

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*”**

**Tesis presentada por los Bachilleres:**

Lisete Sindy Llerena Salas  
Junior Patricio Yucra Hualla

**Para optar el Título Profesional de:**

Químico Farmacéutico

**Asesor:**

Q.F. Fernando Antero Torres Vela

**AREQUIPA – PERÚ**

**2017**

## AGRADECIMIENTOS

A la universidad Católica de Santa María y todos nuestros docentes que con sus conocimientos hicieron que todo esto sea posible

A nuestros padres por ser los pilares fundamentales en todo lo que somos, en toda nuestra educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A todas aquellas personas que colaboraron o participaron en la realización del presente trabajo de investigación como la Señora Sofía del Laboratorio de Microbiología, Jorge(patito) del Laboratorio de Análisis Clínicos y todos aquellas muchas personas que nos brindaron su ayuda incondicional. Definitivamente este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de todos los involucrados

Y a todos nuestros amigos con los que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos, a aquellos que han contribuido de una u otra manera a llevar con éxito el presente trabajo.

### **DEDICATORIA**

A Dios por ser tan maravilloso que nos dio fuerza y fe para creer lo que nos parecía imposible terminar. A nuestros padres y parejas por acompañarnos y apoyarnos a lo largo de todo este camino y que nunca dejaron de creer en nosotros y siempre estuvieron ahí impulsándonos hasta terminar esta tesis, a mis hijos y a todos los que estuvieron con nosotros y se convirtieron en cómplices de este momento inolvidable.

*“La simplicidad es lo más difícil de conseguir en este mundo, es el último límite de la experiencia y el último esfuerzo del genio”*

***George Sand***



## ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT .....	VIII
INTRODUCCIÓN .....	X
HIPÓTESIS .....	XI
OBJETIVOS.....	XII

## CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO .....	1
1. <i>Luma Chequen</i> (Molina) A. Gray .....	1
1.1. Clasificación taxonómica .....	1
1.2. Sinonimia.....	1
1.3. Descripción botánica .....	2
1.4. Distribución geográfica .....	2
1.5. Descripción fitoquímica .....	3
1.6. Usos y propiedades farmacológicas .....	3
2. Aceites esenciales.....	4
2.1. Definición .....	4
2.2. Localización.....	4
2.3. Función.....	4
2.4. Características físicas y organolépticas .....	5
2.5. Composición química.....	5
2.6. Obtención.....	7
2.7. Análisis físico-químico.....	12
2.8. Aplicaciones.....	15
3. Agentes patógenos.....	17
3.1. Bacterias .....	17
3.2. Hongos.....	29

## CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Materiales.....	33
1.1. Material biológico .....	33
1.2. Material de laboratorio .....	33
2. Reactivos.....	34
2.1. Compuestos químicos.....	34
2.2. Medios de cultivo .....	35
3. Equipos .....	35

4.	Métodos .....	36
4.1.	Obtención del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray.....	36
4.2.	Caracterización del aceite esencial.....	38
4.3.	Identificación de los agentes patógenos .....	40
4.4.	Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial .....	50
4.5.	Análisis estadístico.....	54

### CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
1. Obtención del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray.....	55
2. Caracterización del aceite esencial.....	56
2.1. Características organolépticas.....	56
2.2. Características físicas .....	57
2.3. Composición química.....	58
3. Identificación de los agentes patógenos .....	60
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	60
3.2. <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	63
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
3.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	68
3.5. <i>Candida albicans</i> .....	70
4. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial .....	71
4.1. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre <i>E. coli</i> .....	72
4.2. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre <i>P. aeruginosa</i> .....	73
4.3. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre <i>S. aureus</i> .....	74
4.4. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre <i>S. epidermidis</i> .....	76
4.5. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre <i>C. albicans</i> .....	77
4.6. Comparación de las CIMs del aceite esencial .....	78
4.7. Comparación de las CBMs/CFM del aceite esencial.....	80
CONCLUSIONES.....	82
SUGERENCIAS.....	83
BIBLIOGRAFÍA .....	84
ANEXOS.....	93

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y el efecto antifúngico sobre *Candida albicans*.

El trabajo se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Católica Santa María; en el cual el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray se evaluó para determinar sus características físicas que incluyeron: solubilidad, densidad relativa e índice de refracción; composición química, realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); y la actividad antimicrobiana mediante el método *in vitro* de microdiluciones, donde se halló la concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración fungicida mínima (CFM), contra los microorganismos antes mencionados.

El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray exhibió ser miscible en etanol al 96%, soluble en etanol al 70% (en una proporción 1:9), insoluble en agua, con una densidad relativa de 0.913g/mL, y un índice de refracción de 1.47. Los compuestos químicos presentes en mayor porcentaje son el D-limoneno (16.35%); seguido de  $\beta$ -pineno (7.14%); 2,3,5,8-tetrametildecano (6.47%); 4,5-dimetilnonano (6.14%) y nonanal (6.04%).

Por otro lado, se evidenció la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*, donde las concentraciones inhibitorias mínimas fueron 8% (80uL/mL), 20%, 5%, 5% y 5% (v/v), respectivamente. Estadísticamente, *P. aeruginosa* es la que tiene el efecto antimicrobiano más bajo; En comparación con los otros microorganismos ( $p < 0,05$ ).

Asimismo, el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presenta concentraciones bactericidas y fungicida mínimas de 10% (100uL/mL), 24%, 6%, 6% y 5% (v/v), frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*, respectivamente. El aceite esencial tiene similiar efecto antimicrobiano ( $p < 0,05$ ) frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Se concluye que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presenta un efecto antimicrobiano, *in vitro*, frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*.

Palabras clave:

1. Aceite esencial.
2. Antimicrobiano.
3. Concentración inhibitoria mínima (CIM).
4. Concentración bactericida mínima (CBM).

### ABSTRACT

In the present work of investigation there determined the antimicrobial effect of the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray on the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and the antifungal effect on *Candida albicans*.

The work was developed in the Catholic University of Santa Maria laboratories; in which, the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray was evaluated to determine its physical characteristics including: solubility, relative density and refractive index; chemical composition, performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS); and antimicrobial activity were determined by *in vitro* microdilution method, where minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and the minimum fungicidal concentration (MFC), against the aforementioned microorganisms.

Essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray exhibited being miscible in ethanol 96%, soluble in ethanol 70% (1:9 ratio), insoluble in water, with a relative density of 0.913g/mL, and a refractive index of 1.47. The chemical compounds present in the highest percentage are D-limonene (16.35%);  $\beta$ -pinene (7.14%); 2,3,5,8-tetramethyldecane (6.47%); 4,5-dimethylnonane (6.14%) and nonanal (6.04%).

On the other hand, the antimicrobial activity of the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. albicans*, where the minimal inhibitory concentrations were 8%(80uL/mL), 20%, 5%, 5% and 5% (v/v), respectively. Statistically, *P. aeruginosa* is the one with the lowest antimicrobial effect; Compared with the other microorganisms ( $p < 0.05$ ).

Also, the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray has minimal bactericidal and fungicidal concentrations of 10%(100uL/mL), 24%, 6%, 6% y 5%(v/v), against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. albicans*, respectively. The essential oil has a similar antimicrobial effect ( $p < 0.05$ ) against *S. aureus* and *S. epidermidis*.

It is concluded that essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray has an antimicrobial effect, *in vitro*, against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. albicans*.

Keywords:

1. Essential oil.
2. Antimicrobial.
3. Minimum inhibitory concentration (MIC).
4. Minimum bactericidal concentration (MBC).

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, son reconocidos como los principales causantes de distintas enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos. Aunque, se han desarrollado medicamentos antimicrobianos eficaces a lo largo de los años, se ha observado un incremento en la resistencia de los microorganismos hacia estos medicamentos.<sup>1</sup> Debido a esto, se requiere el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos. Las plantas medicinales son las principales fuentes de compuestos bioactivos, los cuales pueden llegar a ser compuestos para el desarrollo de diferentes productos farmacéuticos.<sup>2</sup>

Los aceites esenciales son antimicrobianos naturales que se encuentran presentes en muchas plantas y son capaces de disminuir el crecimiento y la supervivencia de microorganismos, entre ellos a las bacterias y los hongos.<sup>3</sup> La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales esta correlacionada directamente con la presencia de componentes volátiles bioactivos, tales como: terpenos (mono-, sesqui- y diterpenos), alcoholes, ácidos, ésteres, epóxidos, aldehídos, cetonas, aminas y sulfuros.<sup>4</sup> La acción antimicrobiana de los aceites esenciales puede ser atribuida a su capacidad de penetrar a través de las membranas de los microorganismos e inhibir propiedades funcionales y lipofílicas de la célula.<sup>5</sup>

*Luma chequen* (Molina) A. Gray es una planta nativa del Perú, esta planta es conocida en la medicina tradicional como “Arrayán”.<sup>6</sup> Además, a esta planta se le atribuyen propiedades como: antirreumático, antidiarreico, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico.<sup>7</sup> El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presenta como componentes principales a los terpenos: D-limoneno,  $\alpha$ -pineno, eucaliptol y el linalol.<sup>6,8</sup>

El objetivo de este estudio fue identificar la composición química y evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray contra diferentes microorganismos, con el fin de validar su uso tradicional.

## HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes en la medicina tradicional que indican la actividad antiséptica de *Luma chequen* (Molina) A. Gray; es probable que el aceite esencial de éste material vegetal tenga efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

## OBJETIVOS

1. Obtener y caracterizar el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. (arrayán).
2. Identificar los metabolitos presentes en el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, mediante Cromatografía de gases.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, sobre los microorganismos en estudio.
4. Determinar la concentración bactericida y fungicida mínima (CBM o CFM) del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, sobre los microorganismos en estudio.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. *Luma Chequen* (Molina) A. Gray

##### 1.1. Clasificación taxonómica

La categoría taxonómica en la cual se ubica el organismo vegetal empleado en el presente estudio, la clasificación según el laboratorio de la facultad de Ciencias Biológicas del Departamento académico de Biología *HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)* de la Universidad Nacional de San Agustín, corresponde a:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Subclase: *Rosidae*
- Orden: *Myrtales*
- Familia: *Myrtaceae*
- Género: *Luma*
- Especie: *Luma chequen* (Molina) A. Gray

##### 1.2. Sinonimia

###### 1.2.1. Sinonimia Científica

*Eugenia chequen* Molina, *Myrtus chequen*, *Luma gayana*.<sup>9</sup>

###### 1.2.2. Sinonimia Vulgar

“Arrayán”, “Wallpuma”, “Rayán Castilla” y “Luma”.<sup>10</sup>

### 1.3. Descripción botánica

Es un arbusto coposo y de follaje denso, que alcanza una altura de 5 – 6 m y una cobertura de 5 m de diámetro.<sup>10</sup>

- Tallo: Es leñoso y ramificado desde la base, con una corteza rojiza.
- Hojas: Son perennes, opuestas, sin estípulas, pecioladas, aromáticas y presentan un limbo ovoide y coriáceo.
- Flores: Son blancas, solitarias, axilares, hermafroditas, actinomorfas y tetrámeras. Presentan numerosos estambres libres y pistilo pequeño. Los episodios de floración han sido registrados mayormente entre los meses de marzo y junio.
- Frutos: Son drupas, con pocas semillas y escasa endosperma. La fructificación ha sido registrada entre los meses de enero y mayo.<sup>7,11</sup>

En la **Fig. 1** se observa la ilustración de *Luma Chequen* (Molina) A. Gray con sus rasgos característicos.



**Fig. 1** *Luma Chequen* (Molina) A. Gray.<sup>12</sup>

### 1.4. Distribución geográfica

El Arrayán se desarrolla a una altura de 2500 - 4000 m.s.n.m., en los andes sudamericanos.<sup>10,13</sup> En el Perú, se encuentra principalmente en la zona centro-sur

del país, resaltando su presencia en los distritos de la provincia de La Unión en el departamento de Arequipa: Charcana, Cotahuasi, Huaynacotas, Pampamarca, Quechualla, Sayla, Tauria y Toro.<sup>6</sup> Además, frecuentemente crece en lugares húmedos y en jardines como una planta ornamental.<sup>13</sup>

### 1.5. Descripción fitoquímica

Se ha encontrado que la *Luma Chequen* (Molina) A. Gray, presenta los siguientes metabolitos: flavonoides (quercetina, rutina, quercetin-3-metil éter y lumaflavonoides), terpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, eucaliptol, linalol,  $\beta$ -selineno), taninos, esteroides, vitamina C, antocianidinas, ácidos (cítrico, tánico y málico) y heterósidos.<sup>7</sup>

Los principales componentes reportados del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray son los terpenos: D-limoneno,  $\alpha$ -pineno, eucaliptol y el linalol.<sup>6,8</sup>

### 1.6. Usos y propiedades farmacológicas

La infusión de las hojas de Arrayán se utiliza como un excelente expectorante en el tratamiento de diversas enfermedades respiratorias; su decocción se utiliza para tratar la migraña, y se recomiendan baños en “agua de Arrayán” para el tratamiento del dolor muscular y malestar general.<sup>10</sup>

Se han reportado otros usos de las hojas y ramas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, los cuales incluyen el tratamiento de: trastornos gastrointestinales, infecciones post-parto y dolor de muelas. Se ha demostrado su efecto fungistático,<sup>13</sup> su capacidad antioxidante, su actividad antimicrobiana y su actividad hipocolesterolémica.<sup>14</sup>

Además, se le atribuye propiedades como: antirreumático, antidiarreico, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico.<sup>7</sup>

## 2. Aceites esenciales

### 2.1. Definición

Los aceites esenciales son sustancias líquidas, aromáticas y volátiles situadas en cualquier parte del vegetal, conformados por un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas (alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas, etc.). En general se obtienen a través del mecanismo de destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal.<sup>15</sup>

Bajo la denominación de Aceites Esenciales (AEs) se agrupan las sustancias volátiles obtenidas mediante procesos físicos a partir de especies vegetales aromáticas, caracterizadas por una composición compleja, en la que predominan derivados terpénicos (mono- y sesquiterpénicos) y fenilpropánicos; pueden ser considerados como el grupo fitoquímico más importante dentro de aquellos que confieren olor a las especies vegetales que lo contienen. Debido a su aspecto oleoso y a la capacidad de evaporarse cuando se exponen al aire a temperatura ambiente, se denominan también *aceites volátiles*, siendo arrastrables en corriente de vapor de agua. Por lo general, reciben el nombre de la especie de la que proceden, como aceite de tomillo, aceite esencial de salvia, etc.<sup>16</sup>

### 2.2. Localización

Los compuestos aromáticos son formados por el vegetal como sub-productos o productos metabólicos finales, para luego ser almacenados en ciertos órganos de la planta<sup>18</sup> (flores, hojas, raíces, frutos, etc.), de diferentes familias, de los cuales *Myrtaceae*, *Lamiaceae* y *Rutaceae*, presentan un alto contenido de compuestos aromáticos volátiles.<sup>19</sup>

### 2.3. Función

Los aceites esenciales cumplen un rol importante en la protección de las plantas contra microorganismos patógenos, pueden ser insecticidas e incluso actúan

contra herbívoros (reduciendo su apetito). También pueden atraer algunos insectos que favorecen la dispersión de la semilla o repelen otros no deseados.<sup>4,17</sup>

#### **2.4. Características físicas y organolépticas**

Pese a las diferencias de composición entre los distintos aceites esenciales se puede afirmar que presentan una serie de propiedades físicas comunes: a temperatura ambiente son líquidos incoloros o amarillentos, con menor densidad que el agua (salvo algunas excepciones como el aceite de canela, sazafrán o clavo de olor), escasamente hidrosolubles, con alto índice de refracción, poder rotatorio y solubles en alcohol, éter, solventes orgánicos no polares y en aceites fijos o lípidos. En cuanto a sus características organolépticas las mismas pueden estar dadas por los componentes mayoritarios, mientras que en otros casos son sustancias presentes en trazas las que definen el sabor, olor o las propiedades terapéuticas.  
(15,16)

#### **2.5. Composición química**

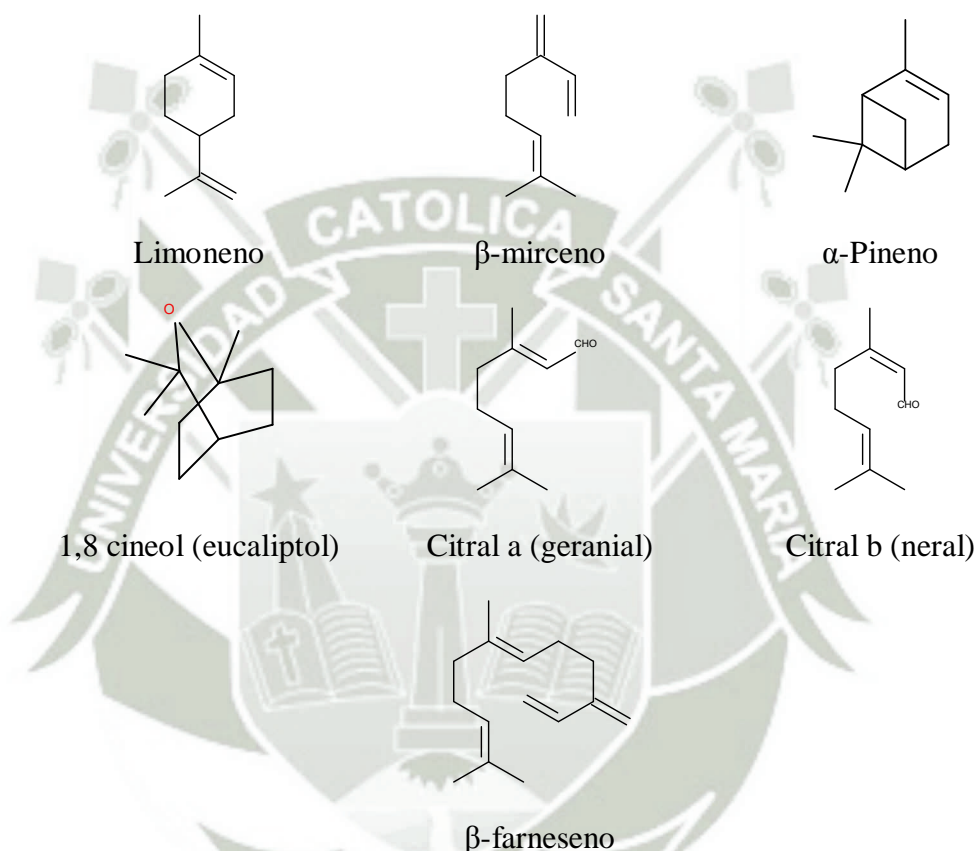
Como se mencionó anteriormente, los aceites esenciales son mezclas complejas<sup>4</sup> que contienen alrededor de 20 a 60 componentes en concentraciones muy diferentes.<sup>20</sup> De acuerdo a la vía de síntesis, los aceites esenciales pueden ser clasificados en dos principales grupos: compuestos hidrocarbonados y oxigenados.<sup>18</sup>

##### **2.5.1. Compuestos hidrocarbonados**

Se le denomina también el grupo de los terpenoides por lo que se incluye a los terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y sus derivados oxigenados. Estructuralmente constituyen unidades de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno).<sup>18</sup>

La biosíntesis se produce por las vías mevalonato y no-mevalonato (fosfato de desoxixilulosa); éstas vías, involucran a dos precursores: isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP).<sup>21</sup>

La **Fig. 2** muestra ejemplos de algunos constituyentes terpénicos y derivados en aceites esenciales:<sup>18</sup>



**Fig. 2** Ejemplos de compuestos terpénicos presentes en los aceites esenciales

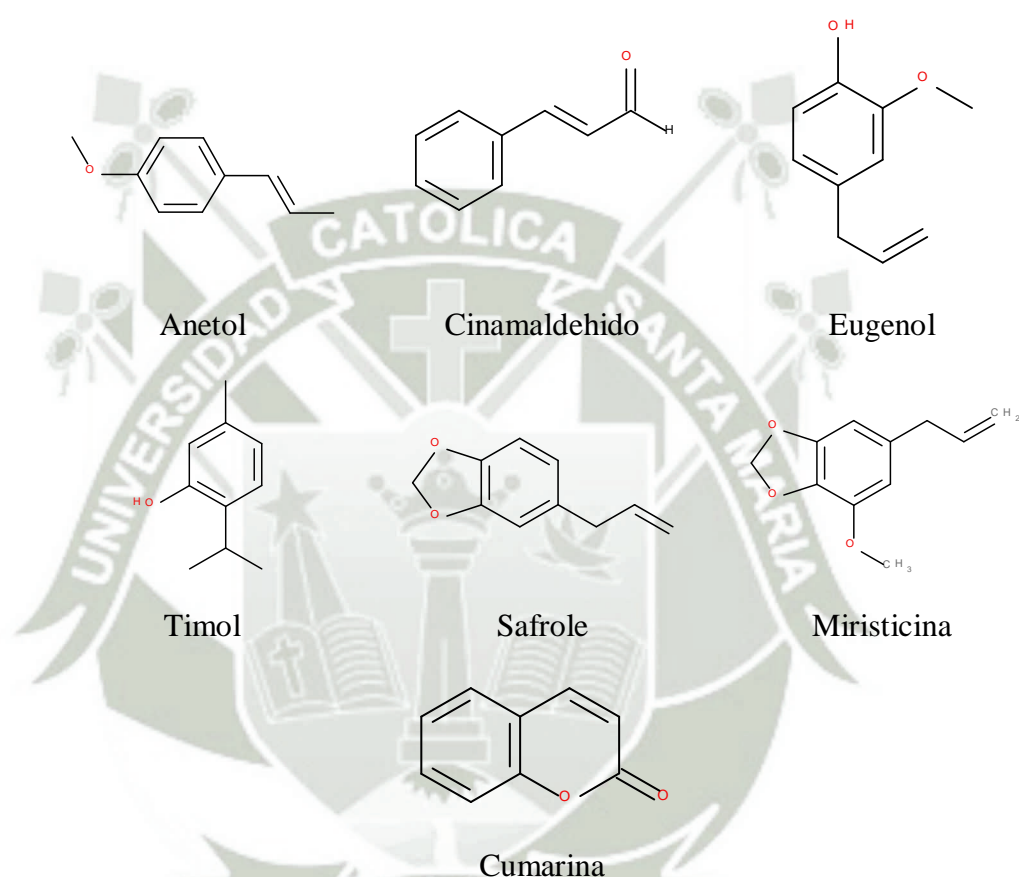
Fuente: elaboración propia.

### 2.5.2. Compuestos oxigenados

Denominado también el grupo de los fenilpropanoides. Éste grupo incluye a los alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, fenoles, lactonas, ésteres y óxidos.<sup>22</sup>

Son bio-sintetizados por la vía del ácido shikímico; además, se produce de forma intermediaria la fenilalanina y tirosina, dando origen a los principales precursores que son el ácido cinámico y ácido p-hidroxicinámico.<sup>21</sup>

La **Fig. 3** muestra ejemplos de algunos compuestos oxigenados presentes en aceites esenciales.<sup>18,22</sup>



**Fig. 3** Ejemplos de compuestos orgánicos presentes en los aceites esenciales

Fuente: elaboración propia.

## 2.6. Obtención

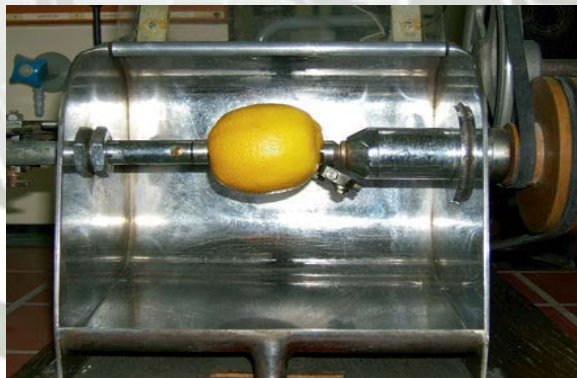
Como se observó en la definición de los aceites esenciales, la obtención se realiza por procesos físicos que incluyen la destilación y medios mecánicos (expresión).<sup>18</sup> Normalmente el rendimiento de aceites esenciales de plantas es entre 0.005% - 10%.<sup>18</sup> La expresión es probablemente el método más antiguo para la

obtención de aceites esenciales de cítricos; la hidrodestilación, es el más utilizado; y la destilación seca es raramente utilizada.<sup>17</sup>

### 2.6.1. Expresión

Denominado también prensado o expresión en frío, éste método es una extracción de aceites esenciales sin involucrar calor, especialmente de cítricos. Consiste en apretar el pericarpio del cítrico a temperatura ambiente, para liberar los aceites esenciales de éste y es lavado con agua. Posteriormente se aíslan los aceites esenciales por decantación y/o centrifugación.<sup>19</sup>

La **Fig. 4** muestra el esquema de un equipo utilizado para el proceso mecánico de éste método; además, los equipos utilizados para extraer aceites esenciales de las cáscaras de los cítricos (luego de la eliminación de los zumos y pulpa), se conocen como Sfumatrici, mientras que los equipos para procesar la fruta entera se denominan Pelatrici.<sup>17,19</sup>



**Fig. 4** Esquema del método de obtención de aceites esenciales por expresión.<sup>19</sup>

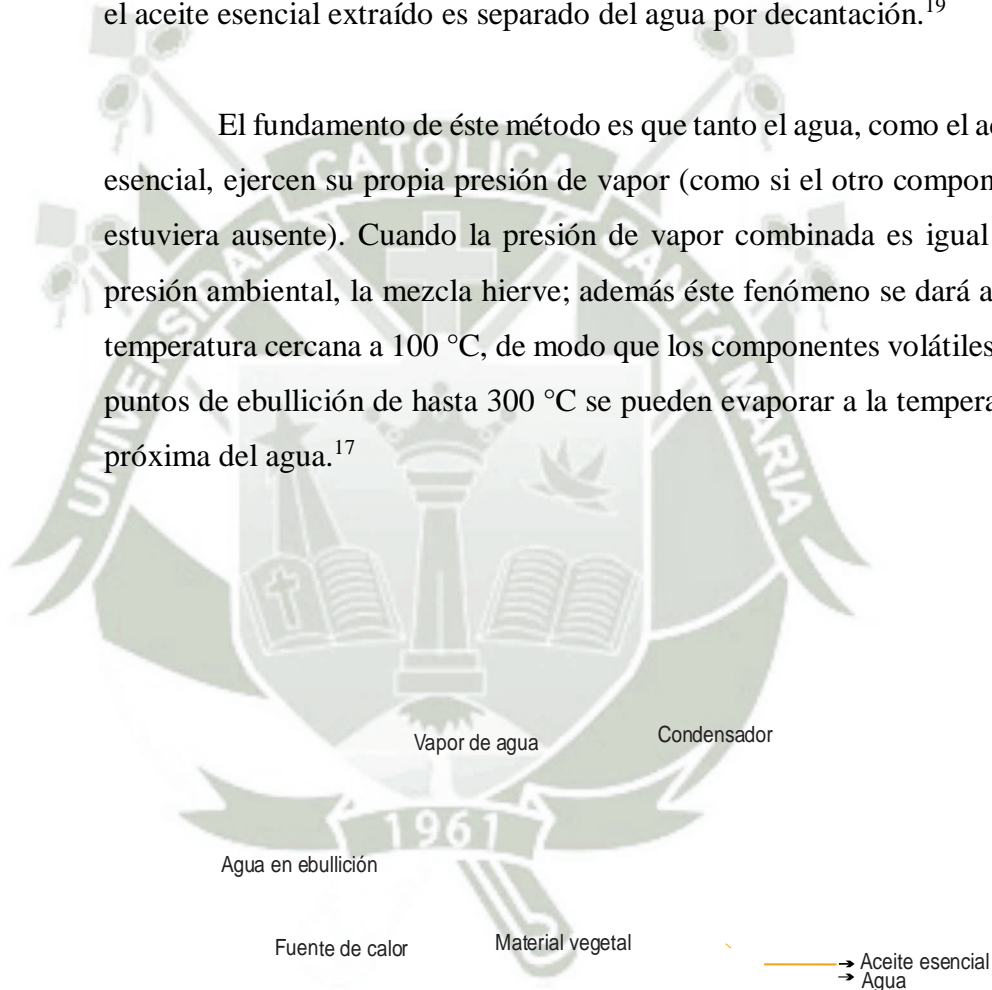
### 2.6.2. Destilación por arrastre de vapor

Hay tres posibilidades, que se aplican según las características de la droga.

### 2.6.2.1. Método de inyección de vapor de agua

Éste método es denominado también “arrastre de vapor”, y es el más utilizado para la obtención de aceites esenciales. Como se observa en la **Fig. 5**, la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor consiste en la generación de vapor de agua que es conducido hacia el material vegetal para luego pasar por medio de un condensador o refrigerante, recolectándose el agua junto al aceite esencial en un recipiente; finalmente, el aceite esencial extraído es separado del agua por decantación.<sup>19</sup>

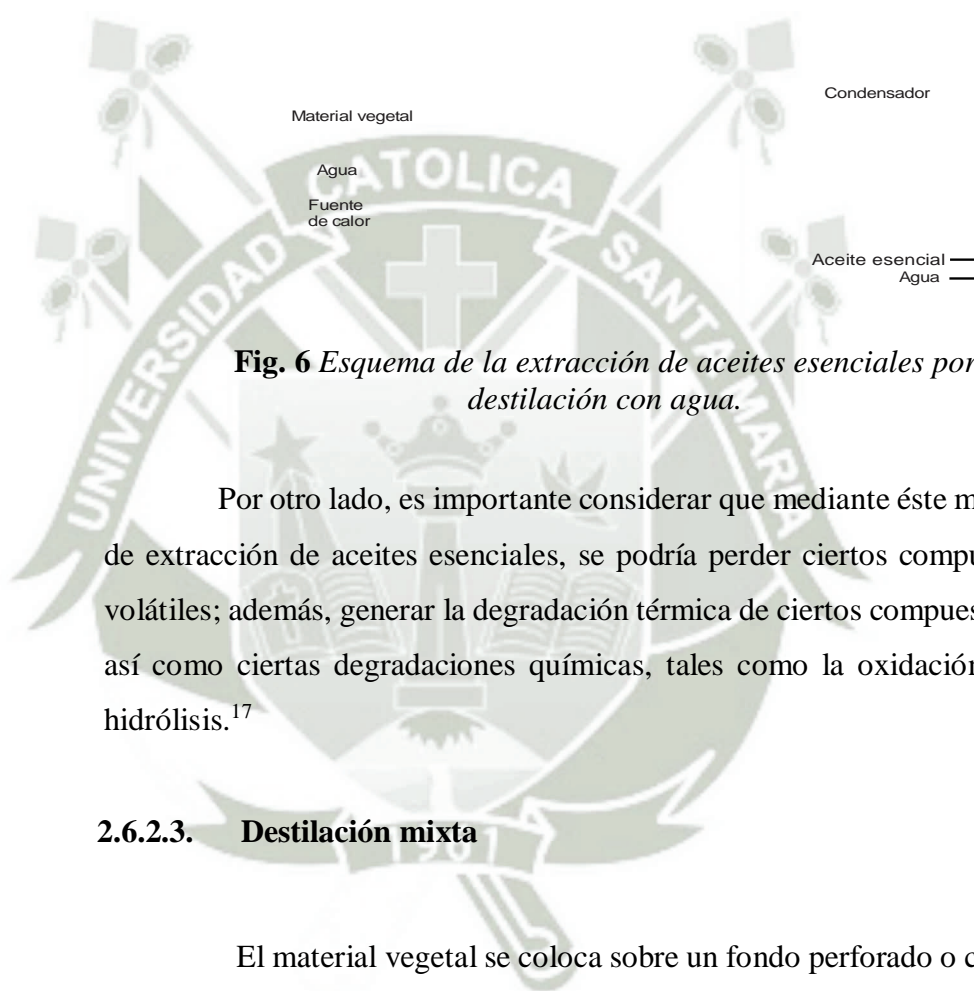
El fundamento de éste método es que tanto el agua, como el aceite esencial, ejercen su propia presión de vapor (como si el otro componente estuviera ausente). Cuando la presión de vapor combinada es igual a la presión ambiental, la mezcla hierve; además éste fenómeno se dará a una temperatura cercana a 100 °C, de modo que los componentes volátiles con puntos de ebullición de hasta 300 °C se pueden evaporar a la temperatura próxima del agua.<sup>17</sup>



**Fig. 5** Esquema de la extracción de aceites esenciales por destilación con vapor.

### 2.6.2.2. Hidrodestilación

Ésta forma de obtención de aceites esenciales es similar, en muchos aspectos, a la destilación con vapor, con excepción de que el material vegetal está en contacto directo con el agua a ebullición, tal como se observa en la **Fig. 6**. Éste método es recomendado por la Farmacopea Francesa, para la extracción de aceites esenciales de especias secas.<sup>19</sup>

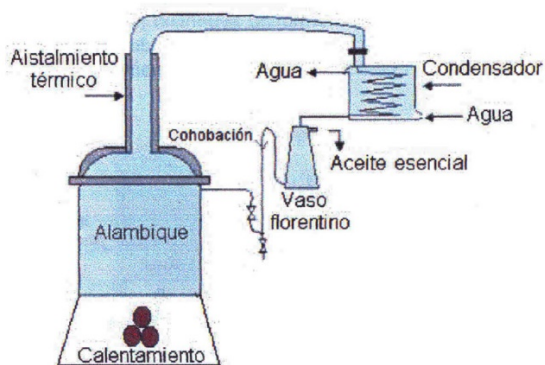


**Fig. 6** Esquema de la extracción de aceites esenciales por destilación con agua.

Por otro lado, es importante considerar que mediante éste método de extracción de aceites esenciales, se podría perder ciertos compuestos volátiles; además, generar la degradación térmica de ciertos compuestos,<sup>23</sup> así como ciertas degradaciones químicas, tales como la oxidación y la hidrólisis.<sup>17</sup>

### 2.6.2.3. Destilación mixta

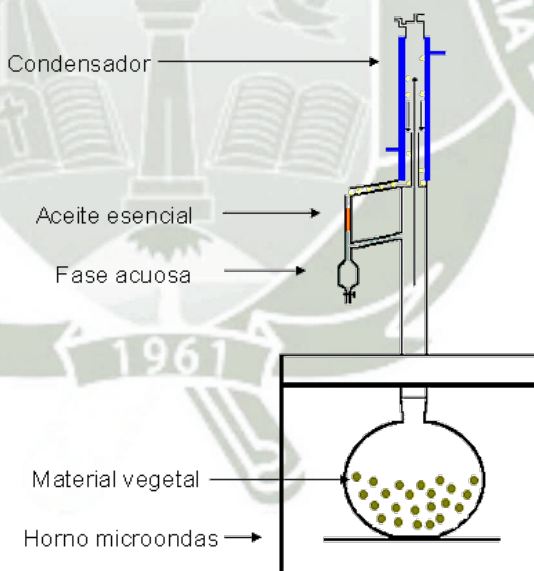
El material vegetal se coloca sobre un fondo perforado o criba a cierta distancia del fondo de un tanque llamado retorta. La parte más baja de esta contiene agua hasta la altura algo menor que en el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal.<sup>24</sup>



**Fig. 7** Destilación con vapor de Aceites Esenciales.

### 2.6.3. Destilación seca

Es un método que se aplica para la extracción de aceites esenciales de partes difíciles como cortezas, ramas y raíces, como es el caso de *Betula lenta*, *Betula alba* o *Juniperus oxycedrus*.<sup>19</sup> La **Fig. 8** muestra el esquema de la extracción de aceites esenciales por destilación seca asistido por un horno microondas como fuente de calor.<sup>25</sup>



**Fig. 8** Esquema de la extracción de aceites esenciales por destilación seca asistido con horno microondas.<sup>25</sup>

## 2.7. Análisis físico-químico

El análisis de los aceites esenciales presenta utilidad para la caracterización física y química de estos productos; además, la detección de adulteraciones.<sup>17</sup> A continuación, se presenta los análisis de laboratorio frecuentes que se realizan en los aceites esenciales.

### 2.7.1. Densidad relativa

La densidad relativa está definida por la proporción de las densidades de un aceite esencial y del agua a una determinada temperatura. El valor es característico de cada aceite esencial y normalmente se encuentra entre 0.696 – 1.118 a 15 °C.<sup>17</sup>

### 2.7.2. Índice de refracción

El índice de refracción corresponde a la proporción del seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un haz de luz de un medio de menor a otro de mayor densidad (de aire al aceite esencial). El valor es característico de un aceite esencial y frecuentemente se encuentra entre los valores 1.450 – 1.590.<sup>17</sup>

### 2.7.3. Solubilidad

Como se mencionó anteriormente, los aceites esenciales se separan del agua por decantación, este proceso se debe a que estos productos son casi insolubles en agua. Éste análisis puede ser aplicado para evaluar la pureza de los aceites esenciales, ya que la solubilidad en agua indicaría la presencia de compuestos polares como alcoholes, acetatos de glicerina, entre otros. Por otro lado, los aceites esenciales son miscibles con etanol absoluto; y en general, aceites esenciales que contienen considerables cantidades de compuestos

oxigenados son más solubles en alcohol diluido que los que contienen principalmente hidrocarburos.<sup>17,26</sup>

#### **2.7.4. Análisis de la composición química**

Los aceites esenciales frecuentemente son analizados por técnicas cromatográficas, debido a que permite la separación, identificación y hasta cuantificación (dependiendo de la técnica), de compuestos o grupo de compuestos presentes en los aceites esenciales.<sup>17</sup>

La cromatografía es un término general que se aplica a ciertas técnicas de separación de compuestos presentes en una mezcla (líquida o gaseosa) mediante un proceso físico-químico. Éste método se basa en el equilibrio de los componentes de interés entre dos fases inmiscibles, una fase estacionaria y la otra, fase móvil; ésta última fase fluye a través de la fase estacionaria en una dirección determinada y lleva consigo a los compuestos de interés.<sup>27</sup>

##### **2.7.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC)**

Conocido también como cromatografía planar, en ésta técnica la fase estacionaria (generalmente gel de sílice) se distribuye como una capa delgada, sobre una superficie plana que puede ser vidrio, plástico o aluminio; la fase móvil (mezcla de solventes) asciende a través de la fase estacionaria por fuerzas capilares. La TLC es rápida, barata y ampliamente utilizada como una técnica preliminar que proporciona información valiosa (cualitativa e incluso semi-cuantitativa), para un análisis posterior más complejo.<sup>27,28</sup>

La interpretación de datos se hace a través del cálculo del valor “Ratio of front” (Rf) para cada punto o mancha, según la Ecuación (1).

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_{st}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Dónde:  $Z_s$  es la distancia desde el punto de partida hasta el centro de un punto o mancha específica y  $Z_{st}$  es la distancia desde el punto de partida hasta el punto al que subió la fase móvil. El valor de  $R_f$  es característico para todo compuesto, utilizando las mismas fases estacionaria y móvil, por lo que es de gran ayuda en la identificación de una sustancia desconocida.<sup>17,27</sup>

#### 2.7.4.2. Cromatografía de gases (GC)

En ésta técnica, la fase estacionaria corresponde a un líquido o sólido (polisiloxanos o polietilenglicoles), mientras que la fase móvil es un gas (normalmente helio, nitrógeno o hidrógeno), y su rol es solamente mecánico, que transporta el analito a través de una columna. El tiempo de retención del soluto es afectado solamente por la presión de vapor que depende de la temperatura y la interacción intermolecular entre el analito y la fase estacionaria.<sup>29</sup> un cromatógrafo de gases se compone principalmente del inyector (por donde se introduce la muestra en forma gaseosa o líquida, tiene la función de vaporizar la muestra y mezclarlo con el gas), la columna (tubo estrecho enrollado alrededor de sí mismo, de longitud variable que va desde 1m a 100m y se encuentra en un horno termostáticamente controlada), y el detector (frecuentemente utilizados los de Ionización de llamas, FID, o de espectrometría de masas, MS).<sup>27</sup> La técnica combinada GC-MS es de mucha utilidad si se usa con bibliotecas fiables, comercialmente disponibles.<sup>21</sup>

Es considerado como una de las técnica más importante para el análisis de aceites esenciales<sup>21</sup> que puede ser utilizado con fines comparativos, en el que un aceite esencial se contrasta con otro(s), para la

caracterización químicamente de los aceites esenciales, para descubrir nuevos componentes, para el control de calidad o para la búsqueda e identificación de adulterantes.<sup>30</sup>

## 2.8. Aplicaciones

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en diversas industrias tales como: alimentaria, perfume, fragancia, farmacéutica, agrícola, entre otras. Su aplicación se debe principalmente a sus propiedades antimicrobiana, antioxidante e insecticida.<sup>4,17</sup>

### 2.8.1. Antimicrobianos

Desde hace muchos años, los aceites esenciales (de diferentes fuentes) han sido reconocidos por su potencial actividad antimicrobiana<sup>3</sup> observado en la naturaleza<sup>31</sup> y demostrado posteriormente por diversos estudios.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales es ampliamente estudiada y se reporta que la inhibición del crecimiento bacteriano depende de la composición química (específicamente del compuesto que mayoritariamente forma parte del aceite esencial); además, el grado del efecto antibacteriano puede diferir con las especies bacterianas. Se demostró la efectividad contra diversas especies de bacterias que pueden ser patógenos para seres humanos, animales y/o plantas. Entre las bacterias utilizadas por diversos estudios se encuentran: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre muchas otras más. Muchos de los estudios sobre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales concluyen que estos productos presentan un uso potencial como antibacterianos, e incluso refieren de interés farmacéutico.<sup>2,3,32</sup> Además, como refiere Dharan, et al., ciertos aceites esenciales incluso podrían tener

actividad bactericida frente a *M. tuberculosis* que podrían ser utilizados como una terapia de inhalación.<sup>33</sup>

Por otro lado, también se demostró el efecto de inhibición del crecimiento de diferentes especies de hongos de diversos géneros tales como: *Candida*, *Streptomyces*, *Fusarium*, *Microsporium*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Saccharomyces*, entre otros.<sup>17</sup>

Además, ciertos aceites esenciales que, utilizándolos en sistemas alimentarios brindan agradables características sensoriales,<sup>34</sup> y aprovechando su actividad antimicrobiana, muchos estudios recomiendan el uso de aceites esenciales como biopreservantes.<sup>3,5</sup>

### 2.8.2. Antioxidantes

Entre las propiedades que se les atribuye a diversos aceites esenciales está la capacidad antioxidante, y fue demostrado por varios estudios.<sup>35,36</sup> *Luma chequen* (Molina) A. Gray, “Arrayán”, vegetal utilizado en el presente estudio, también mostró una actividad antioxidante.<sup>7</sup>

Por otro lado, se sabe que ciertos procesos de oxidación (naturales o por la aplicación de ciertas tecnologías) que se desarrollan en productos a base de materiales biológicos (como alimentos procesados), pueden dar lugar a compuestos potencialmente tóxicos o producir características organolépticas indeseables;<sup>20,36</sup> entonces, muchas veces es necesario el uso de agentes antioxidantes, y con la intención de evitar algún efecto tóxico por el empleo de productos sintéticos,<sup>36</sup> se busca compuestos de origen biológico, por lo que va en aumento el interés de los aceites esenciales en la industria farmacéutica y de los alimentos.<sup>35</sup>

### 2.8.3. Repelentes

Muchos aceites esenciales tienen la capacidad de repeler insectos e incluso actuar como insecticidas. Además, en la búsqueda de compuestos naturales con este fin y como reemplazo de sustancias sintéticas que presentan un impacto desfavorable sobre el medio ambiente y la seguridad alimentaria, se demostró la eficacia de diversos aceites esenciales como repelentes de insectos y para el manejo de plagas en la agricultura.<sup>37</sup>

## 3. Agentes patógenos

Un agente patógeno es aquel microorganismo que puede causar una enfermedad a su huésped. En este proceso el agente patógeno deriva energía para su crecimiento y reproducción sin ningún beneficio para el huésped.<sup>38</sup>

### 3.1. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares, que presentan tamaño y forma muy variables; a menudo una especie en particular posee más de una forma (pleomórfico). Estas pertenecen al reino procariota, junto con las algas azul-verdosas. Las principales características de este reino son la falta de una membrana entre el nucleoplasma y el citoplasma, la falta de orgánulos citoplasmáticos membranosos y la presencia de peptidoglicano en las paredes celulares.<sup>39</sup>

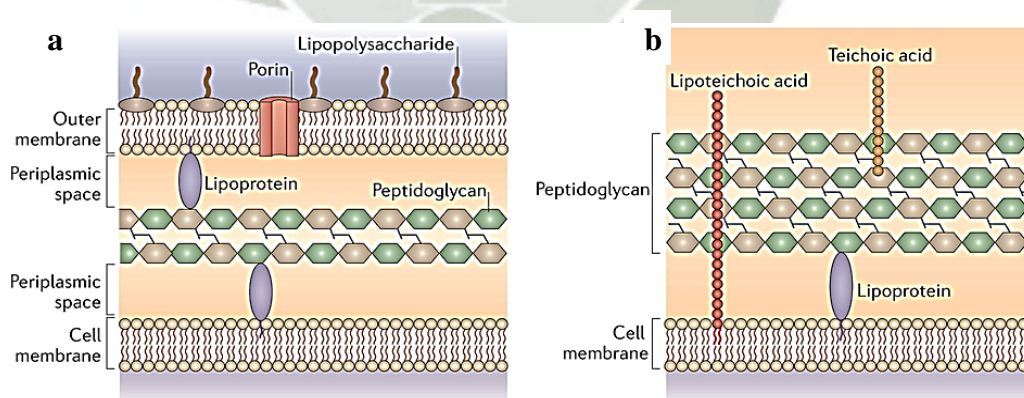
Las formas morfológicas principales de las bacterias son: los cocos, que son elipsoidales o esféricos; los bacilos, que son cilíndricos o en forma de varilla y las espirillas, que son en forma de espiral o helicoidal. Dentro de las espirillas se incluye al vibrio, que presenta forma de hélice rudimentaria.<sup>38</sup>

Las bacterias presentan mucha versatilidad en sus capacidades nutricionales. La mayoría de estas, tienen necesidades de macro y micro nutrientes similares a las plantas superiores. Algunas poseen la capacidad de síntesis necesaria para producir sus requerimientos nutricionales, mientras que otras requieren de un suministro externo de factores de crecimiento específicos. Además, al igual que con otros

organismos vivos, las bacterias requieren un suministro de agua. Sus requerimientos de temperatura y pH varían ampliamente, algunas sobreviven a temperaturas y pHs extremos. Por otro lado, el oxígeno es necesario para algunas bacterias, mientras que otras tienen otros modos de vida: anaeróbico, anaerobio facultativo o microaerofílico. Asimismo, algunas utilizan nitrógeno atmosférico, mientras que otras requieren nitrógeno inorgánico en forma de nitratos, nitritos o amoníaco y un grupo adicional utilizan compuestos orgánicos, tales como proteínas o aminoácidos.<sup>38</sup>

Por lo general, el primer paso en la identificación de una cepa bacteriana desconocida es la tinción de Gram. Este procedimiento proporciona información útil acerca de la forma y tamaño de las células, y permite clasificarlas en categorías generales de Gram-negativas y Gram-positivas.<sup>40</sup>

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas difieren drásticamente en la organización de las estructuras que se encuentran fuera de la membrana plasmática, pero por debajo de la cápsula. En las Gram-negativas estas estructuras constituyen la envoltura celular, mientras que en las Gram-positivas se les conoce como pared celular.<sup>41</sup> En la **Fig. 9** se ilustra las diferencias estructurales entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.



**Fig. 9** Estructura de la pared celular de (a) una bacteria gram-negativa y (b) una bacteria gram-positiva.<sup>42</sup>

### 3.1.1. Bacterias Gram-negativas

Las bacterias gram-negativas están rodeados por una delgada capa de peptidoglicano en el espacio periplásmico entre las membranas lipídicas interna y externa. La membrana externa contiene lipopolisacáridos; además, presenta canales tales como porinas o transportadores especializados que facilitan el transporte a través de la membrana (**Fig. 9**).<sup>43</sup>

Las bacterias Gram-negativas patógenas, presentan factores de virulencia tales como: colagenasas, hialuronidasas, proteasas y beta-lactamasas; que se encuentran en el espacio periplásmico. Por otro lado, la membrana bacteriana externa que poseen las Gram-negativas, permite mantener la estructura y es una barrera permeable que impide el paso de grandes moléculas (lisozima, antibióticos) y moléculas hidrófobas. Además, esta membrana provee protección frente a condiciones ambientales adversas, como es el caso del sistema digestivo del huésped. También, se debe precisar que la membrana externa y el canal de porina permiten el paso de metabolitos y antibióticos hidrófilos pequeños.<sup>44</sup>

Los lipopolisacáridos son endotoxinas, que pueden estimular la respuesta inmune del huésped; mediante la activación de linfocitos B y la inducción de macrófagos y otras células, provocando la liberación de interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6, factor de necrosis tumoral y otros factores.<sup>45</sup>

#### 3.1.1.1. *Escherichia coli*

##### 3.1.1.1.1. Características morfológicas

Las cepas de *Escherichia coli* son bacterias Gram-negativas, tienen forma de barra con extremos redondeados, no son formadoras de esporas y por lo general son móviles por medio de flagelación peritrica. Además, muchas de estas bacterias presentan capsula, la cual está compuesta por polisacáridos. Asimismo, la E. coli exhibe fimbrias (o pili) de estructuras variadas y especificidad antigénica; estas fimbrias son

hidrófobas, debido a esto la bacteria presenta capacidad adhesión.<sup>46</sup> Además, la *E. coli* crece rápidamente sobre medios bacteriológicos simples. En agar MacConkey forma grandes colonias de color rojo y en agar EMB forma colonias con un brillo verde característico.<sup>47,48</sup>

### 3.1.1.1.2. Características bioquímicas

La mayoría de cepas de *E. coli* pueden fermentar la lactosa, y en presencia de lactosa también presentan una reacción positiva con el orto-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (ONPG) a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La *E. coli* produce indol a partir del aminoácido triptófano por acción de la enzima triptofanasa, y esta es una característica distintiva de la *E. coli* en comparación con otras bacterias entéricas.<sup>49</sup>

**Tabla N° 1** Características bioquímicas de la *E. coli*.<sup>50</sup>

Características	Reacción
Motilidad	+, algunas no son móviles
Crecimiento aeróbico y anaeróbico	+
Oxidasa/Catalasa	-/+
Lactosa	Ácido +, gas +
Sacarosa/D-glucosa	Ácido +
Indol	+
Rojo metilo/ Voges-Proskauer	+/-
Urea	No hidrólisis
H <sub>2</sub> S	-
Licuefacción de gelatina	-
Ácido glutámico descarboxilasa	+
Lisina descarboxilasa	+

### 3.1.1.1.3. Patogenia

Diferentes serogrupos de *E. coli* han sido identificados y la mayoría no son patógenos; sin embargo, algunos grupos pueden causar enfermedades diarreicas graves, en ocasiones con desenlace fatal. La *E. coli* es de origen fecal y se encuentra casi exclusivamente en el tracto digestivo de los animales homeotermos, principalmente los humanos. Debido a esto, la detección de *E. coli* en el agua potable se utiliza como

un indicador de la contaminación fecal y se conoce como el índice de coliformes.<sup>51</sup>

De acuerdo con su potencial patógeno, la *E. coli* se divide en grupos no patógenos y patógenos. Aunque, la *E. coli* no patógena se presenta como un comensal en el intestino de animales homeotermos, es posible que pueda estar implicada en infecciones oportunistas. Por otra parte, la *E. coli* patógena es responsable de tres tipos principales de enfermedades en los seres humanos: infección del tracto urinario, infecciones sanguíneas y del sistema nervioso central (sepsis/meningitis), y enfermedad gastroentérica.<sup>47</sup>

Las cepas patógenas de *E. coli* se distinguen en diez serotipos: *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enterohemorrágica* (EHEC), *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli enteroagregativa* productora de Shigatoxina (STEAEC), *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* adherente invasiva (AIEC), *E. coli uropatógena* (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MAEC). Colectivamente; ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, STEAEC, EIEC, y DAEC se conocen como *E. coli* diarrogénicas; mientras que AIEC es un patógeno entérico que causa la enfermedad de Crohn, donde la diarrea puede presentarse como uno de los síntomas.<sup>47</sup>

#### 3.1.1.1.4. Tratamiento

La gran mayoría de los casos de diarrea aguda causada por *E. coli*, solo requiere de la administración de rehidratación oral. Los pacientes con diarrea invasiva (fiebre de  $>38^{\circ}\text{C}$ , sangre y moco asociados a pujo y tenesmo). pueden ser tratados con antibióticos como: azitromicina, ciprofloxacino, furazolidona, norfloxacino y en pacientes embarazadas, se puede administrar ceftriaxona.<sup>52</sup>

Por otro lado, en las infecciones urinarias ocasionadas por *E. coli*, el tratamiento de primera elección en un paciente no séptico es el ciprofloxacino o gentamicina. Además, si se produce una peritonitis a causa de *E. coli*, el tratamiento de elección es la cefotaxima o ceftriaxona.<sup>52</sup>

La *E. coli* está adquiriendo resistencia a los antibióticos rápidamente, especialmente con respecto a las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación.<sup>53</sup>

### **3.1.1.2. *Pseudomona aeruginosa***

#### **3.1.1.2.1. Características morfológicas**

La *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, que presenta forma de barra y flagelación polar. Estas bacterias no forman esporas, tienen pili y son aerobias estrictas.<sup>54</sup>

La *P. aeruginosa* pueden producir distintos tipos de colonias, las que son aisladas del suelo o agua se caracterizan por producir colonias pequeñas y rugosas. En muestras clínicas, se presentan dos tipos de colonias, lisas y mucoides. Puede crecer en agar MacConkey y EMB.<sup>55</sup>

#### **3.1.1.2.2. Características bioquímicas**

Las cepas de *P. aeruginosa* son capaces de sintetizar pigmentos: piocianina, pioverdina y piorubina.<sup>56</sup>

**Tabla N° 2** Características bioquímicas de la *Pseudomona aeruginosa*<sup>57</sup>

Características	Reacción
Motilidad	+
Crecimiento aeróbico	+
Oxidasa	+
Catalasa	+
Fermentación de manitol	+
Lactosa	-
Sacarosa	-
D-glucosa	-
Indol	-
Rojo metilo	-
Voges-Proskauer	-
Urea	+
Desaminación de fenilalanina	-
H <sub>2</sub> S	-
Licuefacción de gelatina	+
Ácido glutámico descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	+
Citrato permeasa	+

### 3.1.1.2.3. Patogenia

Las *P. aeruginosa* es una bacteria ubicua, que se encuentran en los principales entornos naturales y en asociación íntima con las plantas y los animales. Su amplia distribución refleja una notable capacidad de adaptación fisiológica y genética.<sup>56</sup>

La *P. aeruginosa* es considerada un patógeno oportunista, ya que aprovecha cualquier alteración de las barreras externas (piel quemada, heridas, úlcera de córnea, etc.) o algunos procesos que permiten la contaminación de la sangre o del tracto urinario. Asimismo, esta bacteria puede colonizar cualquier superficie mucosa. Debido a esto, la *P. aeruginosa* ha sido encontrada en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, en personas con infecciones oculares, en víctimas de quemaduras y en pacientes con SIDA.<sup>58</sup> Esta bacteria es un patógeno común en hospitales y particularmente en unidades de cuidados intensivos.<sup>54</sup>

La patogenicidad de la *P. aeruginosa* se debe a la secreción de distintas toxinas (Exotoxina A, citotoxina, etc.), que debilitan o permiten la evasión del sistema inmune del huésped, ayudando a estas bacterias a sobrevivir. El pili y el flagelo son responsables de su adherencia y su diseminación a través del organismo. Además, los principales factores de virulencia secretados por esta bacteria son: lipopolisacáridos, alginato, sideróforos y enzimas (elastasas, proteasas, fosfolipasas, etc.).<sup>56</sup>

#### 3.1.1.2.4. Tratamiento

El tratamiento dirigido a una bacteriemia por *P. aeruginosa* normalmente se recomienda la combinación de un antibiótico betalactámico antipseudomónico y un aminoglucósido. Una neumonía nosocomial producida por esta bacteria puede ser tratada con amoxicilina/clavulanato o ampicilina/sulbactam o cefotaxima con o sin aminoglucósido.<sup>52,59</sup> Por otro lado, éstas presentan una resistencia intrínseca a los antibióticos. Esta resistencia se debe principalmente a la producción de  $\beta$ -lactamasas, provocando que sea resistente a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.<sup>56</sup>

#### 3.1.2. Bacterias Gram-positivas

Las bacterias gram-positivas presentan una sola membrana lipídica, que está rodeada por una pared celular compuesta de una capa gruesa de peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos (anclados a la membrana celular mediante un diacilglicerol) y ácidos teicoicos, que están unidos covalentemente al peptidoglicano. (Fig. 9).<sup>42</sup>

El peptidoglicano es esencial para la estructura, la replicación y la supervivencia de condiciones hostiles en las que se desarrollan las bacterias. Además, el peptidoglicano es lo suficientemente poroso para permitir la difusión de metabolitos a través de la membrana plasmática. Por otro lado, durante una infección, el peptidoglicano puede interferir con la fagocitosis, es

mitogénico (estimula la mitosis de los linfocitos) y tiene actividad pirogénica. El peptidoglicano puede ser degradado por la lisozima. Sin el peptidoglicano, las bacterias están expuestas a una presión osmótica mayor, dándose una lisis celular.<sup>60</sup>

Los ácidos lipoteicoicos y teicoicos son antígenos de superficie que distinguen los serotipos bacterianos y promueven la unión a otras bacterias o a la superficie celular de mamíferos. Los ácidos teicoicos son factores importantes en la virulencia. Por otro lado, los ácidos lipoteicoicos pueden desprenderse ocasionando actividades endotóxicas en el huésped.<sup>60</sup>

### **3.1.2.1. *Staphylococcus aureus***

#### **3.1.2.1.1. Características morfológicas**

El *S. aureus* son cocos Gram-positivos, no presentan motilidad, no forman esporas, pueden producir capsulas y son bacterias anaeróbicas facultativas.<sup>61</sup>

Los estafilococos forman racimos cuando se cultivan en medios líquidos o sólidos. Su nombre proviene del griego “Staphyle” que significa racimo de uvas y “Kokkos” que significa un grano o una baya.<sup>62</sup> Además, el *S. aureus* en agar sangre forma colonias que son amarillo-doradas, lisas, con relieve y producen  $\beta$ -hemólisis. Esta bacteria no crece en agar MacConkey. Además, en el agar manitol salado aparecen colonias amarillas con zonas amarillas en el medio.<sup>61</sup>

#### **3.1.2.1.2. Características bioquímicas**

El *S. aureus* es tolerante a la sal (10-15%) y relativamente resistente a la sequedad y al calor. Además, esta bacteria coagula el plasma de conejo de forma relativamente rápida.<sup>62</sup> La prueba de la coagulasa, es considerada la prueba definitiva para identificar al *S.*

*aureus* y distinguirlo de los estafilococos patógenos coagulasa negativa, como el *S. epidermidis*.<sup>61</sup>

**Tabla N° 3** Características bioquímicas del *Staphylococcus aureus*<sup>63</sup>

Características	Reacción
Motilidad	-
Crecimiento anaeróbico facultativo y aeróbico	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fermentación de manitol	+
Lactosa	+
Sacarosa	+
D-glucosa	+
Indol	-
Rojo metilo	+
Voges-Proskauer	+
Urea	+
Desaminación de fenilalanina	-
H <sub>2</sub> S	-
Licuefacción de gelatina	+
Ácido glutámico descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	-
Citrato permeasa	+

### 3.1.2.1.3. Patogenia

El *S. aureus* es un comensal inocuo en hasta dos tercios de la población. Este puede estar presente en: las narinas, la ingle, las axilas, la garganta, el perineo, la vagina y el recto. Esta bacteria es una patógeno oportunista; ya que, coloniza sitios de alteración de la piel, tales como úlceras y heridas.<sup>64</sup>

Además, el *S. aureus* es uno de los agentes más comunes implicados en la intoxicación alimentaria en todo el mundo. Esta bacteria causa una variedad de enfermedades que van desde erupciones cutáneas superficiales hasta infecciones que amenazan la vida, tales como: bacteriemia, endocarditis, neumonía y síndrome de shock tóxico.<sup>65</sup> ésta bacteria produce distintos factores de virulencia tales como: proteínas de

adhesión, enterotoxinas, superantígenos, hemolisinas formadoras de poros, toxinas de ribosilación de ADP y proteasas.<sup>62</sup>

#### **3.1.2.1.4. Tratamiento**

En pacientes que presentan bacteriemia el tratamiento recomendado para un *S. aureus* sensible a la meticilina es la cloxacilina y para un *S. aureus* resistente a la meticilina se usa vancomicina.<sup>59</sup> La asociación de amoxicilina con ácido clavulánico y las cefalosporinas, especialmente cefazolina y cefuroxima por vía intravenosa y cefuroxima, cefalexina y cefadroxilo por vía oral, son las posibles alternativas a la cloxacilina para el tratamiento de la infecciones por *S. aureus* sensible a la meticilina de gravedad leve o moderada. Además, la clindamicina y el cotrimoxazol son alternativas terapéuticas de la infección de piel y partes blandas de gravedad leve o moderada, producidas por *S. aureus*.<sup>66</sup>

Alrededor del 90% de *S. aureus* aislados tienen betalactamasas que inactivan a la penicilina. Además, esta bacteria presenta resistencia a la meticilina, a las quinolonas y a la vancomicina, con esta última debido al incremento excesivo en su uso para tratar infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina.<sup>67</sup>

#### **3.1.2.2. *Staphylococcus epidermidis***

##### **3.1.2.2.1. Características morfológicas**

El *S. epidermidis* son cocos Gram-positivos, no presentan movilidad, no forman esporas y son anaerobios facultativos.<sup>68</sup>

Esta bacteria en agar sangre forma colonias blancas y usualmente no producen  $\beta$ -hemólisis. El agar MacConkey no permite su

crecimiento. Además, en el agar manitol salado aparecen colonias rosadas claras y el medio no se altera conservando su color rojizo.<sup>69</sup>

### 3.1.2.2.2. Características bioquímicas

El *S. epidermidis* es coagulasa negativo, produce fosfatasa y no fermenta el manitol ni la trehalosa. Asimismo, esta bacteria es tolerante a la sal.<sup>69</sup>

**Tabla N° 4** Características bioquímicas del *Staphylococcus epidermidis*,<sup>70</sup>

Características	Reacción
Motilidad	-
Crecimiento anaeróbico facultativo y aeróbico	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fermentación de manitol	-
Lactosa	+
Sacarosa	+
D-glucosa	+
Indol	-
Rojo metilo	-
Voges-Proskauer	+
Urea	+
Desaminación de fenilalanina	-
H <sub>2</sub> S	+
Licuefacción de gelatina	+
Ácido glutámico descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	-
Citrato permeasa	-

### 3.1.2.2.3. Patogenia

El *S. epidermidis* es el microorganismo más abundante de la flora normal de la piel y membranas mucosas. Debido a cambios en la práctica de la medicina moderna con el uso creciente de dispositivos médicos protésicos permanentes y el aumento de pacientes inmunocomprometidos, el *S. epidermidis* se ha convertido en un patógeno frecuente y oportunista.<sup>71</sup>

Actualmente, el *S. epidermidis* es la causa más común de bacteriemia primaria, se encuentra con frecuencia en las infecciones de dispositivos médicos permanentes, y es la tercera causa más común de infecciones nosocomiales. Característicamente, las infecciones causadas por *S. epidermidis* son crónicas, lo cual contrasta con el potencial del *S. aureus* de causar enfermedades agudas.<sup>71</sup>

Los factores de virulencia más significativos en el *S. epidermidis* son: biopelículas, polisacáridos de adhesión, proteasas, enterotoxinas, superantígenos y sideróforos.<sup>68</sup>

#### 3.1.2.2.4. Tratamiento

Para el tratamiento de infecciones de dispositivos médicos permanentes, en el caso de una endocarditis infecciosa sobre válvula nativa ocasionada por *S. epidermidis*, el tratamiento de primera elección es oxacilina + gentamicina. En cuanto a la profilaxis antimicrobiana en una cirugía, para evitar infección con *S. epidermidis* se administra cefazolina y en pacientes con alto riesgo se utiliza vancomicina.<sup>52</sup>

El *S. epidermidis* presenta resistencia antimicrobiana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, especialmente a la meticilina; ya que al formar biopelículas reduce la permeabilidad y penetración de estos antibióticos. Además, la resistencia a quinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino), ácido fusídico y otros agentes antimicrobianos como la vancomicina sigue en aumento.<sup>68</sup>

### 3.2. Hongos

Los hongos son definidos como: eucariotas desprovistos de clorofila, y por lo tanto heterótrofos, los cuales presentan formas de nutrición parasitaria/saprobíoticas/simbiótica. Las principales características de los hongos son: uni o

multinucleados, absorben nutrientes, típicamente presentan paredes celulares de quitina y su meiosis tiene lugar dentro de un cigoto.<sup>72,73</sup>

Los hongos están compuestos principalmente de agua (69-90%), carbohidratos, proteínas y lípidos. Los tres grupos más importantes de hongos son: los mohos, las levaduras y las setas. Algunos hongos pueden poseer una mezcla de hifas multicelulares filamentosas (hifa verdadera) y estructuras unicelulares (pseudohifas), dependiendo de las condiciones de crecimiento. Esto se conoce como dimorfismo, y es una característica particular de algunos hongos patógenos.<sup>73</sup>

La pared celular de los hongos está compuesta por: fibrillas poliméricas, quitina, celulosa, glucanos, proteínas, lípidos, y heteropolímeros de manosa, galactosa, fucosa y xilosa (Fig. 10). Los tipos y cantidades de estos diferentes componentes varían entre los diferentes grupos de hongos e incluso pueden variar durante el ciclo de vida de una sola especie.<sup>72</sup>

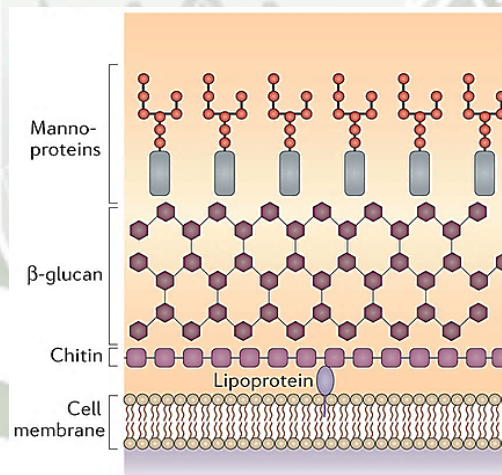


Fig. 10 Estructura de la pared celular de un hongo.<sup>42</sup>

### 3.2.1. *Candida albicans*

#### 3.2.1.1. Características morfológicas

Junto con la mayoría de los hongos patógenos para los seres humanos, la *C. albicans* presenta dimorfismo, ya que puede crecer como una levadura (unicelular) o en forma de hifas multinucleadas

(multicelular).<sup>74</sup> Su reproducción es asexual, la cual se produce por gemación con la formación de blastoconidios.<sup>75</sup>

La célula de este hongo es grande, esférica y Gram-positiva.<sup>76</sup> La *C. albicans* también puede ser identificada a partir de la formación de clamidosporas. Las clamidosporas son estructuras refráctiles y esféricas, las cuales son generadas en los extremos de las hifas a partir del cultivo en un medio nutricionalmente pobre, como el agar de harina de maíz.<sup>77</sup> Asimismo, en agar Sabouraud a 37 °C, las colonias de *C. albicans* aparecen dentro de las 48-72 horas, estas colonias son lisas y blanquecinas.<sup>75</sup>

La prueba del tubo germinativo es el método estándar de laboratorio para la identificación de *C. albicans*. La prueba consiste en la inducción de excrecencias de hifas (tubos germinales), para lo cual se hace un subcultivo en suero humano a 37 °C durante 2 a 4 horas. Aproximadamente el 95% de los aislamientos de *C. albicans* producen tubos germinales.<sup>77</sup>

#### **3.2.1.2. Características bioquímicas**

La identificación bioquímica de *C. albicans* se basa en gran medida de la utilización de carbohidratos. Está puede fermentar la glucosa, maltosa y sucrosa; además, produce ácido, pero no fermenta la lactosa.<sup>76,77</sup>

#### **3.2.1.3. Patogenia**

La *C. albicans* es un hongo ubicuo que es parte de la flora normal de los seres humanos. Sin embargo, también es un patógeno oportunista y puede transformarse rápidamente de un habitante inofensivo de los tejidos mucocutáneos a un organismo altamente patógeno capaz de matar a su huésped bajo las condiciones adecuadas. Las infecciones ocasionadas por

este hongo pueden ser agudas, crónicas o recurrentes y afectar a los tejidos cutáneos o mucocutáneos, así como a la sangre y otros órganos.<sup>78</sup>

Las infecciones producidas por la *C. albicans* (candidiasis) pueden ser divididas en: infecciones superficiales (candidiasis oral, vaginal y mucocutánea crónica) y las infecciones profundas (miocarditis, septicemia).<sup>79</sup>

Los factores de virulencia que presenta la *C. albicans* son: el dimorfismo, integrinas que promueven adherencia, secreción de hidrolasas y proteínas de choque térmico.<sup>78</sup>

#### 3.2.1.4. Tratamiento

En el tratamiento de candidiasis cutánea, el fármaco de elección es la Nistatina. Se recomiendan los azoles (fluconazol, ketoconazol, etc.) para la candidiasis de las mucosas. La anfotericina B es el fármaco de elección para la candidiasis sistémica.<sup>78</sup>

Se ha observado la resistencia de la *C. albicans* frente a los azoles (fungistáticos que actúan sobre el ergosterol). El mecanismo de esta resistencia se encuentra asociada al aumento de la actividad enzimática de la ruta del ergosterol, dándose una reducción en el efecto del fármaco su objetivo.<sup>80</sup>

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales

##### 1.1. Material biológico

###### 1.1.1. *Luma chequen* (Molina) A. Gray

El material vegetal empleado en el presente estudio, corresponde a *Luma chequen* (Molina) A. Gray, “Arrayán”, del cual se utilizó las hojas maduras. Fue recolectado del distrito de Lucre, provincia de Quispicanchi, departamento del Cusco.

###### 1.1.2. Agentes patógenos

Los agentes patógenos utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, fueron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* (recolectados del hospital regional Honorio Delgado); *Staphylococcus epidermidis* (recolectado del hospital Goyeneche) y *Escherichia coli* (recolectado del laboratorio de análisis clínicos de la universidad Católica de Santa María). Se obtuvo cinco ejemplares de cada microorganismo.

##### 1.2. Material de laboratorio

- Baguetas de vidrio
- Embudos de vidrio
- Fiola de vidrio de 1000mL
- Matraces de vidrio 100, 500 y 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500, 1000mL

- Pera de decantación de 125mL
- Placas de microdilución de 96 pocillos
- Placas Petri de vidrio de 100mm x 15mm
- Probetas graduadas de: 10, 50 y 100mL
- Picnómetro
- Tubos de ensayo de vidrio
- Vasos de precipitado: 50, 100 y 250mL
- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10mL
- Mechero de Bunsen
- Micropipetas de 100 y 1000 $\mu$ l
- Asa de Kolle
- Cubre objetos
- Porta objetos

## 2. Reactivos

### 2.1. Compuestos químicos

- Alcohol de 96° (Diproquim, Comercial)
- Aceite de inmersión (Biolab Reagent, Q.P.)
- Ácido Sulfúrico al 1% (UCSM, H-402)
- Cloruro de bario al 1% (UCSM, H -402)
- Peróxido de hidrógeno (Merck, Q.P.)
- Agua destilada (UCSM H-103)
- Reactivo de Kovacs (UCSM, H-403)
- Cristal violeta (Pirex S.R.L, Q.P.)
- Lugol (UCSM, H-403)
- Etanol-acetona (JT Barker, P.A.;Diproquim, Q.P.)
- Safranina (CDH Biochemical, Q.P.)
- Suero fisiológico (UCSM, H-403)
- Suero humano

- $\alpha$ -naftol al 5% en alcohol absoluto (UCSM H-403)
- Hidróxido de sodio 40% (Merck, Q.P.) (UCSM H-103)
- Hidróxido de potasio 10% (Delta Química, Q.P.) (UCSM H-103)
- Rojo de metilo 0.04% (Riedel-de Haën, Q.P.) (UCSM H-402)
- Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (prueba oxidasa) (MERCK)
- Plasma humano
- Tween 80 (Harleco, Q.P.)

## 2.2. Medios de cultivo

- Agar Mac Conkey
- Agar citrato de Simmons
- Agar Sabouraud
- Agar Müeller-Hinton
- Agar Manitol Salado
- Agar Lisina Hierro (LIA)
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- Caldo peptonado

## 3. Equipos

- Cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra.
- Autoclave. Beltec, LS-B50L
- Balanza analítica. Ohaus, Pioneer.
- Contómetro de colonias. Quebec, CC-1000
- Horno de esterilización. J.P. Selecta, 2000210
- Estufa de incubación. Fisher Scientific
- Refrigeradora. Coldex, Autofrost R162
- Refractómetro
- Equipo de destilación por arrastre de vapor (Alambique)
- Microscopio óptico

## 4. Métodos

### 4.1. Obtención del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray

#### 4.1.1. Procesamiento del material vegetal

Una vez recolectado el material vegetal, como se observa en la **Fig. 11**, se seleccionó las hojas frescas en buen estado (con ausencia de defectos que pudo haber sido producido por alguna contaminación, infección u otros) limpiándolas para eliminar restos de tierra o algún componente extraño, y finalmente, se determinó la masa del material vegetal que fue llevado al equipo de destilación por arrastre de vapor (**Fig. 12**).

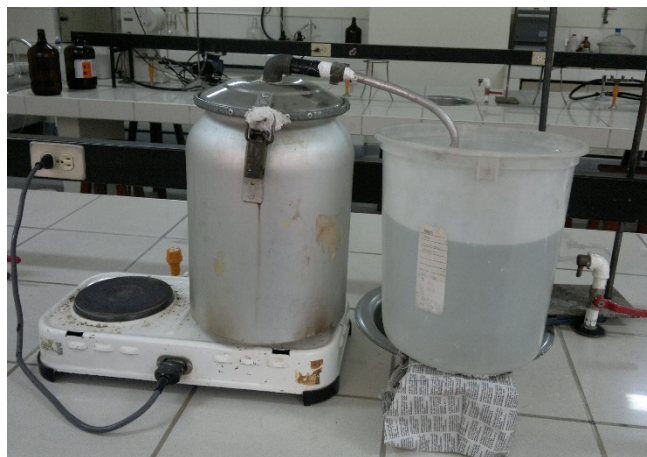


**Fig. 11** Hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.1.2. Extracción del aceite esencial

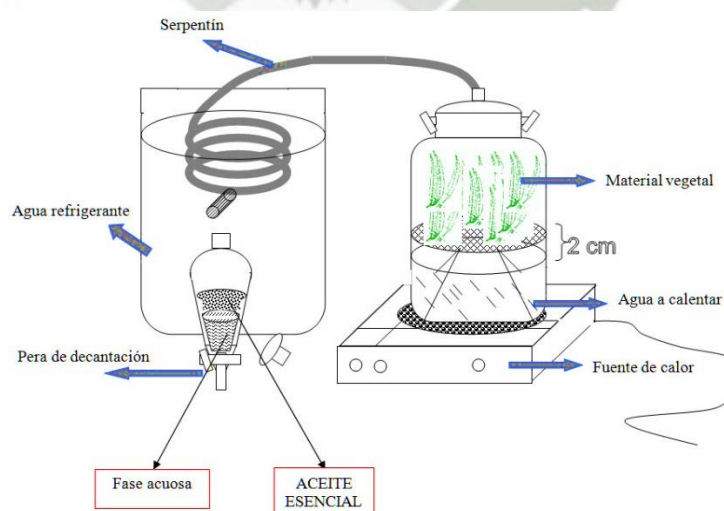
Como se observó en el marco teórico, el método adecuado para la extracción del aceite esencial de Arrayán es la destilación por arrastre de vapor<sup>17,19</sup>, utilizando un equipo denominado “alambique”, observado en la **Fig. 11**, éste consta de un recipiente cerrado que en su interior hay una rejilla metálica para separar el agua (que está hirviendo), del material vegetal, por lo que las hojas de Arrayán no están en contacto directo con el agua.



**Fig. 12** Equipo de destilación por arrastre de vapor (Alambique).

Fuente: Elaboración propia

La Fig. 13 muestra el esquema del equipo utilizado para la extracción del aceite esencial de Arrayán. El recipiente en el que se deposita el material vegetal contiene agua que, con una fuente de calor, se mantuvo en ebullición y por consiguiente se produce vapor de agua; ése vapor, pasa por medio de las hojas de Arrayán, llevando consigo compuestos volátiles que forman parte del aceite esencial y se conduce por una tubería que inicia en la parte superior de la tapa y sigue en forma de serpentín hacia otro recipiente que contiene agua fría (refrigerante); el otro extremo de la tubería llega a una pera de decantación, lugar en el que se deposita el agua junto al aceite esencial (provenientes del vapor); finalmente, ambas fases se separan.



**Fig. 13** Esquema del equipo de destilación por arrastre de vapor.

Fuente: Elaboración propia

El procedimiento de obtención del aceite esencial consistió en colocar 3.2 Kg de hojas frescas de Arrayán en el equipo de extracción que contiene agua destilada, posteriormente se cerró el equipo mencionado y se dejó hervir el agua durante 4 horas, recolectando el aceite esencial en la pera de decantación, y se almacenó en un frasco de color ámbar en refrigeración. Con el propósito de obtener un volumen considerado de aceite esencial, el procedimiento se realizó 6 veces.

#### 4.1.3. Determinación del rendimiento de extracción

El porcentaje de rendimiento, de las 6 extracciones de aceite esencial obtenido, se determinó utilizando la Ecuación (2); donde: la masa del aceite esencial (AE) y la masa del material vegetal utilizado para la extracción están dados en gramos.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{masa del aceite esencial}}{\text{masa del material vegetal}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (2)}$$

### 4.2. Caracterización del aceite esencial

El aceite esencial obtenido se caracterizó de forma física (solubilidad en etanol, densidad relativa e índice de refracción); además, para identificar los componentes presentes en el aceite esencial obtenido, se realizó un análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectro de masas (GC-MS).

#### 4.2.1. Características físicas

##### 4.2.1.1. Solubilidad

La solubilidad del aceite esencial obtenido se evaluó utilizando etanol de 70%, 96% y agua destilada; para ello se utilizó una probeta

graduada de 10mL con tapa, en el que se colocó 1mL del aceite esencial y se adicionó volúmenes pequeños de la solución alcohólica (agitando la mezcla, luego de cada adición), hasta completar el volumen de 10mL; se anotó el volumen del alcohol necesario para obtener una solución entre el aceite esencial y el alcohol. Se procedió de forma similar utilizando el agua destilada. Éste parámetro se determinó a 20°C.

#### 4.2.1.2. Densidad relativa

Se determinó la densidad relativa ( $\rho_{\text{relativa}}$ ) del aceite esencial de Arrayán a 20 °C, utilizando un picnómetro de 10mL (Vol. P.); Para ello, se registró la masa del picnómetro vacío ( $P_0$ ) y la masa del picnómetro conteniendo el aceite esencial ( $P_{AE}$ ), y éstos valores se reemplaza en la Ecuación (3).

$$\rho_{AE} = \frac{P_{AE} - P_0}{Vol. P.} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Como se mencionó en el marco teórico, la densidad relativa es la proporción de las densidades del aceite esencial y del agua a una determinada temperatura, por lo que se utilizó la Ecuación (4) para determinar éste parámetro a 20 °C.

$$\rho_{\text{relativa}}(AE) = \frac{\rho_{AE}}{\rho_{H_2O}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

#### 4.2.1.3. Índice de refracción

El índice de refracción del aceite esencial obtenido se determinó utilizando el refractómetro digital ABBE modelo WYA-S; y éste equipo se verificó determinando el índice de refracción del agua, que debió ser 1.333.

#### 4.2.2. Composición química

Como mencionan Baser & Bouchbauer<sup>17</sup>, los métodos cromatográficos son utilizados frecuentemente en el análisis de aceites esenciales; siendo la cromatografía de gases, útil para la identificación y cuantificación de compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales.<sup>30</sup>

##### 4.2.2.1. Cromatografía de gases

La identificación de compuestos presentes en el aceite esencial de Arrayán se realizó mediante el método de cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS), utilizando el cromatógrafo Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra; con un sistema de inyección sin división “splitless”; con una columna capilar de sílice fundido Rxi-5Sil MS de 30m de largo, 0.25mm de diámetro interior y 0.25 $\mu$ m de espesor de film. La temperatura de interface fue de 240°C y la temperatura de fuente de ion fue 200°C; el gas transportador fue helio, ajustado a una velocidad lineal de 37.2cm/s. el rango de masa evaluado fue desde 40 – 400m/z. el equipo fue manejado con el software GCMS solution 2.70.

Además, la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial se realizó comparando el tiempo de retención de los picos obtenidos con la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH Library (NIST 08).

#### 4.3. Identificación de los agentes patógenos

Los agentes patógenos utilizados en el presente estudio fueron aislados y caracterizados en las respectivas instituciones de las que se recolectó; sin embargo, estos fueron nuevamente caracterizados para asegurar su presencia.

Los medios utilizados (agares) para la caracterización de los agentes patógenos fueron elaborados a partir de preparados comerciales (componentes deshidratados), para lo cual se pesó una cantidad adecuada de los mismos (según refirió el fabricante) y se disolvió con agua. La esterilización de estos medios se realizó por medio de una autoclave (121 °C, 1.5 atm. y 15 minutos). Además, el material de vidrio utilizado se esterilizó en un horno a 175 °C por 60 minutos.

#### **4.3.1. *Escherichia coli***

Las muestras que indican la presencia de *E. coli*, fueron caracterizadas mediante los siguientes métodos:

##### **4.3.1.1. Agar MacConkey**

El agar MacConkey es un medio de cultivo selectivo, comúnmente usado para para la detección y aislamiento de las *Enterobacteriaceae*. Este medio de cultivo está compuesto por: sales biliares, lactosa, rojo neutro, peptona, cristal violeta, cloruro de sodio y agar. La combinación de sales biliares y el cristal violeta permite inhibir el desarrollo de la mayoría de bacterias Gram-positivas. Las colonias de bacterias fermentadoras de lactosa son rosadas o rojas, mientras que las bacterias no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras.<sup>81</sup>

La siembra de las muestras en este medio de cultivo se realizó mediante el método superficial por agotamiento en estrías y se incubó a 37 °C por 24 horas.<sup>81</sup>

##### **4.3.1.2. Tinción de Gram**

La tinción de Gram es una técnica fundamental para la clasificación e identificación bacteriana. Esta técnica diferencia a las bacterias en dos variedades. Las bacterias que retienen la tinción con cristal

violeta (purpuras) son denominadas Gram-positivas, mientras que las que son decoloradas y teñidas con safranina (rojas) son llamadas Gram-negativas. Esta respuesta a la tinción se basa en la composición química y estructural de las paredes celulares de ambas variedades de bacterias. Las Gram-positivas poseen una pared gruesa y relativamente impermeable, compuesta por peptidoglicano y polímeros secundarios, lo que les permite resistir a la decoloración. Por otro lado, Las Gram-negativas presentan una capa delgada de peptidoglicano y una bicapa lipoproteica conocida como membrana externa, que pueden ser alteradas en el proceso de decoloración.<sup>82</sup>

La tinción de Gram se realizó con el siguiente procedimiento: se colocó en una lámina portaobjetos limpia, una gota de suero fisiológico y una colonia bacteriana. Seguidamente, se dejó secar a temperatura ambiente (20 °C) o por medio de calentamiento suave utilizando un mechero, con el fin de obtener un frotis fijo, el cual no sea removido durante el proceso de tinción. La superficie de la lámina, que presenta el frotis, fue cubierta con la solución de cristal violeta durante 1 minuto, luego se lavó suavemente con agua del grifo. A continuación, se cubrió la lámina con la solución de lugol durante 1 minuto, luego se lavó suavemente con agua del grifo. Consecutivamente, se realizó el proceso de decoloración, para lo cual se cubrió la lámina con una solución de etanol-acetona y se agitó suavemente durante 30 segundos, luego se lavó suavemente con agua del grifo. Se cubrió la superficie de la lámina con safranina durante 1 minuto, luego se lavó suavemente con agua del grifo. Se dejó secar a temperatura ambiente (20 °C). Finalmente, se observó al microscopio con un aumento de 100X, para lo cual se usó aceite de inmersión.<sup>83</sup>

#### 4.3.1.3. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Este medio puede determinar la habilidad de un microorganismo para utilizar carbohidratos específicos, con o sin producción de gas, junto con la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno. El agar TSI contiene tres azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa) y un indicador de pH (rojo fenol). Si se produce una fermentación de la azúcar, la glucosa sería usada inicialmente y el fondo del tubo tendría un pH ácido (amarillo). Después de la utilización de la glucosa, el microorganismo puede continuar fermentando las azúcares restantes, provocando que el tubo entero sea ácido. Ciertas bacterias no pueden utilizar ninguna azúcar, pero pueden descomponer a la peptona. La utilización de la peptona provoca un cambio alcalino en el medio (rojo). La producción de sulfuro de hidrógeno ocasiona que el medio se torne negro. Además, la ruptura del medio o la presencia de burbujas es un indicativo de la producción de gas. Los resultados se manifiestan como A = ácido, K = alcalino.<sup>84</sup>

En el procedimiento utilizado se hizo la siembra de la muestra en agar TSI, mediante la técnica de siembra por picadura y estrías en superficie. Seguidamente, se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas.<sup>85</sup>

#### 4.3.1.4. Agar Lisina Hierro (LIA)

Este medio contiene lisina, peptonas, glucosa, citrato de hierro amonio, tiosulfato de sodio y como indicador de pH al purpura de bromocresol. Este medio fue utilizado para determinar si un microorganismo puede desaminar o descarboxilar la lisina. La producción de sulfuro de hidrógeno también puede ser detectado con este medio. Si el microorganismo puede descarboxilar la lisina, el fondo del medio se tornaría purpura (alcalino). Si el microorganismo no puede descarboxilar la lisina el fondo del medio se muestra amarillo (ácido). Un microorganismo que puede desaminar la lisina produce que el pico del

medio adquiera un color rojizo, y si no puede, el pico permanece púrpura. El citrato de hierro amonio y el tiosulfato de sodio están presentes para la detección de sulfuro de hidrógeno, el cual se evidencia por la aparición de un color negro en el medio. Los resultados se manifiestan como A = ácido, K = alcalino.<sup>86</sup>

Además, no produce sulfuro de hidrógeno. El procedimiento que se realizó con este medio fue el siguiente: se sembró utilizando la técnica de siembra 3 veces picadura y 1 estría de superficie. A continuación, se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas.<sup>85</sup>

#### **4.3.1.5. Agar Citrato de Simmons**

El agar citrato de Simmons permite detectar si un microorganismo puede usar al citrato de sodio como un recurso de carbono, al fosfato de amonio como un recurso de nitrógeno y presenta con indicador de pH al azul de bromotimol. Este método es útil en la identificación de las *Enterobacteriaceae*. Los microorganismos que poseen a la enzima citrato permeasa, son los que metabolizan al citrato. Esto se manifiesta por el cambio de color del medio, de verde a azul.<sup>86</sup>

La siembra de la muestra en este medio se realizó mediante la técnica por picadura y estrías en superficie. Posteriormente, se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas.<sup>85</sup>

#### **4.3.1.6. Prueba del Indol**

Varios microorganismos poseen la enzima triptofanasa que degrada al triptófano produciendo piruvato e indol. Para evaluar este proceso enzimático se utilizó al caldo peptonado que contiene peptona como fuente de triptófano. Cuando el indol reacciona con el p-dimetil-

aminobenzaldehído (reactivo de Kovacs) se produce un complejo color rojo, esto se observa en la superficie del medio como un anillo rojo.<sup>85</sup>

La muestra fue inoculada a un tubo con caldo peptonado, mediante el uso de un asa de Kolle. Se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas. Por último, se agregó 2-3 gotas de reactivo de Kovacs.<sup>85</sup>

#### **4.3.1.7. Prueba Rojo de Metilo – Voges Proskauer (MRVP)**

La prueba MRVP es un conjunto de dos ensayos. Los microorganismos pueden metabolizar a la glucosa por medio de diferentes vías metabólicas. Si utilizan la vía ácido mixta, se originan productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético) o si utilizan la vía butanodiólica, se producen productos finales neutros (acetoína). La reacción de rojo de metilo (MR) determina la capacidad de un microorganismo de producir ácido en un caldo de glucosa tamponado y la reacción de Voges-Proskauer (VP) identifica la producción de acetoína a partir de la glucosa, utilizando  $\alpha$ -naftol e hidróxido de potasio. La reacción con rojo de metilo es positiva, cuando la parte superior del medio se torna roja. Por otro lado, la reacción de Voges-Proskauer es positiva cuando aparece un color rojo oscuro en la parte superior del medio.<sup>85</sup>

Se inoculó la bacteria en estudio en dos tubos con caldo MR-VP y se incubó a 37 °C por 24 horas. En cuanto a la prueba de Voges-Proskauer se agregó 12 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5% en alcohol absoluto y 4 gotas de hidróxido de potasio al 40%. Se agitó suavemente el tubo con el medio y se dejó en reposo durante 10 a 15 minutos. Por otro parte, para la prueba de rojo de metilo se agregó 5 gotas del mismo al 0.04%.<sup>85</sup>

#### 4.3.2. *Pseudomona aeruginosa*

Las muestras que refieren la presencia de *P. aeruginosa*, fueron evaluadas por medio de su desarrollo en agar MacConkey, agar triple azúcar hierro y agar citrato de Simmons. Además, se examinó su morfología mediante la tinción de Gram. El fundamento y el procedimiento de estas técnicas se describen en la sección anterior. Además, se realizó la prueba de la oxidasa, la cual es descrita a continuación:

##### 4.3.2.1. Prueba de la oxidasa

Esta es una enzima involucrada en el sistema de transporte de electrones de las bacterias aeróbicas. La actividad de la oxidasa está presente en microorganismos aeróbicos, anaerobios facultativos y microaerofílicos. Esta es una prueba importante para identificar especies de *Pseudomonas*, las cuales son oxidasa positiva. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son oxidasa negativa. La prueba de la oxidasa está basada en la reacción del reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (un donador de electrones); el cual, al ser oxidado pasa de un color rosado a un púrpura oscuro.<sup>85</sup>

El procedimiento para la realización de esta prueba fue el siguiente: en un trozo de papel filtro, se colocó una cantidad de la muestra que contiene a la bacteria. Luego, se añadió 1 gota del reactivo para el reconocimiento de la oxidasa, sobre la muestra presente en el papel filtro. Se esperó 30 segundos para obtener el resultado.<sup>85</sup>

#### 4.3.3. *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*

Las muestras que refieren la presencia de *S. aureus* y el *S. epidermidis*, fueron evaluadas usando la tinción de Gram. El fundamento y el procedimiento

de esta técnica se describe en la sección anterior. Además, se realizó otras técnicas para identificar a estas bacterias, las cuales son:

#### **4.3.3.1. Agar Manitol Salado**

El agar manitol salado es un medio usado para el aislamiento selectivo de los estafilococos patógenos, ya que la mayoría de otras bacterias son inhibidas por su elevada concentración de cloruro de sodio. El manitol presente en este medio es usado para la detección de la habilidad fermentativa, debido a que se forma colonias de estafilococos con un halo amarillo que las rodea. Si el manitol es fermentado, los ácidos producidos convierten al rojo fenol (indicador de pH) de rojo (alcalino) a amarillo (ácido).<sup>87</sup>

Es procedimiento estuvo dado por la siembra de la muestra que contuvo a la bacteria en estudio sobre el agar manitol salado, para lo cual se utilizó la técnica de la estría. Seguidamente, se incubó a 37°C por 24 horas.<sup>87</sup>

#### **4.3.3.2. Prueba de la catalasa**

Esta prueba determina la habilidad de algunos microorganismos de producir catalasa que degrada al peróxido de hidrógeno. Los microorganismos que poseen catalasa la utilizan para degradar el peróxido de hidrógeno que puede acumularse durante su respiración.<sup>85</sup>

El procedimiento de esta prueba consistió en: colocar con un asa de Kolle una colonia, del microorganismo a investigar, en una lámina portaobjeto que contenga 1-2 gotas de peróxido de hidrógeno. Si burbujas de gas o efervescencia surgen de la gota, entonces la prueba es positiva.<sup>85</sup>

#### 4.3.3.3. Prueba de la coagulasa

La coagulasa es la enzima que convierte el fibrinógeno en fibrina. La capa de fibrina que rodea a la célula bacteriana, protege a las bacterias de las defensas no específicas del huésped.<sup>85</sup>

Esta prueba se realizó colocando 1-2 gotas de plasma humano en un portaobjetos. Luego, con un asa de Kolle se obtuvo una colonia, del microorganismo a investigar, y se suspendió en las gotas de plasma. Seguidamente, se agito suavemente y se esperó 5-20 segundos. Si se produce la formación de grumos la prueba es positiva.<sup>85</sup>

#### 4.3.4. *Candida albicans*

Las muestras que indican la presencia de *C. albicans*, fueron caracterizadas mediante los siguientes métodos:

##### 4.3.4.1. Examen Directo

La prueba del hidróxido de potasio es usada para detectar de forma rápida la presencia de elementos fúngicos (fragmentos miceliales, esférulas, células de levadura y pseudohifas). El hidróxido de potasio es una base fuerte; la cual puede suavizar, digerir y limpiar la matriz en la cual se encuentra el hongo, permitiendo que los elementos fúngicos puedan observarse directamente al microscopio.<sup>88</sup>

Para la ejecución de esta prueba, se retiró con el asa de Kolle una muestra con el espécimen a investigar y se colocó sobre un portaobjeto. A continuación, se añadió 1 gota de hidróxido de potasio al 10% y se colocó un cubreobjeto y se presionó suavemente para eliminar cualquier burbuja de aire. Finalmente, se observó al microscopio a 10x y 40x.<sup>89</sup>

#### 4.3.4.2. Tinción de Gram

Las levaduras se comportan como organismos Gram-positivos, ya que presentan una pared celular gruesa que retiene al complejo cristal violeta-yodo detrás de la pared celular, provocando que no se produzca un daño suficiente para producir poros grandes en la pared celular durante la aplicación del decolorante. Como resultado, las células de las levaduras aparecen purpuras, pero no necesariamente porque son verdaderamente Gram-positivas.<sup>90</sup> El fundamento y procedimiento de esta técnica se describen en secciones anteriores.

#### 4.3.4.3. Agar Sabouraud

El agar Sabouraud es un medio usado para el cultivo de hongos y levaduras. Este agar contiene nutrientes para el crecimiento de los microorganismos (peptona y glucosa). Además, el desarrollo de los hongos se ve beneficiado por la presencia de cloranfenicol y el pH ácido.<sup>75</sup>

En el agar sabouroaud, se sembró la muestra que presentó al microorganismo estudiado, para lo cual se utilizó la técnica de la estría. Posteriormente, se incubó a 37°C por 24 horas.<sup>75</sup>

#### 4.3.4.4. Prueba del tubo germinativo

La identificación de *C. albicans* se realizó mediante la prueba del tubo germinativo, la cual permite diferenciarla de otras especies de *Candida*. Esta prueba consiste en la inducción de excrecencias de hifas (tubos germinales). Cerca del 95% de los aislamientos de *C. albicans* producen tubos germinales. La prueba es positiva cuando se visualiza una estructura elongada proveniente de la célula levaduriforme, semejante a un espejo de mano.<sup>77</sup>

Esta prueba fue llevada a cabo mediante la siembra de una colonia del microorganismo estudiado, por medio del asa de Kolle, en un tubo con 0.5 mL de suero humano. A continuación, se llevó a incubar a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se colocó 2-3 gotas de la suspensión en un portaobjetos y se observó al microscopio a 40X.<sup>77</sup>

#### **4.4. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial**

En los últimos años, se ha visto incrementado el interés en la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos de diversas fuentes. Por lo tanto, se ha prestado mayor atención a los métodos de detección y evaluación de la actividad antimicrobiana. En el presente estudio se empleó los métodos de dilución para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.

Se puede utilizar un método de dilución en caldo o en agar para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos.

##### **4.4.1. Método de microdilución en caldo**

Es uno de los métodos más usados para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana. El procedimiento involucra lo siguiente:<sup>91</sup>

##### **4.4.1.1. Preparación del aceite esencial al 20% y al 50%v/v**

Se preparó una emulsión de aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray a una concentración del 20% v/v (200 µL/mL), utilizada para los ensayos con todos los microorganismos, exceptuando a la *P. aeruginosa*, en la cual el aceite esencial presentó menor efecto antimicrobiano, por lo que se usó una emulsión de 50% v/v. Se usó tween 80 al 5% (surfactante hidrofílico) para la elaboración de esta emulsión, el

cual permitió la emulsificación (mezcla de dos líquidos inmiscibles) del aceite esencial en agua.

#### 4.4.1.2. Preparación del inóculo

Se realizó un inóculo de cada microorganismo, para lo cual se transfirió un cierto número de colonias a un tubo con 10 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI). Estas suspensiones microbianas fueron ajustadas a una turbidez equivalente al patrón 0.5 de la escala de McFarland (mezcla de 0.05mL de cloruro de bario al 1% con 9.95mL de ácido sulfúrico al 1%), lo que asemejó a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Por último, se realizó una dilución 1/100 del inóculo con la finalidad de conseguir  $10^6$  UFC/mL, concentración a la cual se trabajó en las microdiluciones.

#### 4.4.1.3. Preparación de las microdiluciones

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray se evaluó utilizando placas de microdilución de 96 pocillos. La evaluación antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*, se procedió tal como se muestra en la **Tabla N° 5**; y frente a *P. aeruginosa*, tal como se muestra en la **Tabla N° 6**.

**Tabla N° 5** Esquema de microdiluciones para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*.

Soluciones	Pocillo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite esencial al 20% (µL)	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5	100	112.5	125
Caldo BHI (µL)	112.5	100	87.5	75	62.5	50	37.5	25	12.5	0
Inóculo $10^6$ (µL)	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
Vol. Final (µL)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Cc. Final (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Fuente: elaboración propia

Cada placa presenta un control negativo o blanco del aceite esencial, el cual constó de 50  $\mu\text{L}$  de tween 80, 75  $\mu\text{L}$  de caldo BHI y 125  $\mu\text{L}$  de inóculo. Una vez terminado este proceso, se cubrió la placa de microdilución y se incubó a 37°C durante 24 horas. Este procedimiento fue aplicado a cada uno de los microorganismos evaluados en el presente trabajo de investigación.

**Tabla N° 6** Esquema de microdiluciones para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, frente a *P. aeruginosa*.

Soluciones	Pocillo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Aceite esencial al 50% ( $\mu\text{L}$ )	50	60	70	80	90	100	110	120
Caldo BHI ( $\mu\text{L}$ )	75	65	55	45	35	25	15	5
Inóculo 10 <sup>6</sup> ( $\mu\text{L}$ )	125	125	125	125	125	125	125	125
Vol. Final ( $\mu\text{L}$ )	250	250	250	250	250	250	250	250
Cc. Final (%)	10	12	14	16	18	20	22	24

Fuente: elaboración propia

#### 4.4.2. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima (CIM), es definida como la concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación.<sup>92</sup>

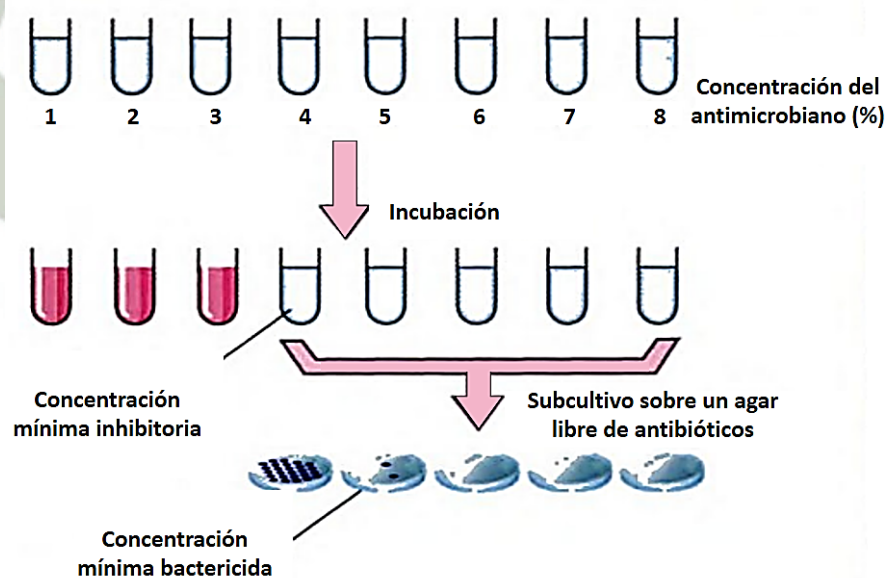
Esta técnica se llevó a cabo después de la incubación de las microdiluciones. Para lo cual, se visualizó la serie de disoluciones en los pocillos y se buscó el pocillo que no presentó turbidez. Este pocillo representa a la CIM, ya que representa a la mínima concentración del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray que inhibió el crecimiento del microorganismo estudiado.

#### 4.4.3. Concentración Bactericida o Fungicida Mínima

La concentración bactericida mínima (CBM, para el caso de las bacterias), y fungicida (CFM, para el caso de *C. albicans*), es definida como la concentración más baja del antimicrobiano que mata el 99.9% de los

microorganismos. También, se le define como la concentración más baja de antimicrobiano que evitará el crecimiento de un organismo después de un subcultivo en medios libres de antibióticos.<sup>92</sup>

Una vez que se encontró a la CIM, esta concentración del antimicrobiano se estableció como punto de partida para evaluar la CBM y CFM. Para la evaluación de este método se sembró en agar Mueller Hinton, mediante la técnica de estría, utilizando concentración de aceite esencial de los pocillos donde no hubo crecimiento de microorganismos (pocillos transparentes). Seguidamente, se incubó a 37°C durante 24 horas. Si los microorganismos no se desarrollaron en el medio, se consideró que estuvieron muertos. La placa en la que se sembró la concentración más baja del antimicrobiano donde no hubo crecimiento de microorganismos, correspondió a la CBM o CFM. El mismo procedimiento se ejecutó con todos los microorganismos en estudio (**Fig. 14**).



**Fig. 14** Método de dilución en caldo para evaluar la CIM y CBM o MFC.<sup>93</sup>

#### 4.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Microsoft Excel 2016, para realizar la estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación) según corresponde; mientras que, el software SPSS Statistics 21, fue utilizado para realizar la estadística diferencial, que constó de la prueba de análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), seguido de la prueba de Tukey, a un nivel de confianza de 95% ( $\alpha=0.05$ ).



### CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Obtención del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray

La identidad botánica del material vegetal utilizado para la extracción del aceite esencial, se confirmó en el laboratorio la facultad de Ciencias Biológicas del Departamento académico de Biología *HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)* de la Universidad Nacional de San Agustín, tal como se observa la respectiva constancia (**Anexo 1**).

Tal como se menciona en la metodología (**apartado 4.1.2**), la **Fig. 15** muestra la obtención del aceite esencial de Arrayán por decantación, que corresponde al líquido de la fase superior.



**Fig. 15** Obtención del aceite esencial de Arrayán.

Fuente: elaboración propia.

Algunos autores refieren la extracción de aceites esenciales a partir de un material vegetal seco, es el caso por ejemplo del estudio realizado por Carhuapoma<sup>7</sup>, en el que extrajo aceite esencial de Arrayán para evaluar su actividad antioxidante. Sin embargo, diversos estudios demostraron el cambio de la composición del aceite esencial, específicamente la disminución de los compuestos volátiles, cuando se somete el material vegetal a diferentes métodos de secado; evidenciándose así, que la forma

adecuada de obtención de aceites esenciales es a partir del material vegetal fresco,<sup>94,95</sup> razón por la que en el presente estudio se utilizó hojas frescas de Arrayán para la obtención del aceite esencial.

Por otro lado, la **Tabla N° 7** muestra el porcentaje del rendimiento de la extracción del aceite esencial de Arrayán, expresado en volumen/peso (v/p), que corresponde a los mililitros de aceite esencial obtenido por cada 100g de material vegetal. Se observa que, considerando las hojas frescas de Arrayán se obtuvo un 0.11% de rendimiento; además, éste rendimiento de extracción confirma lo señalado por diversos autores que refieren un rendimiento de 0.005% - 10%.<sup>18</sup>

**Tabla N° 7** Rendimiento de la extracción de aceite esencial de Arrayán.

N° de extracción	Hojas de Arrayán fresco (g)	Volumen de aceite esencial (mL)	Rendimiento (% v/p)
I	3220	3.5	0.11
II	3200	3.4	0.11
III	3320	3.6	0.11
IV	3220	3.5	0.11
V	3310	3.6	0.11
VI	3250	3.5	0.11
	Promedio		0.11
	DS		0.0010
	CV (%)		0.91

Fuente: elaboración propia.

## 2. Caracterización del aceite esencial

### 2.1. Características organolépticas

La **Fig. 16** muestra el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, obtenido por el método descrito anteriormente. Tal como refieren Li Y. *et al.*,<sup>19</sup> los aceites esenciales frecuentemente presentan un color amarillo, con un olor aromático característico al material vegetal; además, se pudo evidenciar el aspecto límpido y oleoso, aceitoso y untuoso al tacto y de sabor amargo.



**Fig. 16** *Aceite esencial de Arrayán.*

Fuente: elaboración propia.

## 2.2. Características físicas

La **Tabla N° 8** muestra los valores de las características físicas del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, determinados a 20°C. Se observa que la densidad relativa es de 0.913g/mL, valor que se encuentra dentro de lo que refieren muchos autores<sup>17</sup>; además, se asemeja al hallado por Carhuapoma M.,<sup>7</sup> quien determinó una densidad de 0.9044g/mL del aceite esencial del mismo material vegetal.

Por otro lado, el índice de refracción del aceite esencial obtenido fue de 1.47; de forma similar al parámetro anterior, se encuentra dentro del rango frecuente de los aceites esenciales (1.45 – 1.59),<sup>17</sup> y similar al índice de refracción del aceite esencial que obtuvo Carhuapoma M.<sup>7</sup>

**Tabla N° 8** *Características físicas del aceite esencial de Arrayán.*

Característica	Valor
Densidad relativa (g/mL)	0.913
Índice de refracción	1.47
Solubilidad en etanol 96%	Soluble
Solubilidad en etanol 70%	1:9
Solubilidad en agua	Insoluble

Fuente: elaboración propia.

En cuanto a la solubilidad, la **Tabla N° 8** muestra también que el aceite esencial de *Luma chequen* fue soluble en todas las proporciones de etanol al 96%,

por lo que se define que el aceite esencial es miscible con ésta concentración de alcohol; mientras que para solubilizar un volumen de aceite esencial fue necesario nueve volúmenes de alcohol al 70% (solubilidad 1:9); por otro lado, el aceite esencial fue insoluble en agua, en todas las proporciones. Además, Baser & Buchbauer refieren que la solubilidad de los aceites esenciales depende de la composición química; es así que los aceites esenciales ricos en compuestos oxigenados, son más fácilmente solubles en etanol diluido que los ricos en compuestos hidrocarbonados.<sup>17</sup> Por lo que éstos últimos compuestos podrían estar presentes, mayoritariamente, en el aceite esencial de Arrayán.

### 2.3. Composición química

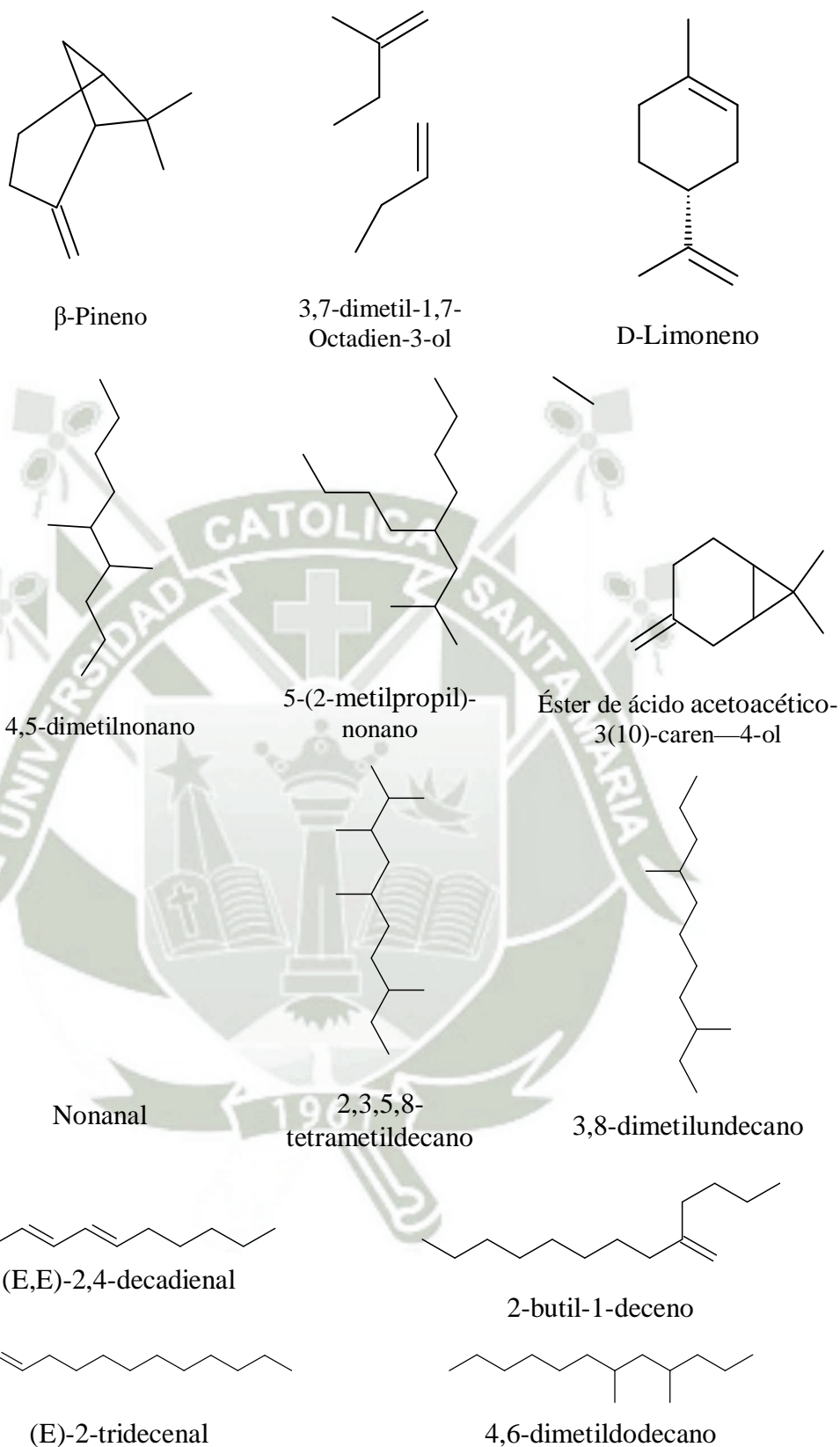
#### 2.3.1. Cromatografía de gases

El **anexo N° 2** muestra el cromatograma GC-MS del aceite esencial de arrayán, obtenido por el cromatógrafo Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra. Considerando el tiempo de retención de cada componente, se identificó varios compuestos que se listan en la **Tabla N° 9** y se observan las respectivas estructuras en la **Fig. 17**

**Tabla N° 9** Identificación de compuestos presentes en el aceite esencial de *Luma chequen (Molina) A. Gray*, por GC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Composición porcentual (%)
D-Limoneno	8.905	16.35
$\beta$ -Pino	8.418	7.14
2,3,5,8-tetrametildecano	11.878	6.47
4,5-dimetilnonano	9.073	6.14
Nonanal	9.559	6.04
3,8-dimetilundecano	12.135	5.86
2-butil-1-deceno	12.655	4.77
5-(2-metilpropil)-nonano	9.121	4.52
(E)-2-tridecenal	12.696	4.51
Éster de ácido acetoacético-3(10)-caren-4-ol	9.153	4.31
(E,E)-2,4-decadienal	12.16	4.19
4,6-dimetildodecano	12.766	3.99
3,7-dimetil-1,7-Octadien-3-ol	8.714	3.62

Fuente: elaboración propia.



**Fig. 17** Estructura química de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, por GC-MS

Fuente: elaboración propia.

En la **Tabla N° 9** se observa que los compuestos presente en mayor porcentaje son el D-limoneno (16.35%); seguido de  $\beta$ -pineno (7.14%); 2,3,5,8-tetrametildecano (6.47%); 4,5-dimetilnonano (6.14%); nonanal (6.04%) y los demás compuestos en una cantidad menor al 6%. Ruíz et al., reportaron la presencia de limoneno, como principal componente del aceite esencial de Arrayán; además, refirieron la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$  – pineno.<sup>8</sup>

Otros estudios, como los realizados por Carhuapoma<sup>7</sup> y Vallverdú *et al.*<sup>10</sup>, refirieron identificar también los compuestos antes mencionados; sin embargo, refieren que el constituyente mayoritario del aceite esencial que obtuvieron fue  $\alpha$ -pineno. Además, éstos estudios utilizaron *Luma chequen* (Molina) A. Gray de la región de Ayacucho, mientras que en el presente estudio el material vegetal utilizado fue de la región del Cusco; por lo que la diferencia, de la composición química, es probablemente debido al origen del material vegetal.

### 3. Identificación de los agentes patógenos

#### 3.1. *Escherichia coli*

Se caracterizó cinco muestras que refirieron la presencia de *E. coli*. Para tales muestras, se obtuvo los siguientes resultados que confirmaron la presencia de *E. coli*:

##### 3.1.1. Agar MacConkey

En los agares MacConkey, donde se sembró las muestras, aparecieron colonias rojas y no mucoides. La presencia de colonias rojas indicó la existencia de bacterias fermentadoras de lactosa. Estas bacterias probablemente formaron ácido láctico, ocasionando que el pH disminuya y que el indicador de pH del medio (rojo neutro) conserve su color rojo. Estas colonias se muestran en la **Fig. 18(a)**.

### 3.1.2. Tinción de Gram

Luego de la realización de la tinción de Gram, se observó la presencia de bacilos color rojo, lo que indicó que son bacilos Gram-negativos (**Fig. 18(b)**). El color rojo mostró que la safranina tiñó a estas bacterias, debido a que tuvieron una capa delgada de peptidoglicano y una bicapa lipoproteica, que fueron alteradas en el proceso de decoloración.

### 3.1.3. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Los microorganismos sembrados en los agares de TSI, produjeron que el medio se torne totalmente amarillo (A/A), lo que indicó que se produjo la fermentación de la glucosa, lactosa y/o sacarosa del medio, probablemente por la formación de algunos ácidos que provocaron que el pH del medio disminuya. Esto fue evidenciado por el viraje del indicador de pH (rojo fenol), de rojo a amarillo. Además, se observó la ruptura de los medios, lo que señaló la producción de gas y el medio no se tornó negro, mostrando que no se produjo sulfuro de hidrógeno. Estas características se muestran en la **Fig. 18 (c)**.

### 3.1.4. Agar Lisina Hierro (LIA)

En los agares LIA, en los cuales se sembró las bacterias, mostraron una coloración purpura en todo el medio (K/K). Esta coloración fue un indicativo de que estas bacterias pudieron descarboxilar la lisina, pero no pudieron desaminarla. Además, no se observó la aparición de un color negro en el medio, lo que descartó la formación de sulfuro de hidrógeno (**Fig. 18(d)**).

### 3.1.5. Agar Citrato de Simmons

La presencia de las bacterias que fueron sembradas en los agares citrato de Simmons, ocasionó que estos permanecieran de color verde (**Fig. 18(e)**). Esto indicó que las bacterias no utilizaron al citrato de sodio como recurso de

carbano (no presentaron a la citrato permeasa) y posiblemente no se desarrollaron en el medio. Esto ocasionó que el indicador de pH (azul de bromotimol) no se vea alterado; por lo tanto, el medio conservó su color verde.

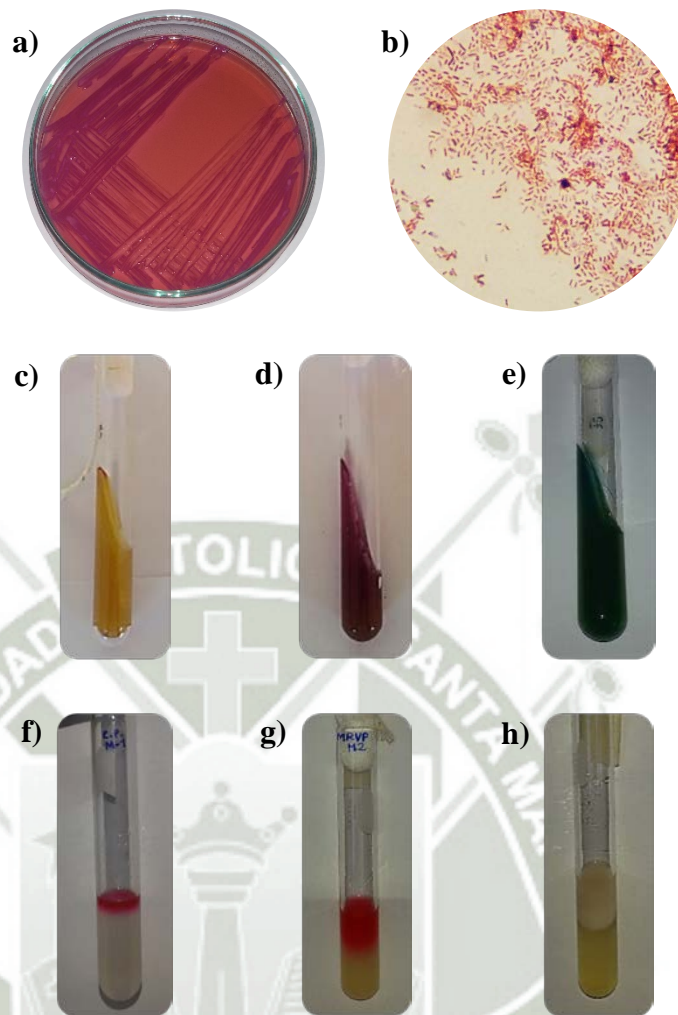
### 3.1.6. Prueba del Indol

En las pruebas del indol, se observó la formación de un anillo rojo en la superficie de los medios, después de la reacción con el reactivo de Kovacs (**Fig. 18(f)**). Esto mostró la presencia de indol en el caldo peptonado, el cual se formó por la degradación del triptófano mediante la enzima triptofanasa que tuvieron estas bacterias.

### 3.1.7. Prueba Rojo de Metilo – Voges Proskauer (MRVP)

La prueba MRVP mostró que, en los tubos tratados con rojo de metilo, se tornaron rojos en la parte superior. Por otro lado, los tubos tratados con  $\alpha$ -naftol e hidróxido de potasio no mostraron ningún cambio (**Fig. 18(g) y (h)**). Esto demostró que estas bacterias siguieron la vía ácido-mixta para la metabolización de la glucosa. Existen referencias que señalan que la bacteria *E. coli* es VP:- y RM:+, lo que indica que esta bacteria utiliza vía ácido-mixta para metabolizar a la glucosa.<sup>50,96</sup>

Estos resultados confirmaron que las muestras recolectadas tuvieron la presencia de la *E. coli*. Lo cual sirvió para evaluar la susceptibilidad de esta bacteria frente al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



**Fig. 18** Pruebas de caracterización de la *E. coli*. a) Agar MacConkey: colonias rojas fermentadoras de glucosa, b) Tinción de Gram: Bacilos Gram-negativos, c) Agar TSI: A/A +-, d) Agar LIA: K/K -, e) Agar Citrato de Simmons: citrato permeasa negativa, f) Prueba del Indol: positiva, g) Prueba Rojo de Metilo – h) Voges Proskauer: MR-positivo y VP-negativo.

Fuente: elaboración propia

### 3.2. *Pseudomona aeruginosa*

Las cinco muestras que indicaban la presencia de *P. aeruginosa* fueron caracterizadas. Estas muestras dieron los siguientes resultados:

### 3.2.1. Agar MacConkey

Luego de la incubación de los agares MacConkey, se observó la aparición de colonias grandes con una pigmentación de color azul verdoso, estableciéndose que estas bacterias fueron capaces de producir pigmentos. Asimismo; el medio se tornó amarillo, lo que indicó que hubo un cambio de pH de neutro a básico, probablemente por la utilización de peptona por parte de estas bacterias, ocasionando la formación de amoníaco e incrementándose el pH. Este cambio de color de rojo a amarillo, se produjo por el viraje del indicador de pH (rojo neutro). Las colonias se muestran en la **Fig.19(a)**.

### 3.2.2. Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram a las cinco muestras, obteniéndose bacilos Gram-negativos, los cuales se muestran en la **Fig. 19(b)**. Estos resultados indican que son bacterias cuya estructura fue susceptible al proceso de decoloración con etanol-acetona, debido a que presentan una bicapa lipoproteica y una delgada capa de peptidoglicano.

### 3.2.3. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Los agares TSI, con la presencia de estas bacterias, mostraron un color rojo en todo el tubo (K/K), esto se produjo por la falta de fermentación las azúcares (glucosa, lactosa y sacarosa); ya que, probablemente la bacteria solo consumió el recurso de nitrógeno (pluripeptona), provocando la formación de amoníaco, aumentando el pH y haciendo virar al indicador de pH (rojo fenol) a un rojo más intenso. Además, no se observó la producción de gases ni de sulfuro de hidrógeno, en los tubos (**Fig. 19(c)**).

### 3.2.4. Agar Citrato de Simmons

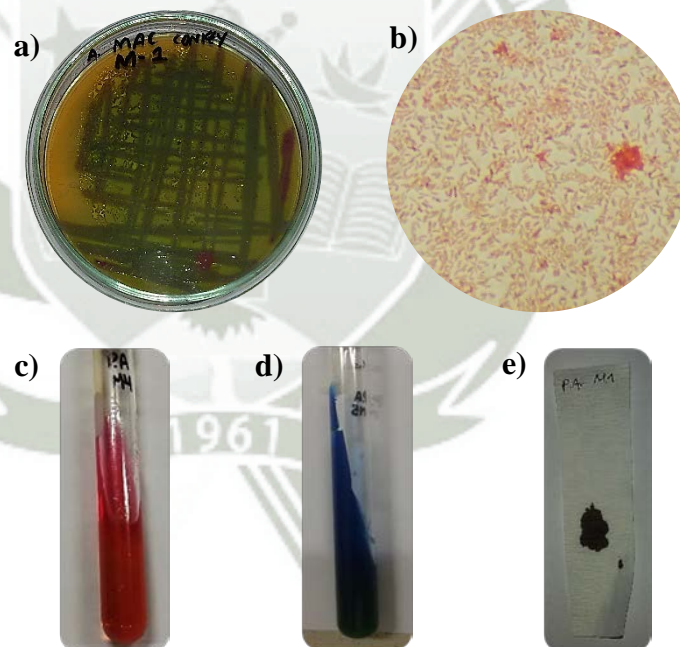
Las bacterias sembradas en los agares de citrato de Simmons, produjeron que los medios exhiban un color azul (**Fig. 19(d)**). Este color indicó que las bacterias presentan la enzima citrato permeasa, la cual puede

metabolizar al citrato, provocando posiblemente la formación de carbonatos y bicarbonatos alcalinos. Esto ocasionó que el indicador de pH (azul de bromotimol) cambie de color por el medio básico, de verde a azul.

### 3.2.5. Prueba de la oxidasa

Las pruebas de la oxidasa ejecutadas, dieron como resultado la aparición de una mancha purpura oscuro en el papel filtro (**Fig. 19(e)**). Esto indicó que el reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina fue oxidado, por la enzima oxidasa presente en estas bacterias.

Los resultados obtenidos corroboraron la presencia de la *P. aeruginosa* en las distintas muestras obtenidas. Estos ejemplares de la *P. aeruginosa* fueron utilizados para estudiar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



**Fig. 79** Pruebas de caracterización de la *P. aeruginosa* a) Agar MacConkey: Colonias azul verdoso y no fermentan lactosa, b) Tinción de Gram: Bacilos Gram-negativos, c) Agar TSI: K/K -, d) Agar Citrato de Simmons: citrato permeasa positiva, e) Prueba de la Oxidasa: positiva.

Fuente: elaboración propia

### 3.3. *Staphylococcus aureus*

Cinco muestras que refirieron la presencia de *S. aureus*, fueron caracterizadas para asegurar la presencia de estas bacterias. Se obtuvo los siguientes resultados en el proceso de caracterización:

#### 3.3.1. Agar Manitol Salado

Los agares manitol salado, luego del proceso de incubación, mostraron el crecimiento adecuado de colonias amarillas y el medio también se tornó amarillo (**Fig. 20(a)**). Esto indicó que estas bacterias soportaron la alta concentración de cloruro de sodio; asimismo, presentaron la habilidad de fermentar al manitol, lo que produjo la formación de ácidos que alteraron el pH del medio, ocasionando que el indicador de pH (rojo fenol) cambie de rojo a amarillo.

#### 3.3.2. Tinción de Gram

Después de la tinción de Gram, se obtuvo de que las bacterias son cocos agrupados en forma de racimos (estafilococos) Gram-positivos (**Fig. 20(b)**). Esto indicó que estas bacterias poseen una pared celular gruesa, compuesta por peptidoglicano y polímeros secundarios, que les permite resistir al proceso de decoloración.

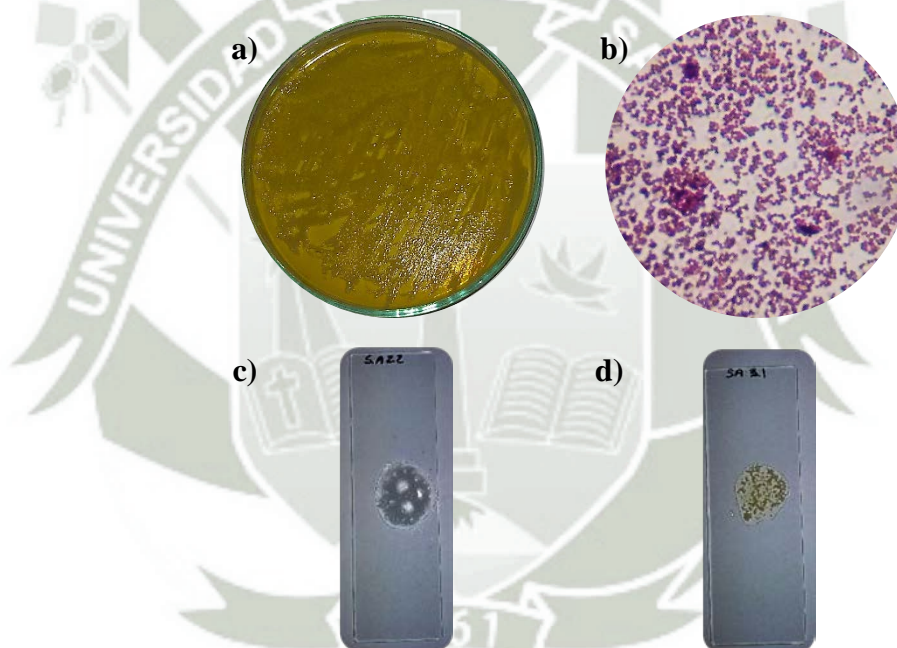
#### 3.3.3. Prueba de la Catalasa

La prueba de la catalasa, mostró que las bacterias produjeron burbujas de gas al contacto con el peróxido de hidrógeno (**Fig. 20(c)**). Estos resultados señalaron que las bacterias estudiadas pueden producir catalasa.

### 3.3.4. Prueba de la coagulasa

Las bacterias estudiadas, luego de la prueba de la coagulasa, mostraron la formación de grumos (Fig. 20(d)). Estos resultados mostraron que estas bacterias producen la enzima coagulasa, la cual convirtió el fibrinógeno en fibrina, evidenciándose en la aparición de grumos en el plasma humano.

La presencia del *S. aureus* fue confirmada, en las muestras obtenidas, mediante los resultados hallados. Por lo cual, estas bacterias fueron utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



**Fig. 20** Pruebas de caracterización de la *S. aureus* a) Agar Manitol Salado: Colonias amarillas y fermentación del manitol, b) Tinción de Gram: estafilococos Gram-positivos, c) Prueba de la catalasa: positiva, d) Prueba de la Coagulasa: positiva.

Fuente: elaboración propia

### 3.4. *Staphylococcus epidermidis*

Se caracterizó, las cinco muestras que refirieron la presencia de *S. epidermidis*, con el fin de constatar su presencia. Los resultados obtenidos en el proceso de caracterización fueron:

#### 3.4.1. Agar Manitol Salado

Se observó colonias rojas y rodeadas de medio del mismo color, en los agares manitol salado que fueron utilizados para la caracterización de estas muestras (**Fig. 21(a)**). Los resultados obtenidos fueron indicativo de que estas bacterias resistieron las altas concentraciones de cloruro de sodio del medio. Además, estas bacterias no fermentaron al manitol, ya que aparecieron colonias rojas rodeadas de medio rojo. Esto posiblemente ocurrió debido a que estas bacterias solo consumieron los recursos de nitrógeno (pluripeptona), lo que formó amoníaco e incremento el pH del medio, ocasionando que el indicador de pH (rojo fenol) vire a un rojo más intenso.

#### 3.4.2. Tinción de Gram

Las bacterias estudiadas luego de la tinción de Gram, indicaron ser cocos Gram-positivos en forma de racimos (estafilococos), los cuales se muestran en la **Fig. 21(b)**. Estas bacterias resistieron el proceso de decoloración con etanol-acetona, debido a que presentaron una pared celular gruesa (peptidoglicano y polímeros secundarios).

#### 3.4.3. Prueba de la catalasa

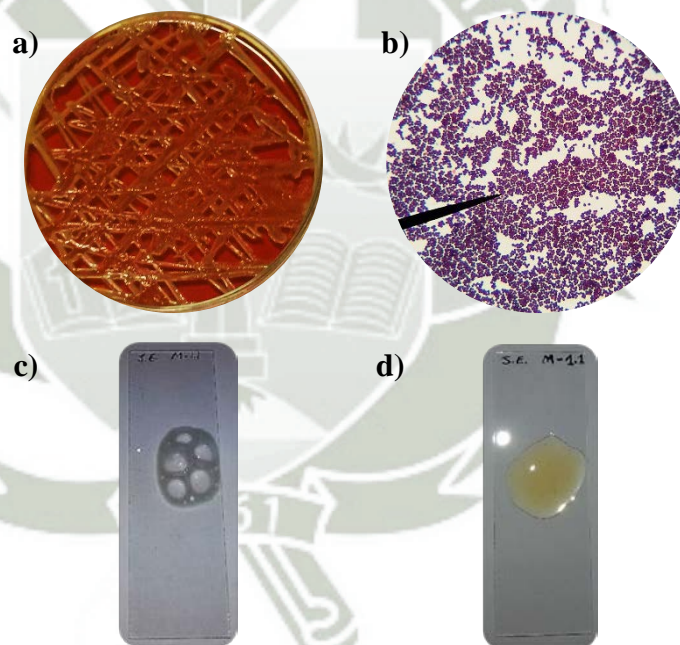
Las bacterias que fueron evaluadas, mostraron en la prueba de la catalasa la formación de burbujas de gas o efervescencia, en presencia de peróxido de hidrógeno, esta reacción se observa en la **Fig. 21(c)**. Por lo tanto,

estas bacterias pudieron producir catalasa que degradó al peróxido de hidrógeno.

#### 3.4.4. Prueba de la coagulasa

La prueba de la coagulasa, mostró que las bacterias estudiadas no formaron grumos, cuando estuvieron en contacto con el plasma humano (**Fig. 21(d)**). Estos resultados indicaron que estas bacterias no producen la enzima coagulasa.

Estos resultados confirmaron la presencia de la bacteria *S. epidermidis* en las muestras recolectadas. Estas bacterias fueron utilizadas para evaluar su susceptibilidad frente al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



**Fig. 21** Pruebas de caracterización de la *S. epidermidis* a) Agar Manitol Salado: Colonias rojas y no fermentan al manitol, b) Tinción de Gram: estafilococos Gram-positivos, c) Prueba de la catalasa: positiva, d) Prueba de la Coagulasa: negativa.

Fuente: elaboración propia

### 3.5. *Candida albicans*

Las muestras que indicaron la presencia de *C. albicans* fueron caracterizadas, con el objetivo de corroborar su presencia. Los resultados obtenidos en la evaluación de estas muestras fueron:

#### 3.5.1. Examen Directo

Se realizó el examen directo a los microorganismos estudiados. Se observó la presencia de células de levadura y pseudohifas al microscopio, las cuales se muestran en la **Fig. 22(a)**.

#### 3.5.2. Agar Sabouraud

Los agares sabouraud, con la presencia de estos microorganismos, mostraron el crecimiento de colonias lisas, brillantes y blanquecinas (**Fig. 22(b)**). Este agar es selectivo para el crecimiento de hongos y levaduras, ya que posee un antibacteriano (cloranfenicol) y un pH ácido.

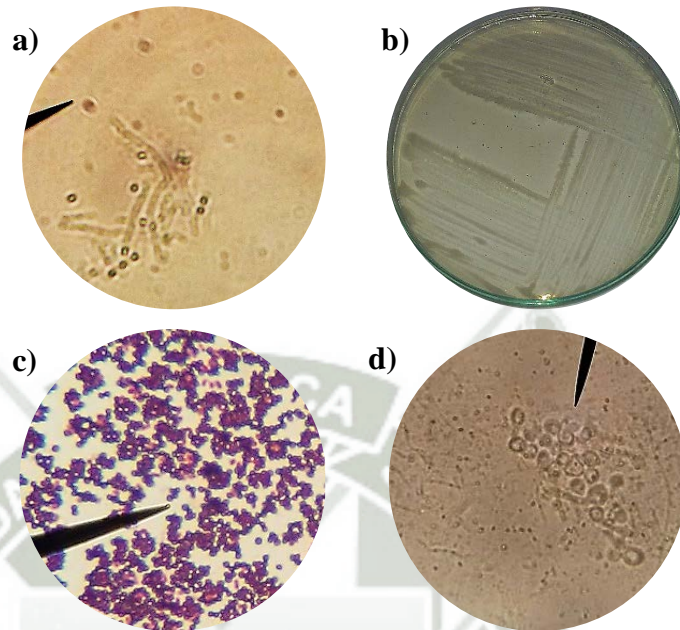
#### 3.5.3. Tinción de Gram

Luego de la realización de la tinción de Gram, se observó la presencia de células grandes, esféricas y Gram-positivas (**Fig. 22(c)**). Las levaduras se comportan como organismos Gram-positivos, estas presentan una pared celular gruesa que les permite resistir el proceso de decoloración, lo que les permite adquirir una tonalidad purpura, pero no necesariamente son Gram-positivas.

#### 3.5.4. Prueba del Tubo Germinativo

La prueba del tubo germinativo, dio como resultado la visualización de una estructura elongada proveniente de la célula levaduriforme, semejante a un espejo de mano (excrecencias de hifas), las cuales se muestran en la **Fig. 22(d)**.

La presencia de *C. albicans* fue confirmada en las muestras analizadas. Estos hongos fueron utilizados para evaluar su susceptibilidad frente al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



**Fig. 22** Pruebas de caracterización de la *C. albicans* a) Examen directo: células de levadura y pseudohifas, b) Agar Sabouraud: colonias lisas y blanquecinas, c) Tinción de Gram: células grandes, esféricas y Gram-positivas, d) Prueba del tubo germinativo: excrecencias de hifas.

Fuente: elaboración propia

#### 4. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial

Luego de la incubación de la microdiluciones, se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *C. albicans*.

El efecto antimicrobiano fue evaluado mediante el hallazgo de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM)/concentración mínima fungicida (CFM). La CIM se determinó buscando el pocillo que no mostró turbidez después de la incubación. Este pocillo representó la concentración más baja del aceite esencial que inhibió el crecimiento visible de los microorganismos estudiados. Por otro lado, la CBM/CFM se estableció mediante la búsqueda de la placa que no

presento crecimiento microbiano. Esta placa represento a la concentración de aceite esencial que mató al 99.9% de los microorganismos estudiados. Además, para asegurar que el tween 80, que se agregó para la emulsión del aceite esencial, no intervino en el efecto antimicrobiano; se realizó un blanco para cada cepa microbiana, el cual se detalla en la parte metodológica.

En general se encontró que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, presentó efecto antimicrobiano sobre los microorganismos estudiados. Esto podría deberse a su composición, donde se pudo cuantificar cantidades importantes de  $\beta$ -pineno y D-limoneno, los cuales son potentes agentes antimicrobianos.<sup>97,98</sup>

#### 4.1. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *E. coli*

##### 4.1.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presentó actividad antimicrobiana sobre las cepas de *E. coli*, estableciéndose que la concentración inhibitoria mínima fue de 8% v/v (80 uL/mL) del aceite esencial. Estos resultados se muestran en la **Tabla N° 10**. Un estudio que utilizó a la *Pimenta pseudocaryophyllus* que pertenece a la familia *Myrtaceae*, en la cual se encuentra la *Luma chequen* (Molina) A. Gray, indicó que esta planta presenta un CIM para *E. coli* de 4.8% v/v, indicando su posible efecto antibacteriano a los terpenos que constituyen a esta planta.<sup>99</sup>

**Tabla N° 10** Determinación de la CIM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *E. coli*

Muestra de <i>E. coli</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

(+): Pocillo con crecimiento bacteriano

(-): Pocillo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.1.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

Luego de la determinación de la CIM, se determinó la CBM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray sobre las cepas de *E. coli*, obteniéndose un resultado de 10% v/v (100 uL/mL) de aceite esencial (**Tabla N° 11**). Si comparamos con el CIM podemos encontrar que este es menor, ya que este valor solo indicó la cantidad de aceite esencial necesaria que evitó el crecimiento bacteriano; sin embargo, la CBM es un valor que muestra que no solo hubo una inhibición de la *E. coli*, sino también que causó la muerte de la misma. Por otro parte, se ha reportado una investigación la cual indica que el aceite esencial de *Cordia globosa*, que presenta dentro de sus componentes al  $\beta$ -pineno y D-limoneno, puede alterar las membranas celulares de la *E. coli*,<sup>100</sup> pudiéndose dar un comportamiento similar con la planta estudiada.

**Tabla N° 11** Determinación de la CBM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *E. coli*

Muestra de <i>E. coli</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	R	R	R	R	R	R	R	+	+	-	+
2	R	R	R	R	R	R	R	+	+	-	+
3	R	R	R	R	R	R	+	+	-	-	+
4	R	R	R	R	R	R	R	+	+	-	+
5	R	R	R	R	R	R	R	+	+	-	+

(R): Realizado: concentraciones donde hubo crecimiento en la evaluación de CIM y no utilizadas en la CBM

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.2. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *P. aeruginosa*

##### 4.2.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Como fue descrito en la parte metodológica, la *P. aeruginosa* presentó mayor resistencia al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. Debido a esto, se utilizó una solución patrón de mayor concentración (50% v/v). La CIM frente a la *P. aeruginosa* fue de 20 % v/v (200 uL/mL) del aceite esencial (**Tabla N° 12**).

**Tabla N° 12** Determinación de la CIM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina)

A. Gray frente a *P. aeruginosa*

Muestra de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)								
	10	12	14	16	18	20	22	24	Blanco
1	+	+	+	+	+	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+	-	-	-	+
3	+	+	+	+	+	-	-	-	+
4	+	+	+	+	+	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+	-	-	-	+

(+): Pocillo con crecimiento bacteriano

(-): Pocillo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.2.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

La CBM frente a la *P. aeruginosa* fue 24% v/v (240 uL/mL) de aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, como se puede observar en la **Tabla N° 13**. El efecto antimicrobiano sobre esta bacteria, confirmó que este aceite esencial puede afectar a las Gram-negativas.

**Tabla N° 13** Determinación de la CBM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina)

A. Gray frente a *P. aeruginosa*

Muestra de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)								
	10	12	14	16	18	20	22	24	Blanco
1	R	R	R	R	R	+	+	-	+
2	R	R	R	R	R	+	+	-	+
3	R	R	R	R	R	+	+	-	+
4	R	R	R	R	R	R	+	-	+
5	R	R	R	R	R	+	+	-	+

(R): Realizado: concentraciones donde hubo crecimiento en la evaluación de CIM y no utilizadas en la CBM

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.3. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *S. aureus*

##### 4.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presentó una CIM frente al *S. aureus* de 5% v/v (50uL/mL) de aceite esencial (**Tabla N° 14**). Estos resultados demuestran que este aceite esencial también mostró actividad sobre bacterias Gram-positivas. Existen diversas investigaciones que indican

que los aceites esenciales pueden presentar efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram-positivas, específicamente sobre el *S. aureus*. Estas investigaciones refieren que este efecto sobre las bacterias está directamente relacionado a su composición ( $\beta$ -pineno, D-limoneno, etc.).<sup>100,101</sup>

**Tabla N° 14** Determinación de la CIM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *S. aureus*.

Muestra de <i>S. aureus</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

(+): Pocillo con crecimiento bacteriano

(-): Pocillo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.3.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

La CBM fue 6% v/v (60 uL/mL) de aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a la bacteria *S. aureus*. Estos resultados se muestran en la **Tabla N° 15**.

**Tabla N° 15** Determinación de la CBM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *S. aureus*

Muestra de <i>S. aureus</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
2	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
3	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
4	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
5	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+

(R): Realizado: concentraciones donde hubo crecimiento en la evaluación de CIM y no utilizadas en la CBM

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.4. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *S. epidermidis*

##### 4.4.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

El CIM obtenido frente al *S. epidermidis* por parte del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray fue de 5% v/v (50 uL/mL) (Tabla N° 16). El efecto antimicrobiano sobre esta bacteria, corroboró que este aceite esencial puede actuar frente a Gram-positivas.

**Tabla N° 16** Determinación de la CIM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *S. epidermidis*

Muestra de <i>S.</i> <i>epidermidis</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

(+): Pocillo con crecimiento bacteriano

(-): Pocillo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

##### 4.4.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presentó una CBM de 6% v/v (60 uL/mL) frente al *S. epidermidis*. Estos resultados se muestran en la Tabla N° 17. Se ha reportado una investigación, donde se indicó que el aceite esencial de *Blumea eriantha*, presenta una CBM de 6.25% v/v frente al *S. epidermidis*, la cual es similar a la encontrada en el presente estudio.<sup>102</sup> Además, se ha descrito que el aceite esencial de *Citrus limon*, el cual presenta en su composición principalmente  $\beta$ -pineno y D-limoneno, presentó una CIM de 0.6% v/v frente a *S. epidermidis*. Esto podría indicar que estos componentes están directamente relacionados a la actividad antimicrobiana frente a esta bacteria.

**Tabla N° 17** Determinación de la CBM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *S.epidermidis*.

Muestra de <i>S. epidermidis</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray(% v/v)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
2	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
3	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
4	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+
5	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	+

(R): Realizado: concentraciones donde hubo crecimiento en la evaluación de CIM y no utilizadas en la CBM

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.5. Efecto antimicrobiano del aceite esencial sobre *C. albicans*

##### 4.5.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presentó efecto contra los hongos. Se determinó que la CIM de este aceite esencial frente a la *C. albicans* fue de 5% v/v (50 uL/mL). Como se observa en la **Tabla N°18** Según referencias bibliográficas el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* presentó en su composición  $\beta$ -pineno y D-limoneno; además, este aceite esencial exhibió un CIM sobre la *C. albicans* de 0.5% v/v.<sup>103</sup> La composición del aceite esencial *Luma chequen* (Molina) A. Gray, también incluyó a estos compuestos, lo que posiblemente indica que son responsables del efecto sobre la *C. albicans*.

**Tabla N° 18** Determinación de la CIM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *C. albicans*

Muestra de <i>C. albicans</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

(+): Pocillo con crecimiento bacteriano

(-): Pocillo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

#### 4.5.2. Determinación de la concentración fungicida mínima

La CFM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a la *C. albicans* fue 5% v/v (50 uL/mL) (Tabla N° 19). Se ha reportado que el aceite esencial de *Ferulago capillaris*, el cual presenta como componentes mayoritarios al  $\beta$ -pineno y D-limoneno, presentó una CFM de 0.32-0.64% v/v frente a la *C. albicans*. Estos monoterpenos son componentes que están directamente relacionados con la capacidad antifúngica de estos aceites esenciales.<sup>104</sup>

**Tabla N° 19** Determinación de la CFM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *C. albicans*

Muestra de <i>C. albicans</i>	Concentración aceite esencial <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Blanco
1	R	R	R	+	-	-	-	-	-	-	+
2	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+
3	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+
4	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+
5	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	+

(R): Realizado: concentraciones donde hubo crecimiento en la evaluación de CIM y no utilizadas en la CFM  
(+): Placa con crecimiento bacteriano  
(-): Placa sin crecimiento bacteriano  
Fuente: elaboración propia

#### 4.6. Comparación de las CIMs del aceite esencial

Se comparó las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a los microorganismos estudiados. Mediante el análisis de varianza de una sola vía (One-Way ANOVA) se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las CIMs del aceite esencial, como se muestra en la Tabla N° 20.

**Tabla N° 20** Prueba de ANOVA para los CIMs del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente los microorganismos en estudio

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	901,200	4	225,300	938,750	,000
Dentro de grupos	4,800	20	,240		
Total	906,000	24			

Fuente: elaboración propia

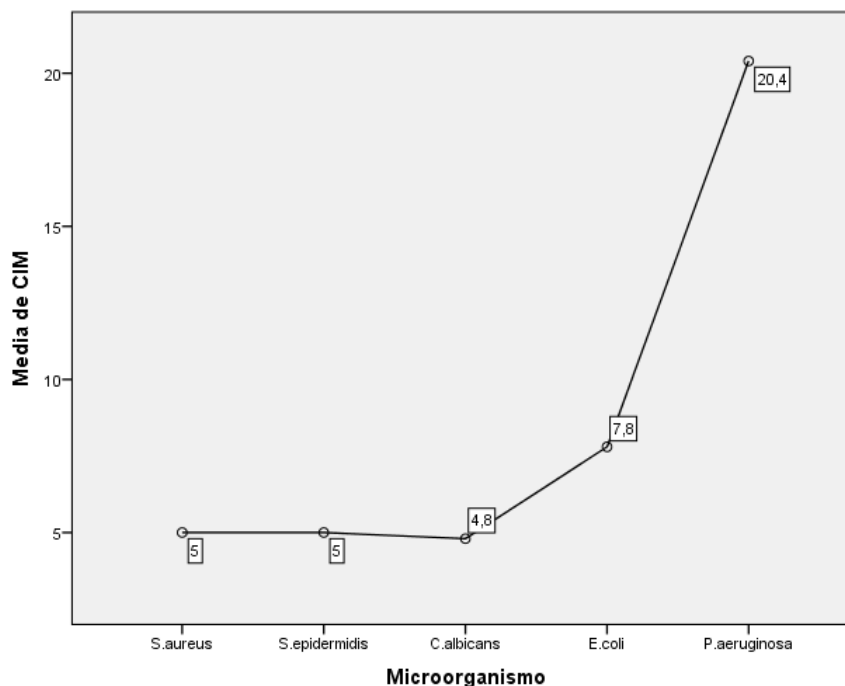
Seguidamente se realizó la prueba de Tukey que indicó que la CIM para *C. albicans*, *S. aureus* y el *S. epidermidis* son estadísticamente iguales ya que conforman un solo subconjunto. Por otra parte el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente a *E.coli* muestra diferencia significativa en cuanto a esta concentración respecto a los otros microorganismos ya que es mayor, finalmente con relación a *P.aeruginosa* la concentración difiere respecto de los otros dos subconjuntos. En conclusión podemos afirmar que el efecto antimicrobiano es distinta en estos tres grupos de análisis estadístico (tabla 21).

**Tabla N° 21** Prueba de Tukey para las CIMs del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente los microorganismos en estudio

Microorganismo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<i>C.albicans</i>	5	4,80		
<i>S.aureus</i>	5	5,00		
<i>S.epidermidis</i>	5	5,00		
<i>E.coli</i>	5		7,80	
<i>P.aeruginosa</i>	5			20,40
<b>Sig.</b>		,966	1,000	1,000

Fuente: elaboración propia

Estos resultados corroboraron que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, presentó actividad antimicrobiana en bacterias y en hongos. Resultados similares se reportaron en una investigación que evaluó el efecto antimicrobiano de este aceite esencial, donde se encontró una mayor actividad de la misma frente a los hongos.<sup>105</sup>



#### 4.7. Comparación de las CBMs/CFM del aceite esencial

Las concentraciones mínimas bactericidas / concentración mínima fungicida del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, con respecto a microorganismos estudiados, fueron evaluadas. El análisis de varianza de una sola vía, permitió establecer que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las CBMs/CFM del aceite esencial (**Tabla N° 22**).

**Tabla N° 22** Prueba de ANOVA para las CBMs/CFM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente los microorganismos en estudio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1264,560	4	316,140	7903,500	,000
Dentro de grupos	,800	20	,040		
Total	1265,360	24			

Fuente: elaboración propia

Por lo cual, mediante la prueba de Tukey se demostró que no existe diferencia significativa entre las CBMs del *S. aureus* y el *S. epidermidis*, y la CFM de la *C. albicans*. Asimismo; al igual que con el CIM, el aceite esencial tuvo menor efecto

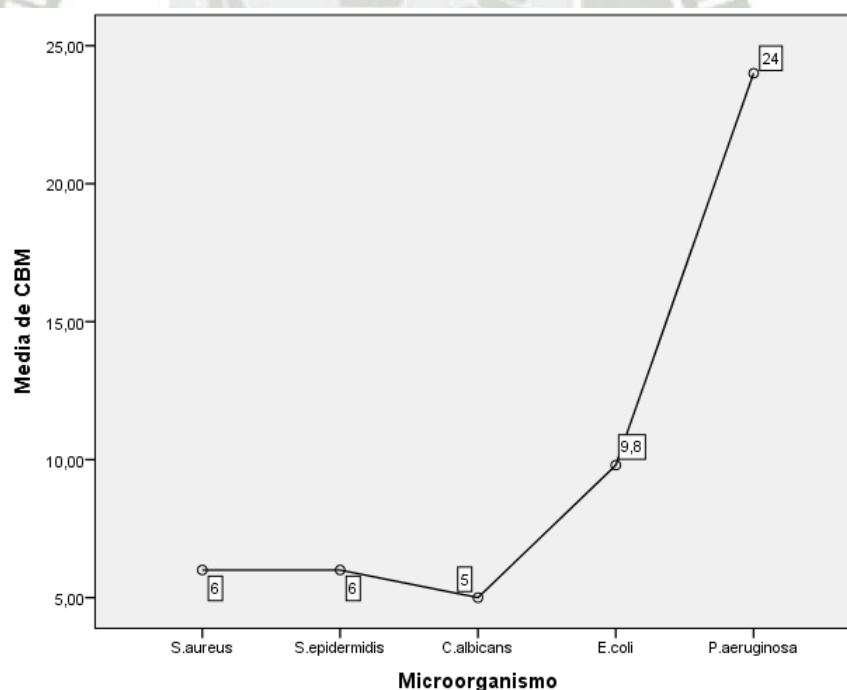
antimicrobiano frente a *P. aeruginosa*. Estos resultados se muestran en la **Tabla N° 23**.

Se han reportado diferentes estudios que indican que las bacterias Gram-negativas son más resistentes al efecto antimicrobiano de aceites esenciales que presentan en su composición al  $\beta$ -pineno y D-limoneno,<sup>100</sup> como sucedió con el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.

**Tabla N° 23** Prueba de Tukey para los CBMs/CFM del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray frente los microorganismos en estudio

Microorganismo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
<i>C.albicans</i>	5	5,0000			
<i>S.aureus</i>	5		6,0000		
<i>S.epidermidis</i>	5		6,0000		
<i>E.coli</i>	5			9,8000	
<i>P.aeruginosa</i>	5				24,0000
<b>Sig.</b>		1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: elaboración propia



## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, mediante destilación por arrastre de vapor, con un rendimiento de 0.11% (v/v).
2. El aceite esencial obtenido está constituido, principalmente, por D-limoneno (16.35%); seguido de  $\beta$ -pineno (7.14%); 2,3,5,8-tetrametildecano (6.47%); 4,5-dimetilnonano (6.14%); nonanal (6.04%), determinados por GC-MS.
3. El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray tiene actividad antimicrobiana con concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs) de 8%(v/v) (80uL/mL) para *E. coli*, 20%(200uL/mL) para *P. aeruginosa*, 5%(50uL/mL) para *S. aureus*, 5%(50uL/mL) para *S. epidermidis*, y 5%(50uL/mL) para *C. albicans*.
4. El aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray presenta concentraciones bactericidas o fungicida mínimas (CBMs o CFM) de 10% (v/v) (100uL/mL) para *E. coli*, 24%(240uL/mL) para *P. aeruginosa*, 6%(60uL/mL) para *S. aureus*, 6%(60uL/mL) para *S. epidermidis* y 5%(50uL/mL) para *C. albicans*.

## SUGERENCIAS

1. Profundizar el estudio de caracterización del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, evaluando la estabilidad física y química.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, utilizando otros agentes patógenos.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, *in vivo*, utilizando animales de experimentación.
4. Evaluar otros efectos potenciales del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (antioxidante, antiparasitario, insecticida, etc.).



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Matasyoh JC, Maiyo ZC, Ngure RM, Chepkorir R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. Food Chem. Elsevier; 2009;113(2):526–9.
2. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol. 1999;86(6):985–90.
3. Calo JR, Crandall PG, O’Byryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. Food Control. Elsevier; 2015;54:111–9.
4. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446–75.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol. 2004;94(3):223–53.
6. Gonçalves MJ, Cavaleiro C, da Cunha AP, Salgueiro LR. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Commercially Available Oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray. J Essent Oil Res. 2006 Jan;18(1):108–10.
7. Carhuapoma M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan.” UNMSM; 2006.
8. Ruiz C, Díaz C, Rojas R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista Soc Química del Perú. 2015;81(2):81–94.
9. Duke J. Handbook of medicinal herbs. 2nd Ed. New York: CRC press; 2002.
10. Vallverdú C, Vila R, Tomi F, Carhuapoma M, Casanova J, Cañigüeral S. Composition of the essential oil from leaves and twigs of *Luma chequen*. Flavour Fragr J. 2006;21(2):241–3.
11. Reynel C, Marcelo J. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Programa Reg ECOBONA. 2009;106–8.
12. Fitch WH. Curtis’s Botanical Magazine. London: Reeve Brothers; 1867. 5618-5682 p.
13. Labbe C, Coll J, Connolly JD, Faini F, Farrugia LJ, Rycroft DS. Bioactive flavanones from *Luma chequen*. Collect Czechoslov Chem Commun. 2002;67(1):115–23.

14. Jaramillo V, Macha G, Mejía Q. Determinación de la actividad hipocolesterolémica en extractos de parte aérea de *Luma chequen* “rayán castilla.” UNICA; 2004.
15. Alonso, Jorge: Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas. 1ª Edición. 2004. Editorial ISIS. Argentina.
16. Villar del Fresno, Angel: Farmacognosia General. 1ª Edición. 1999. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España.
17. Baser KHC, Buchbauer G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press; 2015.
18. Chemat F, Abert-Vian M, Fernandez X. Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas. In: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice. 2012. p. 53–68.
19. Li Y, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F. Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Cham: Springer International Publishing; 2014. 1-71 p. (SpringerBriefs in Molecular Science).
20. Moreira MR, Alvarez M V, Ponce AG. Essential Oils. In: Siddiqui MW, Ayala Zavala JF, Hwang C-A (Andy), editors. Postharvest Management Approaches for Maintaining Quality of Fresh Produce. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 113–24.
21. Hüsnu K, Başer C, Demirci F. Chemistry of essential oils. Flavours Fragrances Chem Bioprocess Sustain. 2007;43–86.
22. De Sousa DP. Bioactive Essential Oils and Cancer. de Sousa DP, editor. Bioactive Essential Oils and Cancer. Cham: Springer International Publishing; 2015. 1-292 p.
23. Berka-Zougali B, Besombes C, Allaf T, Allaf K. Extraction of Essential Oils and Volatile Molecules. In: Instant Controlled Pressure Drop (DIC) in Food Processing. Springer Scienc; 2014. p. 97–126.
24. Claudia Kuklinski, Farmaconosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, 2000.
25. Tigrine-Kordjani N, Meklati BY, Chemat F. Microwave “dry” distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils. Int J Aromather. 2006;16(3–4):141–7.

26. Guenther E. The essential oils. 1st ed. New York: D. VAN NOSTRAND COMPANY; 1948. 457 p.
27. Rouessac F, Rouessac A. Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2007. 1-574 p.
28. Touchstone JC. Thin Layer Chromatography. In: Handbook of Analytical Techniques. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008. p. 327–44.
29. Sandra PJF. Gas Chromatography. In: Handbook of Analytical Techniques. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008. p. 199–259.
30. Marriott PJ, Shellie R, Cornwell C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J Chromatogr A*. 2001;936(1–2):1–22.
31. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*. 2012;17(12):2542–66.
32. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000;88(2):308–16.
33. Dharan S, Rajasekaram G, Kaniappan P, Holzner P, Pittet D. In vitro evaluation of the tuberculocidal property of essential oils. *BMC Proc*. 2011;5(Suppl 6):P42.
34. Ghabraie M, Vu KD, Tata L, Salmieri S, Lacroix M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;66:332–9.
35. Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo a C, Barroso JG, Ruberto G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr J*. 1998;13:235–44.
36. Misharina TA, Polshkov AN. Antioxidant properties of essential oils: Autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential oil from coriander. *Appl Biochem Microbiol*. 2005;41(6):610–8.
37. Sahayaraj K. Basic and applied aspects of biopesticides. *Basic Appl Asp Biopestic*. 2014;1–384.
38. Dixon GR. Plant Pathogens and their Control in Horticulture. London: Macmillan Education UK; 1984. 1-9 p.
39. Poinar GO, Thomas GM. Bacteria. In: *In Laboratory Guide to Insect Pathogens*

- and Parasites. USA: Springer; 1977. p. 175–84.
40. Gregersen T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1978;5(2):123–7.
  41. Salton MR, Kim KS. Structure. In: *Medical Microbiology*. 4th ed. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
  42. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; 2015;13(10):620–30.
  43. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):1–16.
  44. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1794(5):808–16.
  45. König B, König W. Induction and suppression of cytokine release (tumour necrosis factor-alpha; interleukin-6, interleukin-1 beta) by *Escherichia coli* pathogenicity factors (adhesions, alpha-haemolysin). *Immunology.* 1993 Oct;78(4):526–33.
  46. Yang X, Wang H. Pathogenic *E. coli* (Introduction). 2nd Ed. Vol. 1, *Encyclopedia of Food Microbiology*. Lacombe: Elsevier; 2014. 695-701 p.
  47. Liu D. *Escherichia coli*. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. New South Wales: Elsevier; 2014. p. 1–13.
  48. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. In: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4th Ed. Wiley-Blackwell; 2010. p. 267–308.
  49. Chu W, Zere TR, Weber MM, Wood TK, Whiteley M, Hidalgo-Romano B, et al. Indole production promotes *escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(2):411–9.
  50. Percival SL, Williams DW. *Escherichia coli*. In: *Microbiology of Waterborne Diseases*. 2nd Ed. Elsevier; 2014. p. 89–117.
  51. Leclerc H, Mossel D a, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:201–34.
  52. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el tratamiento de las

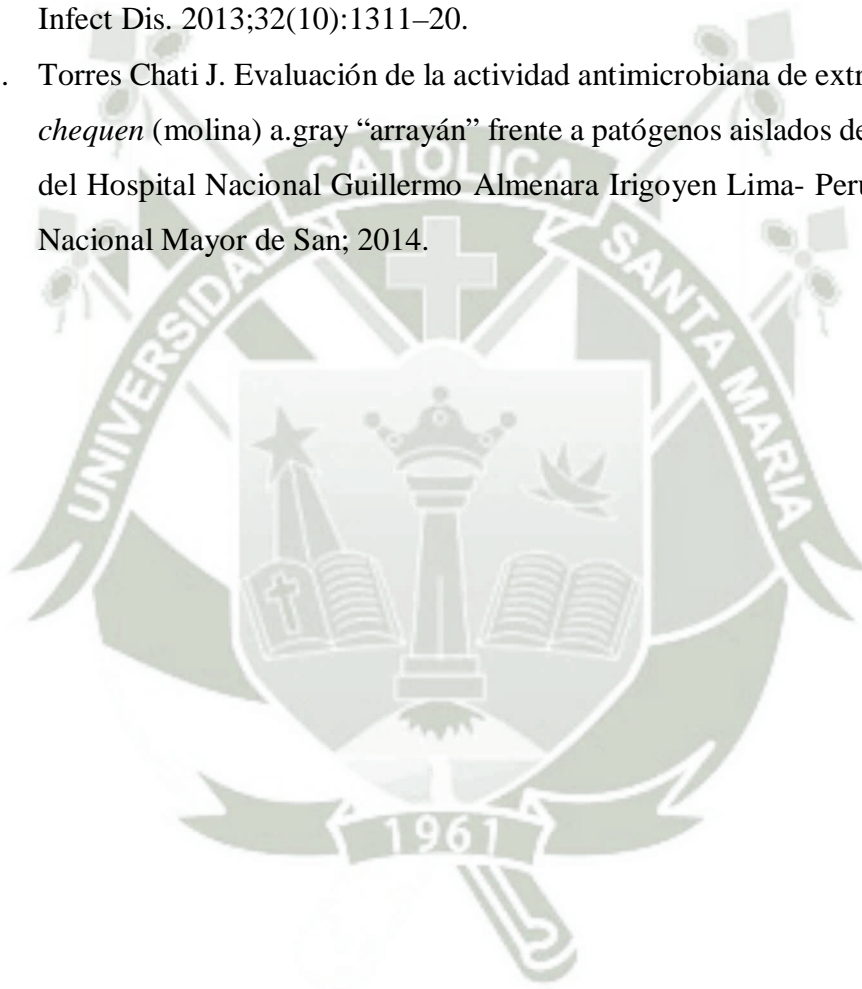
- enfermedades infecciosas. Washington; 2004. 1-294 p.
53. Collignon P. Resistant *Escherichia coli* - We Are What We Eat. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):202–4.
  54. Gacesa P, Russell NJ. *Pseudomonas* infection and alginates: biochemistry, genetics and pathology. Wales: Chapman and Hall; 2012. 1-233 p.
  55. Maybury BA, Moore JB, deWit SA. Antimicrobial susceptibilities of rough, smooth, and mucoid colony types of *Pseudomonas* isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;15(3):494–6.
  56. Zago A, Chugani S. *Pseudomonas*. In: *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd Ed. San Diego: Elsevier; 2009. p. 245–60.
  57. Ohman DE, Cryz SJ, Iglewski BH. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*. 1980;142(3):836–42.
  58. D'Argenio DA. The pathogenic lifestyle of *Pseudomonas aeruginosa* in model systems of virulence. In: *Pseudomonas*. USA: Springer; 2004. p. 477–503.
  59. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):111–30.
  60. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 7th Ed. Missouri: Elsevier; 2002.
  61. Foster TJ, Geoghegan JA. *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Ireland: Elsevier; 2015. p. 655–74.
  62. Bhunia A. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis*. USA: Springer; 2008. p. 125–34.
  63. Muruhan S, Rajan M, Konuku S. Morphological and biochemical characteristics and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from grapes. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis*. 2012;2(1):70–3.
  64. Aryee A, Edgeworth JD. Carriage, Clinical Microbiology and Transmission of *Staphylococcus aureus*. In: *Current topics in microbiology and immunology*. 2016. p. 3–32.

65. Habib F, Rind R, Durani N, Bhutto AL, Buriro RS, Tunio A, et al. Morphological and Cultural Characterization of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Different Animal Species. *J Appl Environ Biol Sci*. 2015;5(2):15–26.
66. Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Española Quimioter*. 2013;26(1):1–84.
67. Lowy F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1265–73.
68. Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control*. 2014;9(3):1–10.
69. Hamory BH, Parisi JT. *Staphylococcus epidermidis*: A significant nosocomial pathogen. *AJIC Am J Infect Control*. 1987;15(2):59–74.
70. Bello O, Osho A, Bankole S, Bello T. Antibiotic Susceptibility Profiles and Bacteriological Risks Associated With Used Toothbrushes: A Case Study of Some Apparently Healthy University Students in Southwestern Nigeria. *Am Int J Biol*. 2013;1(1):1–12.
71. Fey P. *Staphylococcus Epidermidis*. Totowa: Humana Press; 2014. 1-208 p. (Methods in Molecular Biology).
72. Singara Charya MA. Fungi: An Overview. In: *Plant Biology and Biotechnology*. New Delhi: Springer India; 2015. p. 197–215.
73. Bueno DJ, Silva JO. The Fungal Hypha. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd Ed. Elsevier; 2014. p. 11–9.
74. Prasad R. *Candida Albicans*. 1st Ed. *Journal of Chemical Information and Modeling*. Berlin: Springer; 1991. 1-267 p.
75. Hazen KC, Howell SA. *Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington: ASM Press; 2007. p. 1762–88.
76. Zhou X, Li Y. Oral Mucosal Microbes. In: *Atlas of Oral Microbiology*. London: Elsevier; 2015. p. 95–107.
77. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and Identification of *Candida* from

- the Oral Cavity. *ISRN Dent.* 2011;1:1–7.
78. Fidel PL. *Candida albicans: from commensal to pathogen.* In: *Medical Importance of the Normal Microflora.* USA: Springer; 1999. p. 441–76.
  79. Shepherd MG, Poulter RTM, Sullivan PA. *Candida Albicans: Biology, Genetics, and Pathogenicity.* *Annu Rev Microbiol.* 1985 Oct;39(1):579–614.
  80. Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans.* *Elife.* 2015;4:e00662.
  81. Narang S. *Growth of microorganisms.* In: *Food Microbiology.* New Delhi: APH Publishing Corporation; 2004. p. 15–89.
  82. Beveridge T. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem.* 2001 Jan;76(3):111–8.
  83. Claus D. A standardized Gram staining procedure. *World J Microbiol Biotechnol.* 1992;8:451–2.
  84. Woodland J. *Bacteriology.* In: *NWFHS laboratory procedures manual.* 2nd Ed. Arizona: Pinetop Fish Health Center; 2004. p. 1–44.
  85. Tiwari R, Hoondal G, Tewari R. *Microbial physiology: growth and metabolism.* In: *Laboratory techniques in microbiology and biotechnology.* Chandigarh: Global Media; 2008. p. 51–84.
  86. Turgeon M. *Clinical Laboratory Specializations.* In: *Linne & Ringsrud's clinical laboratory science: Concepts, Procedures and Clinical Applications.* Florida: Elsevier; 2015. p. 245–575.
  87. Aneja K. Preparation of culture media. In: *Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology.* 4th Ed. New Delhi: New Age International; 2003. p. 147–56.
  88. Fischbach F, Dunning M. *Microbiologic Studies.* In: *A manual of laboratory and diagnostic tests.* Wisconsin: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 8th Ed.
  89. Ponka D, Baddar F. Procedures Microscopic potassium hydroxide preparation. *Can Fam Physician.* 2014;60(1):57.
  90. Mohan S. *Fungi.* In: *Gram Stain: Looking Beyond Bacteria to Find Fungi in Gram Stained Smear.* Canada: AuthorHouse; 2009. p. 6–20.

91. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal. Elsevier*; 2016;6(2):71–9.
92. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Jul;48(1):5–16.
93. Amyes S, Miles R, Thomson C, Tillotson G. Sensitivity Test. In: *Antimicrobial Chemotherapy: Pocketbook.* CRC Press; 1996. p. 24–32.
94. Sellami IH, Wannas WA, Bettaieb I, Berrima S, Chahed T, Marzouk B, et al. Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2011;126(2):691–7.
95. Okoh OO, Sadimenko a P, Asekun OT, Afolayan a J. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *African J Biotechnol.* 2008;7(10):1500–2.
96. Goldman E, Green L. Practical Information and Procedures for Bacteriology. In: *Practical handbook of microbiology.* 2nd Ed. New York: CRC press; 2009. p. 3–201.
97. Espina L, Gelaw TK, de Lamo-Castellví S, Pagán R, García-Gonzalo D. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. *PLoS One.* 2013;8(2):e56769.
98. Silva ACR da, Lopes PM, Azevedo MMB de, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. Vol. 17, *Molecules.* 2012. p. 6305–16.
99. Lima M, Cordeiro I, Young M, Sobra M, Moreno P. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State-Brazil. *Pharmacologyonline.* 2006 May;3:589–93.
100. Miguel M, Garcia iacute a Bores A, Meraz S, Piedra E, Aacute vila M, Serrano R iacute o, et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Cordia globosa*. *African J Pharm Pharmacol.* 2016;10(11):179–84.
101. Longaray A, Moschen I, Artico L, Atti L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 2007;100(2):603–8.

102. Pednekar P, Vakil B, Sane R, Datar A. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Blumea Eriantha* DC Against Skin. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(4):296–9.
103. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.* 2003;95(4):853–60.
104. Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(10):1311–20.
105. Torres Chati J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a.gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen Lima- Perú. Universidad Nacional Mayor de San; 2014.





Anexo 1

Certificado de identificación del material vegetal



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**  
**HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)**



**CONSTANCIA N° 028-2014-HUSA**

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca del espécimen presentada por Lissete Sindy Lerrena Salas y Junior Patricio Yucra Hualla egresado de la Escuela Profesional y Académica de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la realización de su tesis "Análisis fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Luma chequen* mediante cromatografía de gases y evaluación del efecto antimicrobiano sobre cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

<b>Division</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Clase</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Subclase</b>	<b>Rosidae</b>
<b>Orden</b>	<b>Myrtales</b>
<b>Familia</b>	<b>Myrtaceae</b>
<b>Genero</b>	<b>Luma</b>
<b>Especie</b>	<b><i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray</b>

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

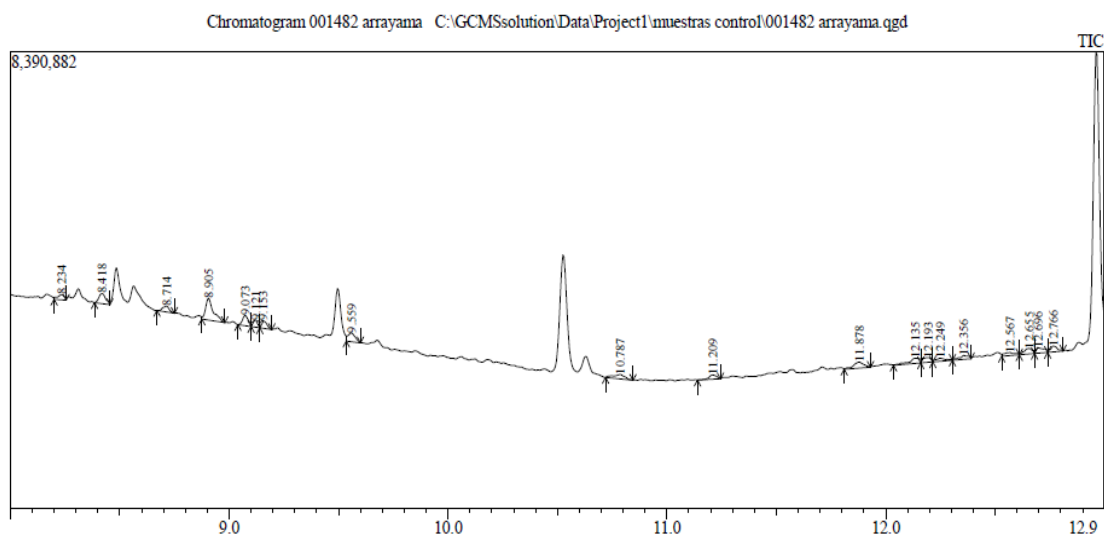
Arequipa 14 de setiembre del 2014

  
 Blgo. Leoncio Marino Herrera  
 DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense* (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado  
 Teléfono: (054) 237755 / 984248674  
 Apartado Postal: 0028  
 AREQUIPA - PERÚ

## Anexo 2

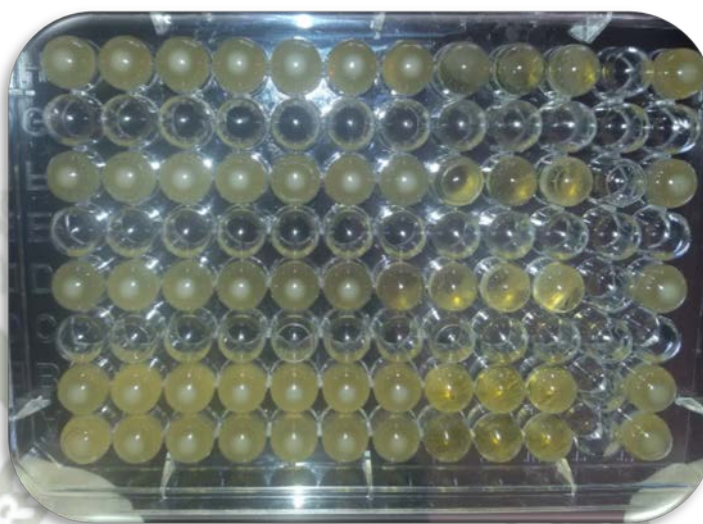
### Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray.



### Anexo 3

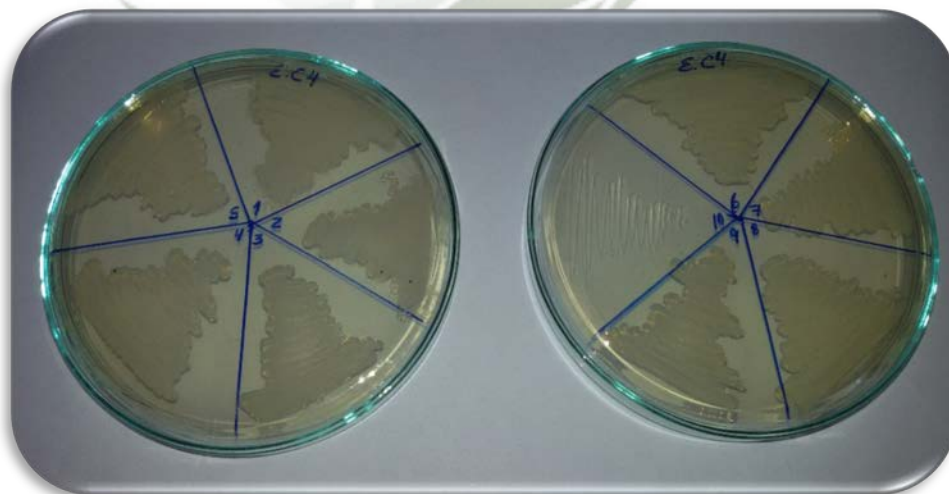
#### 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Ejemplo de la determinación de la CIM para *E. coli* por el método de microdilución



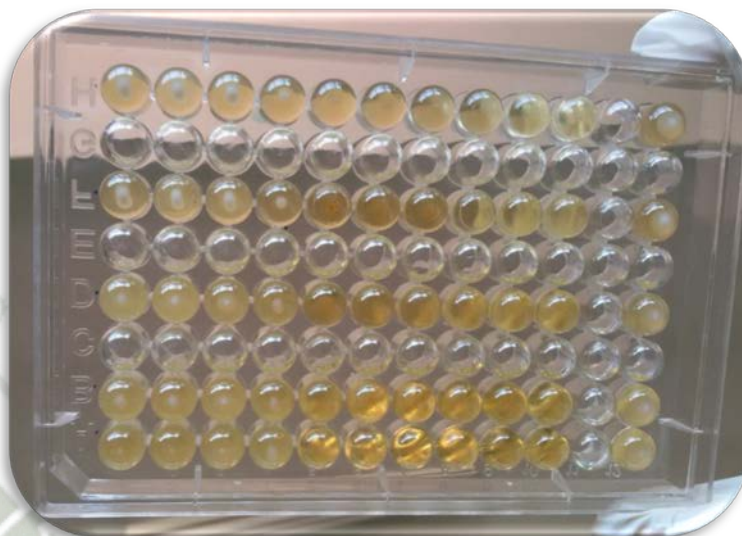
#### 2. Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Ejemplo de la determinación de la CBM para *E. coli* a partir del subcultivo de los pocillos que no presentaron crecimiento bacteriano en la prueba de CIM.



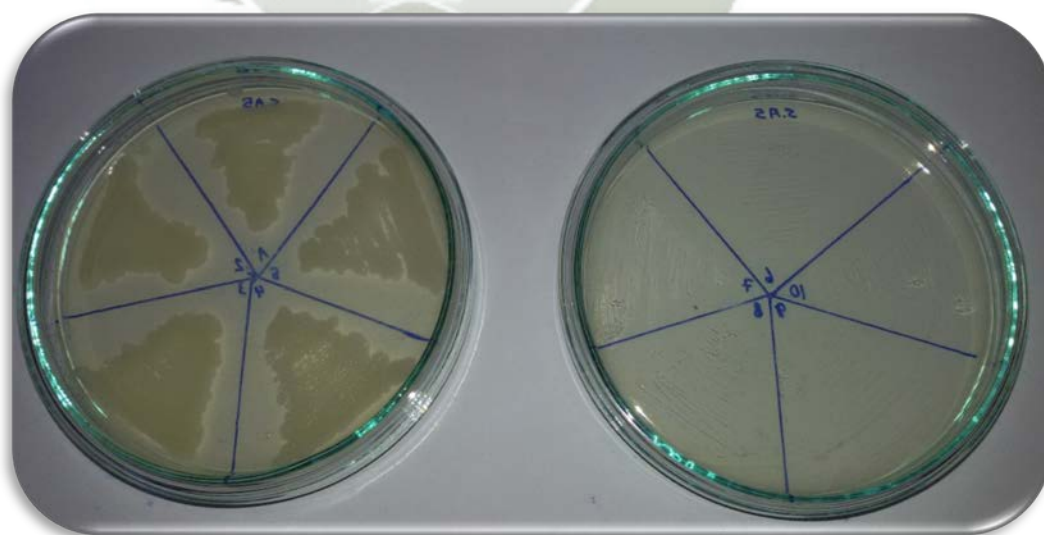
### 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Ejemplo de la determinación de la CIM para *S. aureus* por el método de microdilución



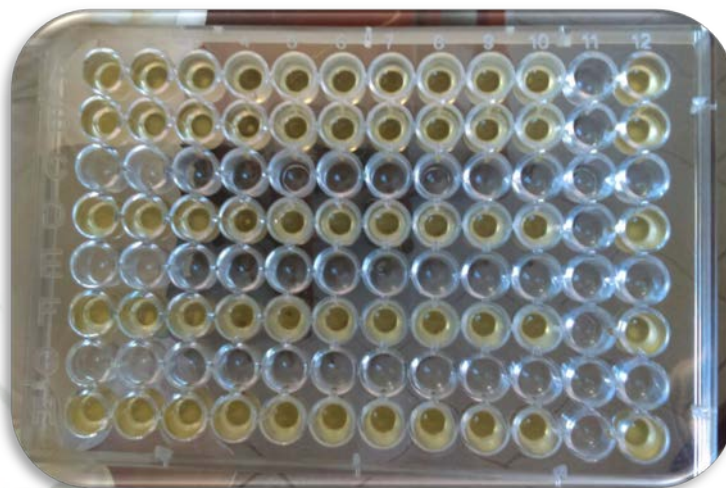
### 2. Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Ejemplo de la determinación de la CBM para *S. aureus* a partir del subcultivo de los pocillos que no presentaron crecimiento bacteriano en la prueba de CIM.



### 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Ejemplo de la determinación de la CIM para *C. albicans* por el método de microdilución



### 2. Concentración Fungicida Mínima (CFM)

Ejemplo de la determinación de la CFM para *C. albicans* a partir del subcultivo de los pocillos que no presentaron crecimiento bacteriano en la prueba de CIM.

