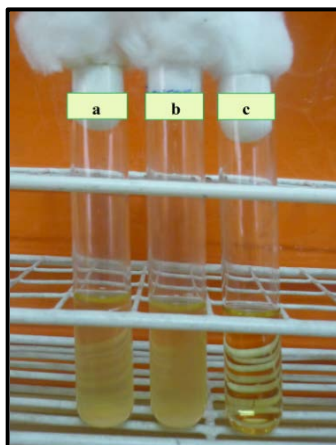
**Figura N° 03.** División de fases: el aceite esencial y agua a) recepción de aceite esencial b) almacenamiento en un frasco de vidrio ámbar.

#### ANEXO N° 05.



**Figura N° 04.** Cepas bacterianas: a) *Escherichia coli* ATCC 25922 y b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### ANEXO N° 06.



**Figura N° 05.** Activación de cepas bacterianas en Caldo BHI: a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923 y c) Control -.

#### ANEXO N° 07.



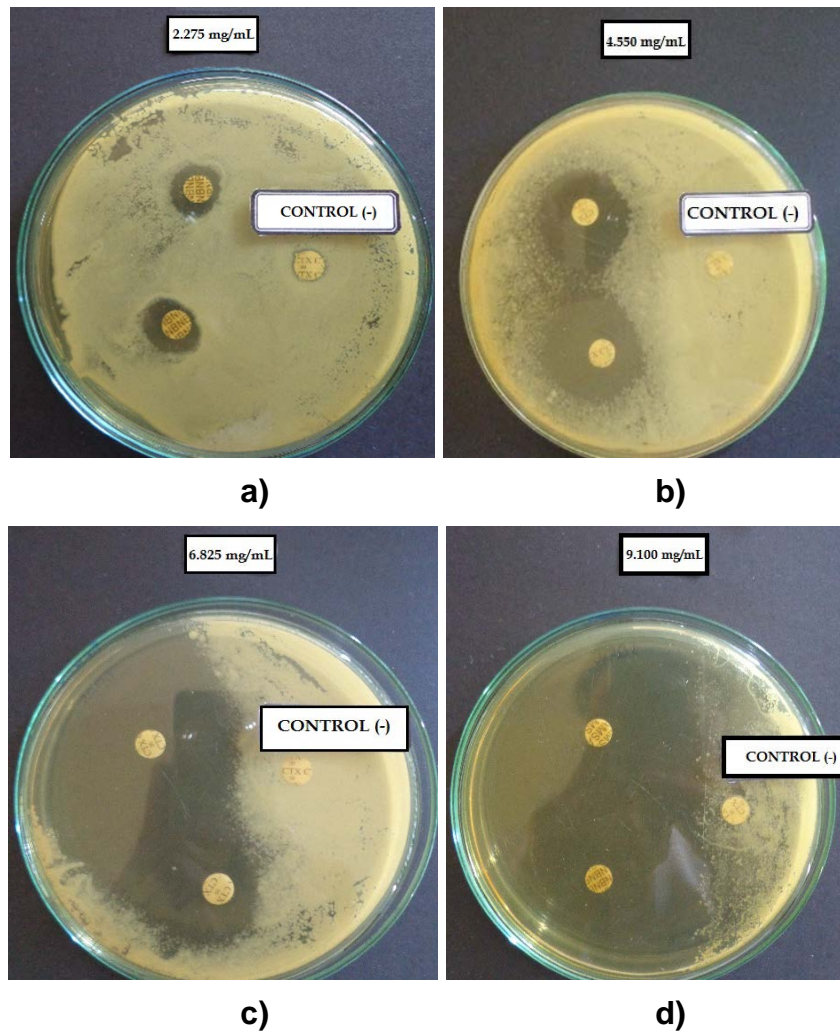
**Figura N° 06.** Activación de cepas bacterianas en agar Müeller Hinton: a) *E. coli* ATCC 25922, b) *S. aureus* ATCC 25923.

**ANEXO N° 08.**



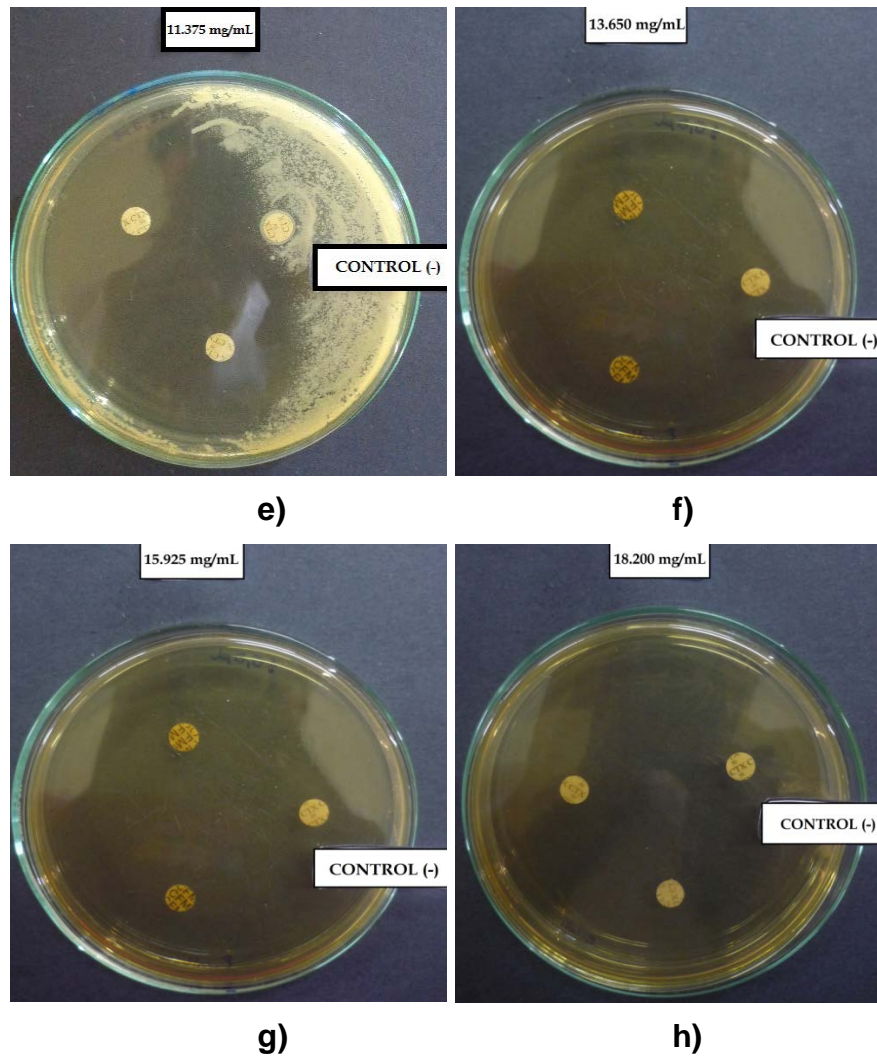
**Figura N° 07.** Aplicación de aceite esencial de cedrón en discos de papel filtro.

## ANEXO N° 09.



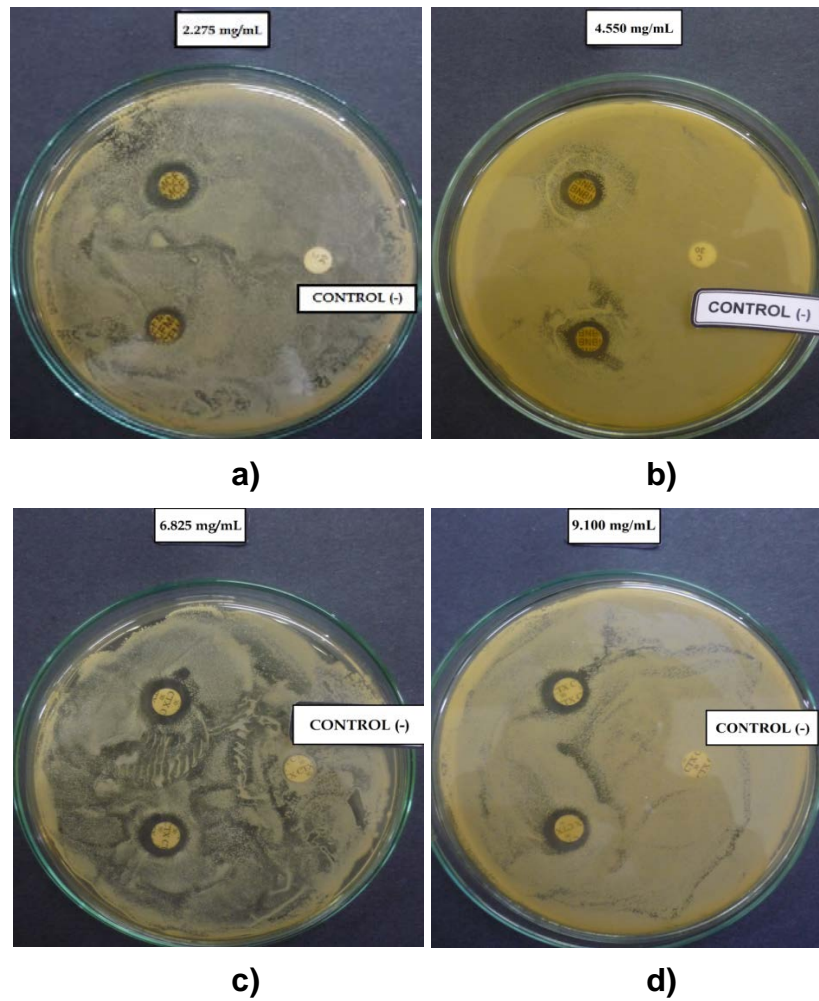
**Figura N° 08.** Susceptibilidad antimicrobiana *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, por el método de disco difusión: a) 2,275 mg/ml, b) 4,550 mg/ml, c) 6,825 mg/ml, d) 9,100 mg/ml. Control (-): Sin aceite esencial.

(Continúa)



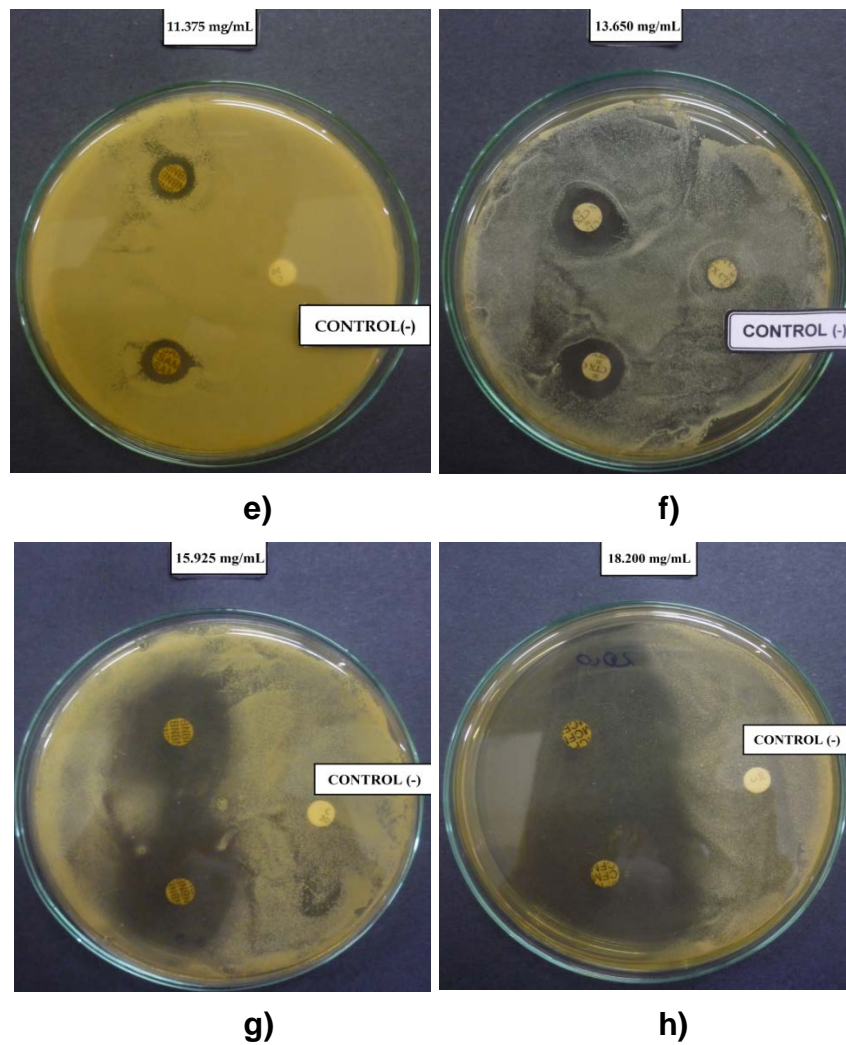
**Figura N° 08.** Susceptibilidad antimicrobiana *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, por el método de disco difusión: e) 11,375 mg/ml, f) 13,650 mg/ml, g) 15,925 mg/ml, h) 18,20 mg/ml. Control (-): Sin aceite esencial.

ANEXO N° 10.



**Figura N° 09.** Susceptibilidad antimicrobiana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, por el método de disco difusión: a) 2,275 mg/ml, b) 4,550 mg/ml, c) 6,825 mg/ml, d) 9,100 mg/ml. Control (-): Sin aceite esencial.

(Continúa)



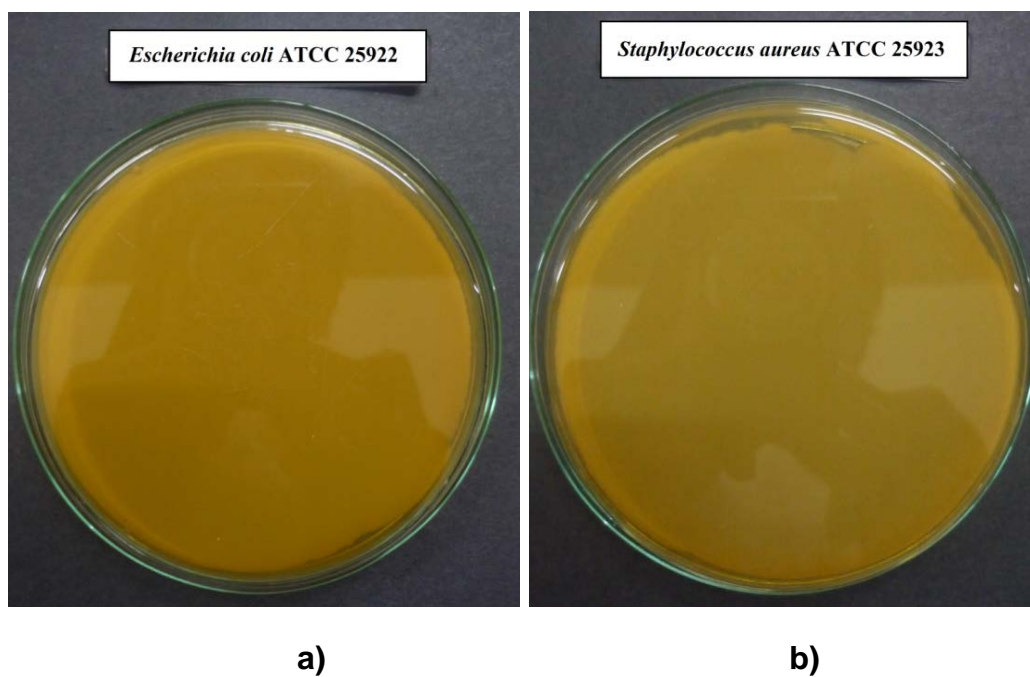
**Figura N° 09.** Susceptibilidad antimicrobiana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla*, por el método de disco difusión: e) 11,375 mg/ml, f) 13,650 mg/ml, g) 15,925 mg/ml, h) 18,20 mg/ml. Control (-): Sin aceite esencial.

**ANEXO N° 11.**



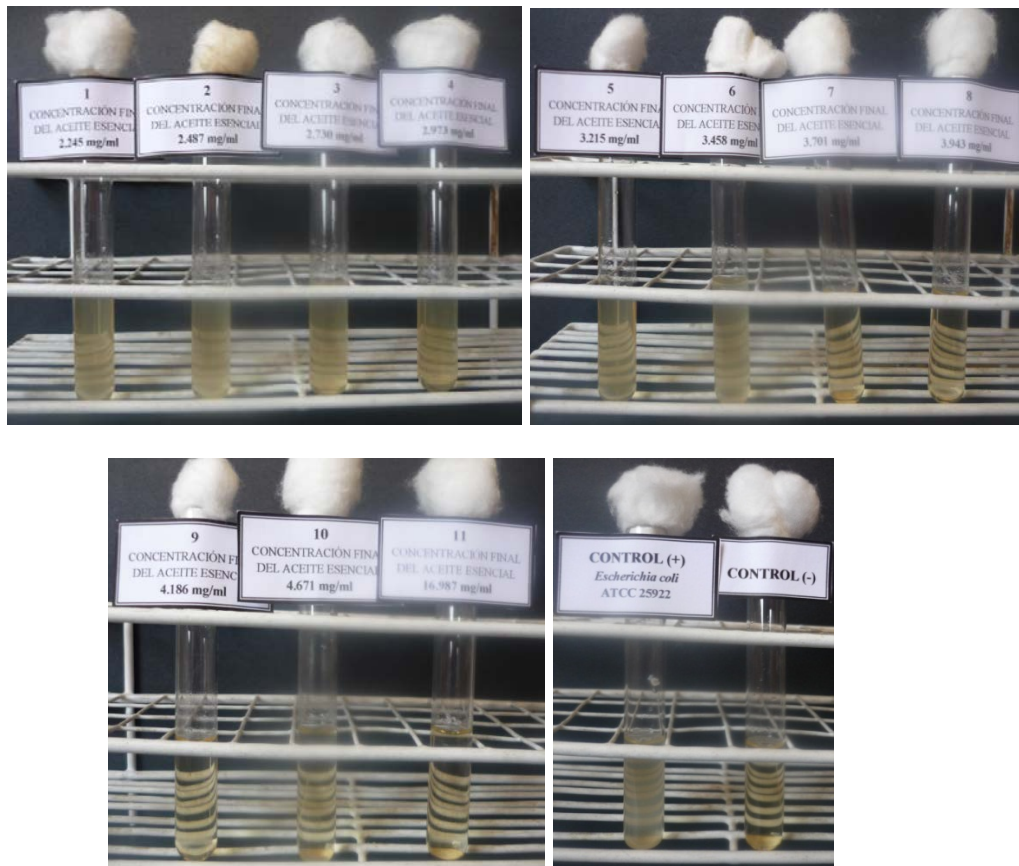
**Figura N° 10.** Control negativo de Agar Müeller Hinton (sin aceite/sin inóculo bacteriano).

ANEXO N° 12.



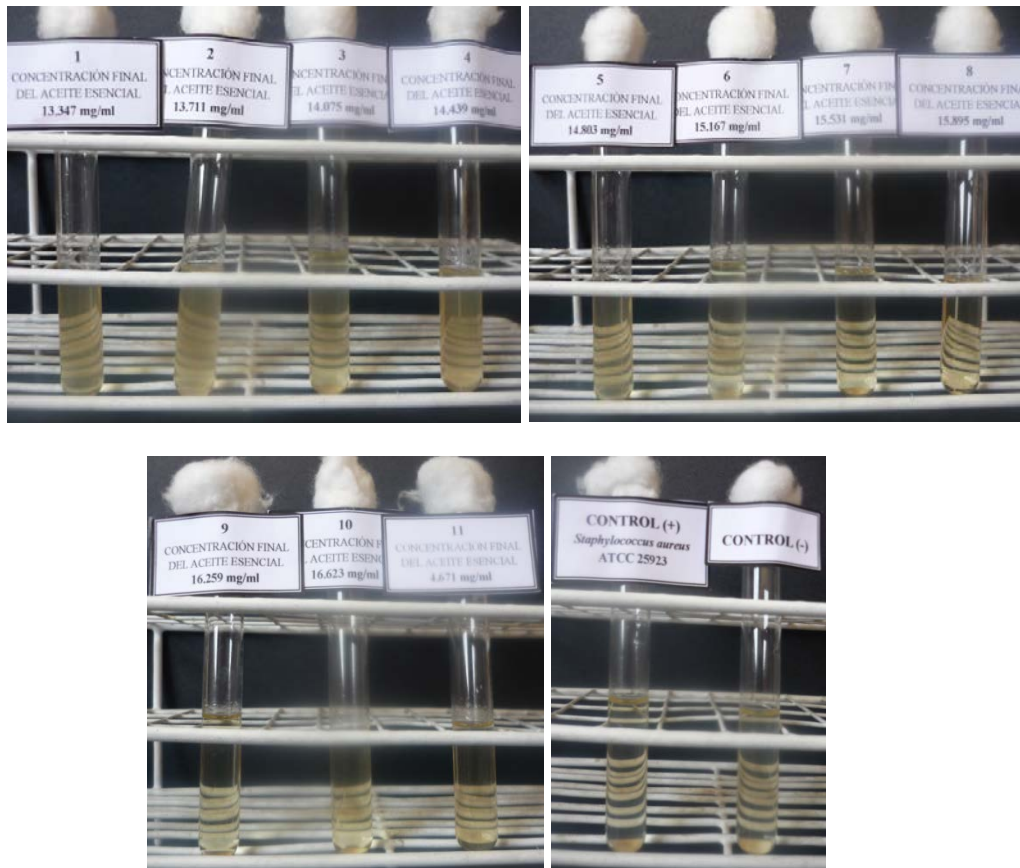
**Figura N° 11.** Control positivo de cultivos bacterianos en Agar Müller Hinton: a) *Escherichia coli* ATCC 25922 y b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### ANEXO N° 13.



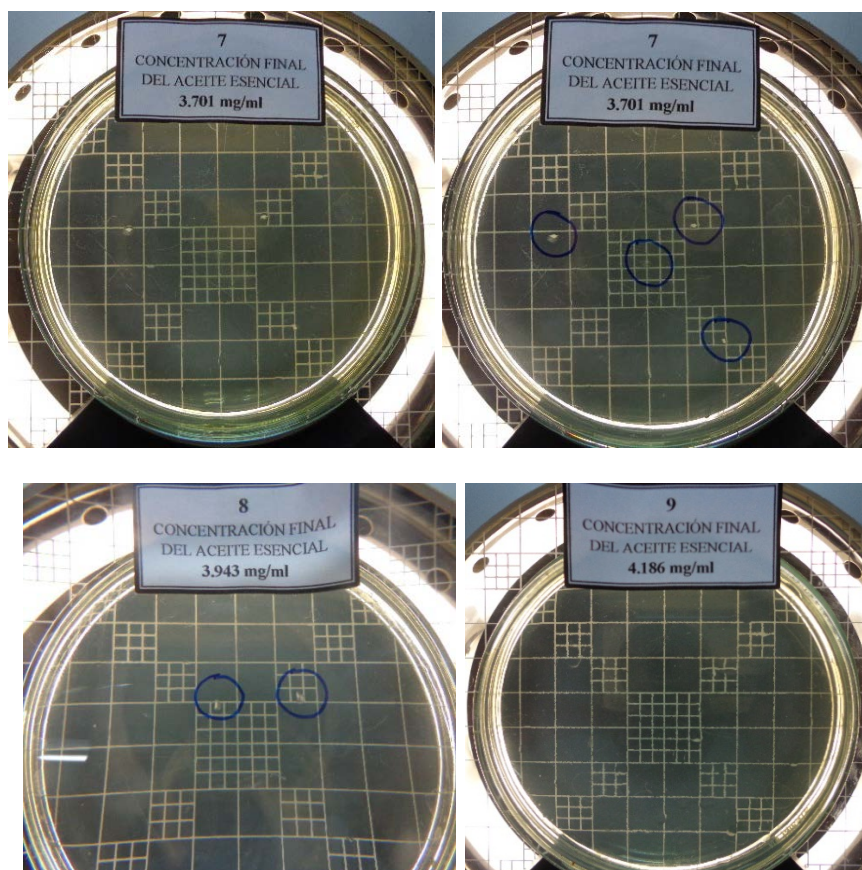
**Figura N° 12.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Obsérvese inhibición a partir del tubo N° 07.

## ANEXO N° 14.



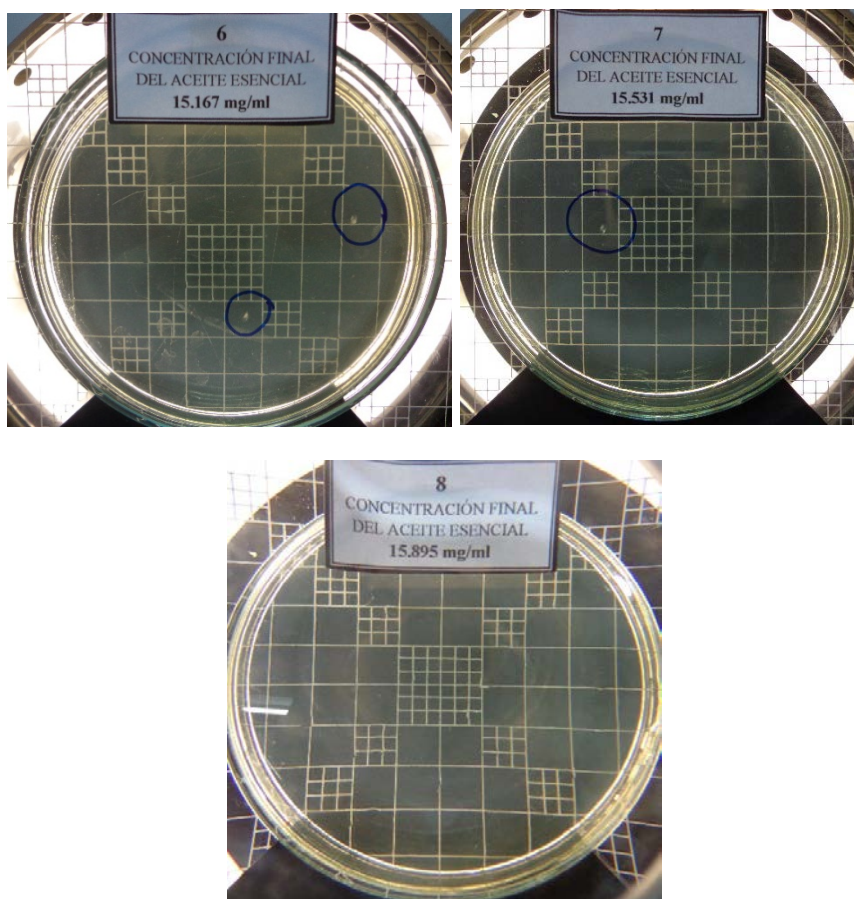
**Figura N° 13.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Obsérvese inhibición a partir del tubo N° 06.

## ANEXO N° 15.



**Figura N° 14.** Concentración Mínima Bactericida (CBM) del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Obsérvese ausencia de UFC a partir de la placa N° 09.

## ANEXO N° 16.



**Figura N° 15.** Concentración Mínima Bactericida (CBM) del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Obsérvese ausencia de UFC a partir de la placa N° 08.

## ANEXO N° 17.

### CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* P. “cedrón”:

- Color: Amarillento
- Olor: Aromático agradable (parecido al mentol)
- Sabor: Picante – Fresco no persistente
- Aspecto general: Líquido fluido y transparente

## ANEXO N° 18.

### DENSIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* P. “cedrón”:

- Probeta de 10 ml vacía = 16,2132 g
- Probeta de 10 ml con aceite = 17,4872 g
- Masa = 1,274 g
- Volumen = 1,4 ml

$$d = \frac{m}{v} \quad d = \frac{1,274 \text{ g}}{1,4 \text{ ml}} \quad d = \frac{0,91 \text{ g}}{\text{ml}}$$

**ANEXO N° 19.**

**CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla*, P.**

“cedrón”:

$$\text{cc} = 1000 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ g}$$

$$X \longrightarrow 0,91 \text{ g}$$

$$X = 910 \text{ mg/ml}$$

$$\text{cc} = 910 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \mu\text{l}$$

$$X \longrightarrow 2,5 \mu\text{l}$$

$$X = 2,275 \text{ mg/ml}$$

**ANEXO N° 20.**

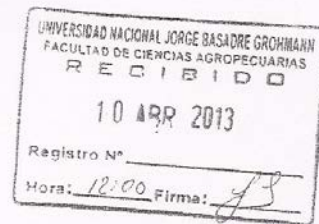
Tacna, 08 de abril del 2013

Señor:

DR. QUITERIO VALENCIA MECOLA

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Presente.-

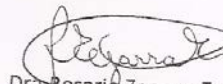



De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para manifestarle con relación a la solicitud de la Srta. Patricia Alexandra Aliaga Mamani, sobre la identificación de una especie botánica, informo que se ha procedido a identificar la muestra entregada y debo señalar que se trata de *Aloysia triphylla* "Cedrón"

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente,

  
Dra. Rosario Zegarra-Zegarra  
Profesora Principal FCAG

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS		UNJBG
PROV N°:	749	FECHA:
A :	Interesada	
PARA :	Conocimiento y fines	
		
		DECANO

## ANEXO N° 21.



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



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
 laboratorioensayoucsm@gmail.com http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**N° DE INFORME: ANA21C13.000705**

<b>Nombre del Cliente</b>	: PATRICIA ALIAGA MAMANI
<b>Dirección del Cliente</b>	: PROLONGACION OLGA GROHMAN 901 VIGIL
<b>Condición del Muestreo</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE CEDRON
<b>Envase</b>	: Tubo de ensayo con tapa
<b>Peso de Muestra</b>	: 4 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 21/02/2013
<b>Fecha de Emisión de informe</b>	: 08/03/2013
<b>Páginas</b>	: Pagina 1 de 2

**ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO:**

**Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)**

Método: Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área %)

Pico	Nombre	%
1	alpha.-Pinene	0,29
2	beta.-Phellandrene	0,97
3	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	2,73
4	Cyclobutane, 1,2-bis(1-methylethenyl)-, trans-	6,29
5	Eucalyptol	5,45
6	1,4-Hexadiene, 3,3,5-trimethyl-	1,57
7	6-Octenal, 3,7-dimethyl-, (R)-	7,57
8	Bicyclo[3,1,1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-,	1,35
9	2,6-Dimethyl-1-nonen-3-yn-5-ol	0,93
10	Carane, 4,5-epoxy-, trans	2,16
11	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)-	3,27
12	2-Isopropenyl-5-methylhex-4-enal	20,57
13	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-	1,12
14	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-	26,78
15	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate, (E)-	4,43
16	Copaene	1,31
17	Caryophyllene	1,35
18	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	0,82
19	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methy	1,77
20	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dime	2,27
21	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7	2,74
22	Caryophyllene oxide	1,93
23	1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1	0,83
24	Ar-tumerone	1,49

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez  
 CQFDA 00624  
 JEFE DE LABORATORIO 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

---

**Bach. Patricia A. Aliaga Mamani**

**Tesista**

---

**MSc. César Julio Cáceda Quiroz**

**Asesor**