

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL
DE *Eugenia caryophyllata* (CLAVO DE OLOR) FRENTE A *C. albicans*, *E. coli*, *P.
aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes* AREQUIPA 2012**

TESIS

PRESENTADA POR:

**Bach. VIRGINIA MARISELA MAMANI NIÑA
Bach. JESUSA NELLY HUALLPA HOLGUÍN**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA:

Mgr. JULITZA LINDSEY PAREDES FUENTES

AREQUIPA- PERÚ

2014

AGRADECIMIENTO



A Dios

A nuestra asesora

A nuestros docentes

A nuestras familias

A nuestros amigos



DEDICATORIAS

A mis padres por su esfuerzo y sacrificio diario por que gracias a ellos y a Dios he sabido seguir adelante y superar los obstáculos de mi vida

Virginia Marisela

A mis padres por su amor, confianza, estímulo y apoyo durante mis estudios y a Dios por guiar siempre mi camino.

Jesusa Nelly

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	01
HIPÓTESIS.....	03
OBJETIVOS	04
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	05
1.1. <i>Eugenia caryophyllata</i> (Clavo de olor).....	05
1.1.1 Características de <i>Eugenia caryophyllata</i>	05
1.1.1.1. Descripción botánica.....	05
1.1.1.2. Distribución.....	06
1.1.1.3. Ubicación Taxonómica	06
1.1.1.4. Propiedades medicinales	07
1.1.2 Composición química del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	07
1.2. Aceites esenciales.....	08
1.2.1. Definición	08
1.2.2. Clasificación	09
1.2.3. Distribución de los aceites esenciales en la planta	10
1.2.4. Composición química de los aceites esenciales	10
1.2.5. Extracción y aislamiento	12
1.2.6. Análisis del aceite esencial	15

1.2.6.1. Cromatografía de gases	15
1.2.7. Empleo de los aceites esenciales	17
1.2.8. Ensayos de calidad de aceites esenciales.....	18
1.3. Enfermedades infecciosas	19
1.3.1. <i>Candida albicans</i>	21
1.3.1.1. Generalidades	21
1.3.1.2. Morfología e Identificación.....	21
1.3.1.3. Cultivo.....	22
1.3.1.4. Manifestaciones clínicas	22
1.3.1.5. Tratamiento	23
1.3.2. <i>Escherichia coli</i>	24
1.3.2.1. Generalidades.....	24
1.3.2.2. Morfología e identificación.....	24
1.3.2.3. Cultivo.....	25
1.3.2.4. Manifestaciones Clínicas	26
1.3.2.5. Tratamiento	27
1.3.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	27
1.3.3.1. Morfología e Identificación.....	28
1.3.3.2. Cultivo.....	29
1.3.3.3. Manifestaciones Clínicas	29
1.3.3.4. Tratamiento	30
1.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
1.3.4.1. Morfología e identificación.....	31
1.3.4.2. Cultivo.....	32
1.3.4.3. Manifestaciones Clínicas	32
1.3.4.4. Tratamiento	33
1.3.5. <i>Streptococcus pyogenes</i> o Streptococcus β hemolítico grupo A según la clasificación de Lancefield	34
1.3.5.1. Morfología e identificación.....	34
1.3.5.2. Cultivo.....	35
1.3.5.3. Manifestaciones clínicas	35
1.3.5.4. Tratamiento	36

1.4. Antibióticos de control.....	36
1.4.1. Antibiótico β - lactámico	36
1.4.1.1. Cefalosporinas.....	36
1.4.1.1.1. Origen	36
1.4.1.1.2. Farmacodinamia	37
1.4.2. Aminoglucósido	39
1.4.2.1. Amikacina	39
1.4.2.1.1. Origen	39
1.4.2.1.2. Farmacodinamia	40
1.4.3. Polieno.....	41
1.4.3.1. Anfotericina B	41
1.4.3.1.1. Origen	41
1.4.3.1.2. Farmacodinamia.....	41
CAPÍTULO II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1. Tipo de Investigación.....	43
2.2. Materiales y reactivos	43
2.2.1. Material biológico	43
2.2.1.1. Botones florales de <i>Eugenia caryophyllata</i> (Clavo de olor).....	43
2.2.1.2. Cepas bacteriológicas y fúngicas	43
2.2.2. Material de Estudio	44
2.2.2.1. Aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	44
2.2.3. Materiales de laboratorio.....	44
2.2.3.1. Materiales de vidrio.....	44
2.2.3.2. Equipos de laboratorio	44
2.2.3.3. Otros.....	45
2.2.3.4. Medios de cultivo.....	45
2.2.4. Discos de sensibilidad de comparación.....	45
2.3. Métodos.....	45
2.3.1. Métodos fitoquímicos.....	45
2.3.1.1. Obtención del material vegetal.....	45

2.3.1.2. Extracción del aceite esencial del clavo de olor.....	46
2.4. Determinación fisicoquímica del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	47
2.4.1. Determinación de la actividad in vitro sobre cepas	49
2.4.1.1. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	49
 CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
 3.1. Obtención del Aceite Esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	58
3.2. Componentes del Aceite Esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	58
3.3. Actividad del Aceite Esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i>	60
3.4. Concentración Inhibitoria Mínima.....	61
3.5. Concentración Bactericida y Fungicida Mínima	64
3.6. Inhibición de microorganismos según discos de sensibilidad	70
 CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Actividad del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) frente a, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> y <i>Candida albicans</i>	60
Tabla 2.-	Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) para <i>Escherichia coli</i>	61
Tabla 3.-	Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) para la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Tabla 4.-	Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) frente a <i>Cándida albicans</i>	62
Tabla 5.-	Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> sobre el microorganismo <i>Escherichia coli</i>	64
Tabla 6.-	Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> sobre el microorganismo <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Tabla 7.-	Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> sobre la levadura <i>Candida albicans</i>	65
Tabla 8.-	Concentración Bactericida y Fungicida Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> sobre los microorganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	66
Tabla 9.-	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i>	68
Tabla 10.-	Halos de inhibición por microorganismos indicadores según discos de sensibilidad.....	70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.-	Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) frente a la <i>Candida albicans</i>	63
Gráfico 2.-	Concentración Bactericida y Fungicida Mínima del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> sobre los microorganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	67
Gráfico 3.-	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i>	68
Gráfico 4.-	Promedio del diámetro de los halos de inhibición antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) por microorganismos	69
Gráfico 5.-	Halos de inhibición del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor), Ceftazidima 30 ug y Amikacina 30 ug para <i>Escherichia coli</i>	71
Gráfico 6.-	Halos de inhibición del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (clavo de olor) Ceftazidima 30 ug, Amikacina 30 ug para la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	71
Gráfico 7.-	Tamaño halos de inhibición (mm) del aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> 4.2 ug y Amfotericina B 10 ug para <i>Candida albicans</i>	72

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Los botones florales de *Eugenia caryophyllata* fueron obtenidos en una especería de la ciudad procedente de Madagascar.

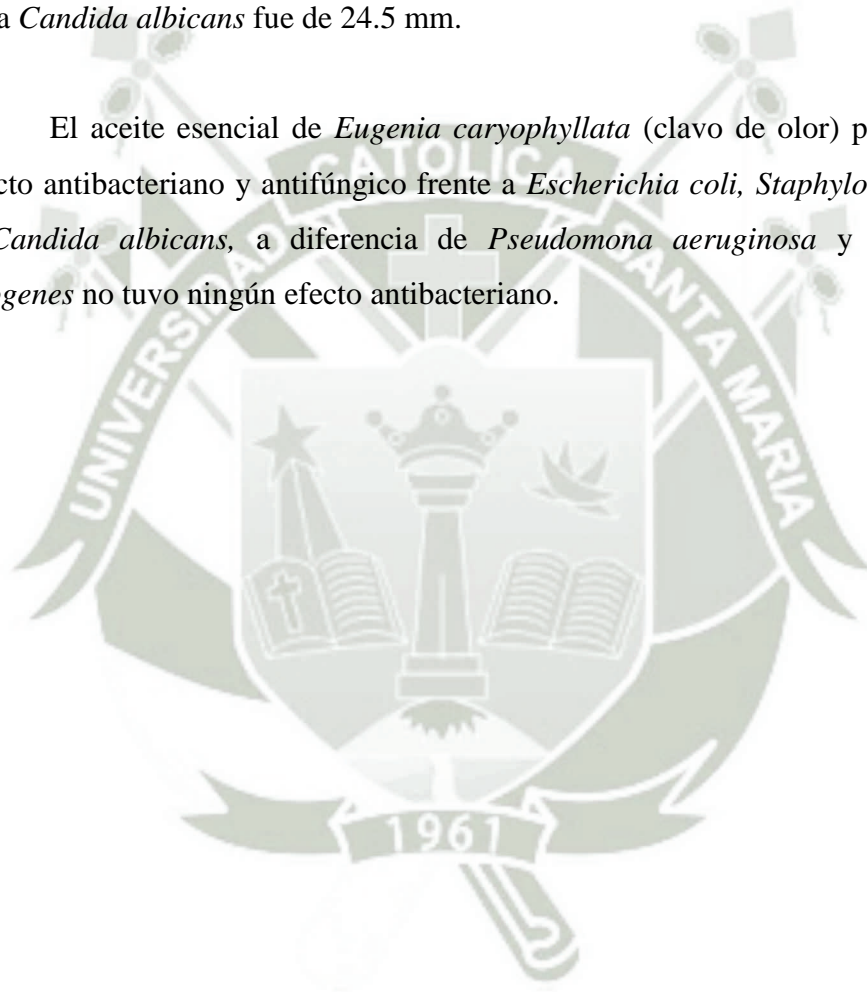
El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua (Hidrodestilación), con un rendimiento promedio del 4%. El control de calidad para el aceite esencial, se realizó en el laboratorio de control de calidad de la Universidad Católica de Santa María, en las cuales se determinaron las características organolépticas y fisicoquímicas obteniendo la densidad del aceite esencial de 1,0463 g/mL y el índice de refracción 1,5285. Se determinó los siguientes componentes: eugenol 92.53 %; cariofileno 1,79 % y fenol 5,68 %; estos compuestos validan la actividad antifúngica y antibacteriana del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*.

La determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* se determinó por el método de dilución en caldo para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM). También se usaron los métodos de excavación placa cultivo y Kirby Bauer para determinar la sensibilidad antifúngica y antibacteriana.

Según los estudios realizados por el método de dilución podemos decir que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de 5 ug/mL. La Concentración Bactericida Mínima (CBM) para *Staphylococcus aureus* 20 ug/mL y 5ug/mL para *Escherichia coli*; pero en las bacterias de *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* no tuvo ningún efecto. La Concentración Fungicida Mínima (CFM) para *Candida albicans* fue de 10 ug/mL.

En la determinación de la sensibilidad de aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* 40 ug fue: para *Escherichia coli* de 20 mm; *Candida albicans* de 13.5 mm y *Staphylococcus aureus* 11 mm, estos resultados fueron comparados con los discos de sensibilidad con los diferentes tipos de antibióticos, el cual nos dio como resultados: con Cefotaxima: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron de 18mm y 19 mm respectivamente, con Amikacina: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron de 20mm y 22 mm respectivamente, y con Anfotericina B para *Candida albicans* fue de 24.5 mm.

El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) presenta mayor efecto antibacteriano y antifúngico frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, a diferencia de *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* no tuvo ningún efecto antibacteriano.



SUMMARY

The objective of this study was determine the antifungal and antibacterial activity in vitro of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* (clove of odor) against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*. Flower buds of *Eugenia caryophyllata* were obtained in a city from Madagascar.

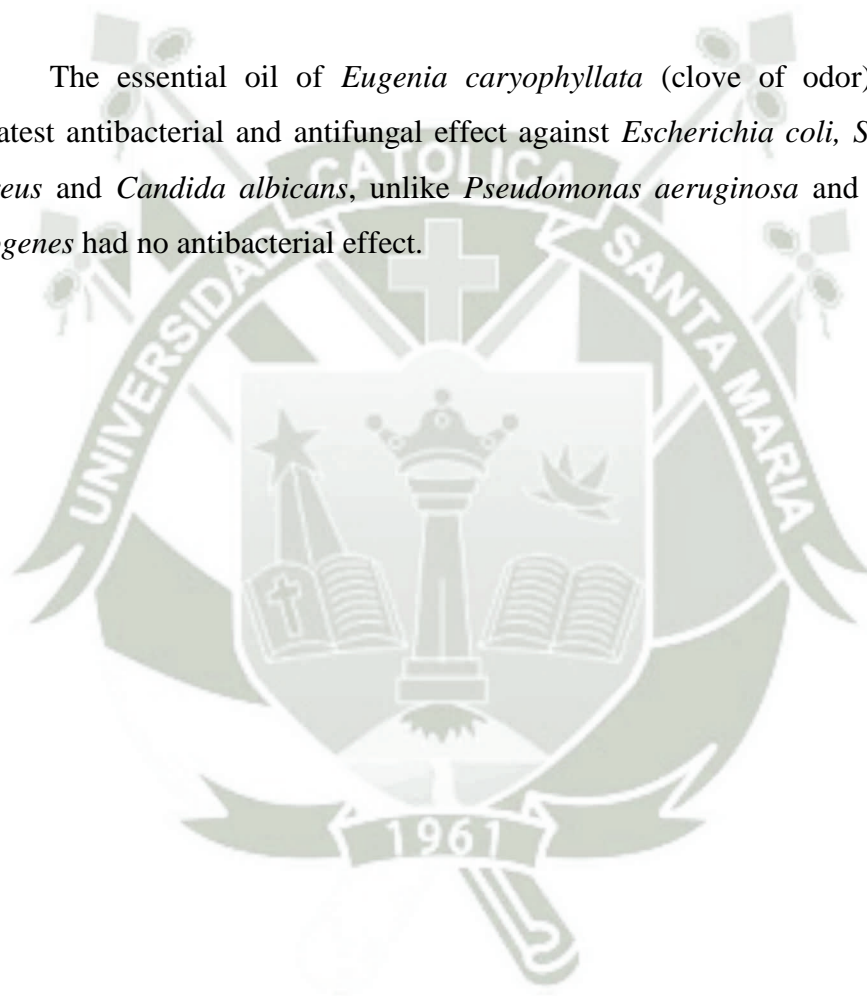
The essential oil is obtained by distillation with dragging of water vapour (hydrodistillation), with an average yield of 4% v/p. The quality control for the essential oil, was carried out in the laboratory of quality control of the Catholic University of Santa Maria, in which determined characteristics, organoleptic and physicochemical obtaining density 1,0463 g/mL essential oil and the index of refraction 1,5285. It was determined the following components: eugenol 92.53 %; caryophyllene 1.79 % and 5.68 % phenol; these compounds validated antifungal and antibacterial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata*.

The determination of the antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* se determined by the broth dilution method for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Also used the methods of excavation plate cultivation and Kirby Bauer to determine the sensitivity to antifungal and antibacterial.

According to studies conducted by the dilution method we can say that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* 5 ug/mL. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for *Staphylococcus aureus* 20 ug/mL and 5 ug/mL for *Escherichia coli*; but in bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* had no effect. The fungicide minimum concentration (CFM) for *Candida albicans* was 5 ug/mL.

In the determination of the sensitivity of essential oil of *Eugenia caryophyllata* 40 ug was: for *Escherichia coli* of 20 mm; *Candida albicans* of 13.5 mm and *Staphylococcus aureus* 11 mm, these results were compared with discs of sensitivity with different types of antibiotics, which gave us as results: with Ceftazidime: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 18 mm 19 mm respectively, with Amikacin: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were 20 mm and 22 mm respectively and with Amphotericin B for *Candida albicans* was 24.5 mm.

The essential oil of *Eugenia caryophyllata* (clove of odor) presents the greatest antibacterial and antifungal effect against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, unlike *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* had no antibacterial effect.



INTRODUCCIÓN

Debido a la aparición de diferentes cepas resistente frente a diferentes antibacterianos y antifúngicos convencionales, sus efectos indeseados y el alto costo del tratamiento justifican la investigación de nuevas estrategias. El uso de plantas en los tratamientos de diferentes enfermedades está siendo demostrado a lo largo de la historia humana.

Dentro de las diferentes clases de compuestos aislados de plantas con propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales son uno de los grupos de compuestos naturales más prometedores, reconocidos por presentar una actividad contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos y antifúngicos .(47)

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) hizo un llamado para que los países incrementen sus esfuerzos para controlar la resistencia antimicrobiana; promoviendo el uso racional de los medicamentos; desarrollando sistemas de comunicación para recabar y compartir datos sobre resistencia a patógenos específicos promoviendo la investigación y desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. (44)

Los medicamentos que se utilizan actualmente derivan de plantas medicinales. Numerosos principios activos fueron aislados a partir de extractos de plantas medicinales, presentando la ventaja de ser puros y homogéneos en cuanto a

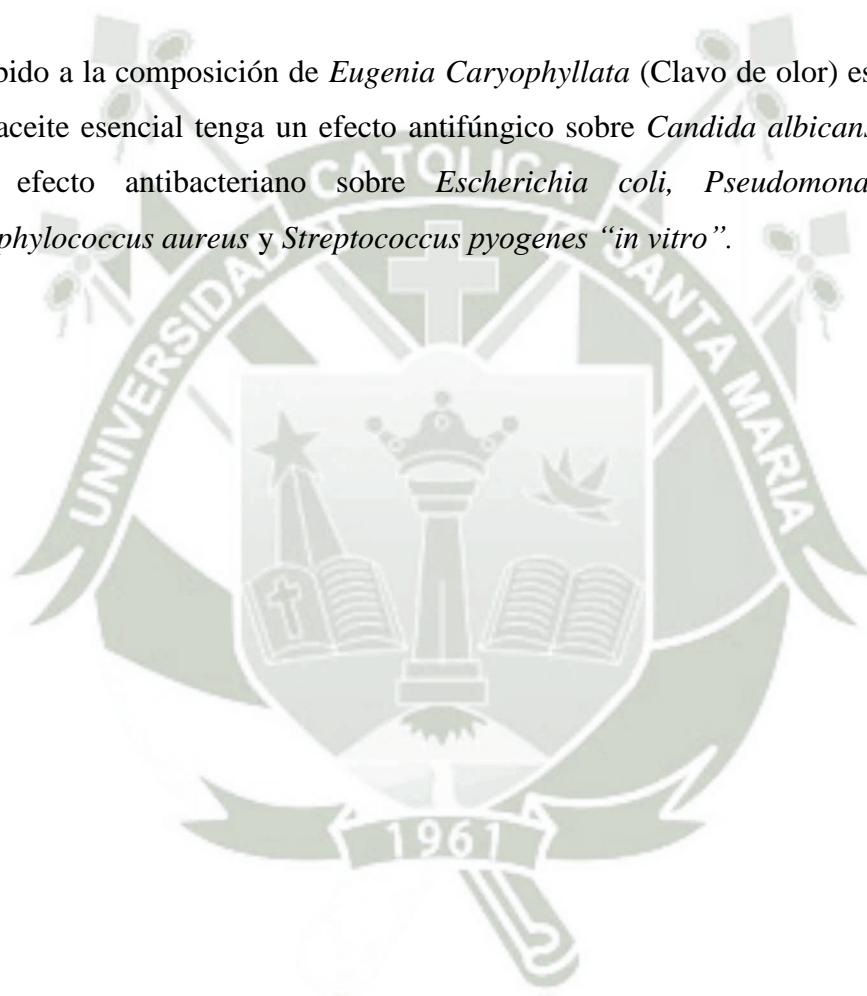
su composición química habiéndose eliminado los compuestos con actividad o no que los acompañaban, facilitándose el control de calidad.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles de intenso olor que se extraen de plantas aromáticas, estos aceites son obtenidos generalmente por destilación con arrastre de vapor de agua o hidrodestilación.

Dichas propiedades han motivado a conocer el efecto antifúngico y antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* frente a bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y también frente a levaduras Gram positiva como *Candida albicans*; debido a la cantidad de sustancias que encontramos en esta planta "*Eugenia caryophyllata*" conocida popularmente como clavo de olor, el cual es un árbol tropical originario del archipiélago de las Molucas, esta planta posee diversas propiedades terapéuticas como antibacteriano, antifúngico, estimulante estomacal, expectorante y sedante (1). Por tales atributos es que nos hemos propuesto la realización del presente estudio de investigación para revalidar el uso de nuestro recurso natural y verlo como una alternativa de solución para el tratamiento y cura de diversas enfermedades.

HIPÓTESIS

Debido a la composición de *Eugenia Caryophyllata* (Clavo de olor) es probable que su aceite esencial tenga un efecto antifúngico sobre *Candida albicans* y además de un efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* “in vitro”.



OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Eugenia Caryophyllata* (Clavo de olor) frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial extraído de los botones florales de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor).
- 2) Determinar los principales componentes, características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor).
- 3) Evaluar *in vitro* la actividad del aceite esencial de *Eugenia Caryophyllata* (Clavo de olor) sobre *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* y determinar la Concentración Inhibitoria Mínima, Concentración Bactericida Mínima y Concentración Fungicida Mínima.
- 4) Comparar el efecto antifúngico y antibacteriano del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) con discos de sensibilidad de antibióticos y antifúngicos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. *Eugenia caryophyllata* (Clavo de olor)

1.1.1. Características de *Eugenia caryophyllata*

1.1.1.1. Descripción botánica

El clavero pertenece a la clase de las dicotiledóneas. Es un árbol tropical, de 10 a 20 m. de altura, muy aromático. Las hojas son opuestas, decusadas y perennes e inflorescencias racimosas. Las yemas florales inicialmente presentan un color pálido que gradualmente cambia al verde, después de lo cual comienzan a adquirir un color rojizo brillante, indicador de que están listos para ser recolectados (1)

Usualmente se cosechan cuando alcanzan una longitud de 1,5 a 2 cm. y contienen una o dos semillas (2)



Figura N° 1: *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor)

1.1.1.2. Distribución

El clavero se considera originario del Archipiélago de las Molucas (Isla de las especies) (1), ahora se cultiva en África, especialmente en Madagascar y Tanzania (2)

1.1.1.3. Ubicación Taxonómica

Eugenia caryophyllata (clavo de olor) presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Rosidae
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Myrtaceae
Subfamilia	:	Myrtoideae

Tribu : Syzygieae
Género : Syzygium
Especie : S. aromaticum
Nombre binomial: Eugenia caryophyllata

1.1.1.4. Propiedades medicinales

El peculiar aroma del clavo de olor se debe a que posee una sustancia llamada eugenol que se puede utilizar en perfumes, en la cocina, para crear incienso en las culturas china y japonesa, en otras culturas como la indonesia se usa en un popular cigarrillo llamado kretek.(45)

Para el ser humano, el clavo de olor es una especie muy conocida por sus propiedades estimulantes, estomacales, expectorantes y sedantes. El aceite esencial de los clavos y de las raíces tiene una potente acción estomacal, carminativa y antiespasmódica sobre el conjunto del aparato digestivo, igualmente es tónico, ligeramente excitante y afrodisíaco. Además su gran contenido de eugenol le proporciona virtudes antisépticas (odontología), bactericidas, cicatrizante y ligeramente anestésica. (1)

El Clavo de olor también puede ser usado como remedio casero para el mal aliento, se puede masticar un clavo de olor para mejorar el aliento ya que su aroma es muy fuerte, solo hay que tener en cuenta que el sabor también es intenso. También puede ser útil para alejar a algunos insectos como los mosquitos y las moscas, ya sea en las personas o en plantas decorativas acuáticas. (45)

1.1.2. Composición química del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*

El aceite esencial extraído de las hojas y de los tallos tiene un sabor más a madera que el de los botones florales. Los compuestos más abundantes son eugenol (70 a 85%), β – cariofileno (4 a 15%), acetato de eugenilo (5 a

10%) y α – humuleno. Los frutos encierran de un 2% a un 3% de esencia que contiene alrededor de un 50% de eugenol.

Los botones florales están provistos de un 15 a 20% de esencia compuesta de un 75 a 98% de eugenol (1) y acetato de eugenilo (10 a 15%). El eugenol es inmisible y más denso que el agua. (3)

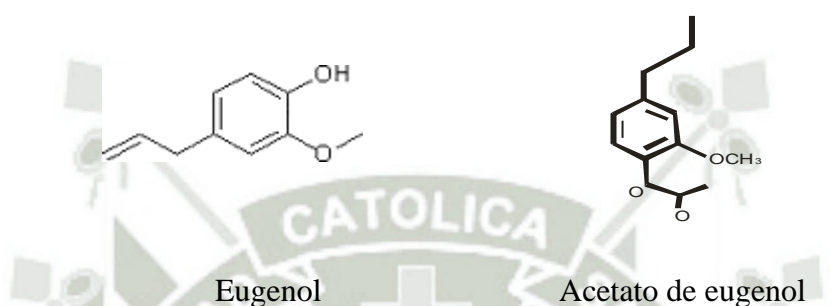


Figura N° 2: Principales componentes químicos del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor).

1.2. Aceites esenciales

1.2.1. Definición

Los aceites esenciales también llamados compuestos volátiles, son líquidos de consistencia aceitosa, aromáticos, obtenidos de los materiales vegetales (flores, los brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces). (4) Su aroma atrae a los animales que al oler las flores se impregnan y hacen posible la polinización. (5)

Oficialmente, se denominan aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos (3). De los millones de plantas existentes en nuestro planeta, se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos. (6)

Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (4), son

diuréticos, antiespasmódicos, tonificantes del estómago, intestino, hígado y bilis. (5)

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehidos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. (7,8)

1.2.2. Clasificación

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

De acuerdo a su **consistencia** los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

De acuerdo a su **origen** los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia. Los sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes de los cuales la mayoría son producidos por procesos de síntesis química.

Desde el punto de vista **químico** y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto, los aceites ricos en monoterpenos se denominan aceites monoterpenoides; los ricos en fenilpropanoides son aceites esenciales fenilpropanoides (clavo, canela, anís, etc.). (8)

1.2.3. Distribución de los aceites esenciales en la planta

A veces los aceites esenciales están distribuidos en distintas partes del mismo vegetal; en las raíces, tallo, hojas, flores y frutos. Es importante señalar que cuando un vegetal tiene aceite esencial en diferentes partes del mismo, difieren en su constitución, expresándose en el olor y composición química. (9)

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las compuestas, labiadas, lauráceas, mirtáceas, pináceas, rosáceas, rutáceas, umbelíferas, etc. Se las puede encontrar en diferentes partes de las plantas; en la hoja (ajenjo, albahaca, buchú, cedrón, eucalipto, hierbabuena, etc.), en las raíces (azafrán, cálamo, jengibre, sándalo, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.), en los frutos (cilantro, laurel, perejil, etc.). (10,11)

1.2.4. Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales están constituidos por muchas clases de compuestos químicos, algunos por un solo componente de un alto porcentaje y otros por mezclas complejas, dividiéndose en dos grupos:

a. Serie terpénica

Los aceites esenciales que se encuentran en la naturaleza son mezcla de varios hidrocarburos monoterpenos de fórmula general $C_{10}H_{16}$, y de hidrocarburos $C_{15}H_{24}$ que sirven ambos de portadores primarios para las clases más importantes de compuestos oxigenados, aunque presentes en cantidades mucho menores que suelen ser los productores del característico olor del aceite. Todos los mono y sesquiterpenos son volátiles ya que su peso molecular no es muy elevado y pueden destilarse con vapor de agua. Los que

poseen oxígeno son terpenoides funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter, ester o peróxido. (3, 12)

b. No terpenoides

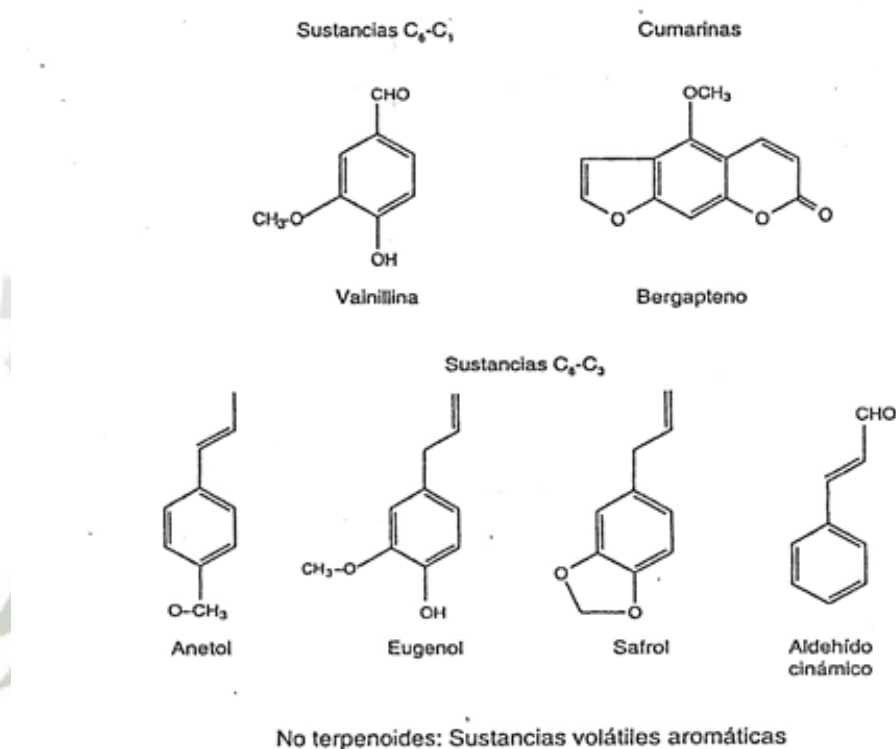


Figura N° 3: Principales estructuras de algunos componentes más usuales de los aceites esenciales.

- b.1. Sustancias volátiles alifáticos: suelen ser hidrocarburos (C, H) o sustancias con función oxigenada (C, H y O)
- b.2. Sustancias volátiles aromáticas: con diferentes estructuras.
 - Sustancias con estructura $C_6 - C_1$
 - Sustancias con estructura $C_6 - C_3$ (derivados del fenilpropano)
 - Derivados cumarínicos

Las sustancias $C_6 - C_1$ y $C_6 - C_3$ son sustancias volátiles de bajo peso molecular generalmente oxigenados, con funciones alcohol, fenol, ácido y éter.

- b.3. Sustancias nitrogenadas: poco frecuente, hay aminas alifáticas volátiles.
- b.4. Sustancias con azufre: aún menos frecuentes. (3)

1.2.5. Extracción y aislamiento

Los aceites esenciales se obtienen por los siguientes métodos: (13, 14 6)

- Destilación
- Extracción por prensado / raspado
- Enfleurage (enflorado) en frío
- Extracción con disolventes volátiles
- Extracción con fluidos supercríticos

a. Extracción por prensado / raspado

El material vegetal es exprimido para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos. (8)

b. Extracción con disolventes volátiles

Se utiliza para drogas de peso molecular más elevado que son, por lo tanto, menos volátiles. Se emplean disolventes orgánicos apolares de bajo punto de ebullición y de bajo coste como el diclorometano, éter de petróleo o el hexano, precisa una purificación del extracto obtenido. (3, 8)

c. Enfleurage (enflorado)

Se aplica para la extracción de esencias, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. (8,3)

d. Extracción con fluidos supercríticos

El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido supercrítico (bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas, arrastradas y el fluido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente y finalmente se obtiene una esencia pura. (8)

e. Destilación

- **Arrastre con vapor de agua**

Para la realización de la destilación por arrastre con vapor se usan alambiques de características variables y adaptadas a cada tipo de caso específico. Aplicable tanto en flores, raíces, hojas o plantas enteras, la destilación es el método más antiguo y el más usado para obtener aceites esenciales naturales.

El calor y el vapor húmedo hinchan las paredes celulares y facilitan el paso de los aceites esenciales al exterior por ósmosis. (15, 16)

La destilación por arrastre con vapor puede realizarse de tres formas distintas según las características de la droga:

- **Método de inyección de vapor de agua:** En este método, la droga y el agua no están inicialmente en contacto. La droga se coloca sobre unas rejillas a través de las cuales se hace pasar

una corriente de vapor de agua que arrastra los aceites esenciales. A continuación, se condensa el vapor de agua y se recoge en un recipiente. Posteriormente, se puede separar los aceites esenciales del agua ya que presentan diferente densidad y forman dos fases. (3)

- **Destilación mixta:** Consiste en poner el agua en el mismo recipiente de la droga, pero sin que entren en contacto, ya que la droga está sobre una rejilla y el agua está en el fondo del recipiente. Se hace hervir el agua y el vapor atraviesa la rejilla con la droga arrastrando consigo los aceites esenciales. Después se condensa, se recoge y se separan los aceites esenciales del agua.
- **Hidrodestilación:** Se denomina hidrodestilación a la destilación de las flores u otras partes de la planta por medio del vapor de agua.

El vapor de agua “arrastra” el aceite esencial que contienen las flores. En realidad, los aceites esenciales tienen un punto de ebullición superior al del agua; pero la mezcla de aceite esencial más agua presenta un punto de ebullición inferior y por eso puede ser destilada. Al pasar por el condensador, los vapores se enfrían, condensan y se transforman en un líquido formado por dos fases inmiscibles: fase orgánica (aceite esencial) y fase acuosa, que para algunos aceites esenciales contiene cierta cantidad de esencia.

La fase orgánica, formada por el aceite esencial, se separa fácilmente de la acuosa al tener distinta densidad y ser inmiscibles. Normalmente la fase orgánica formada por el aceite esencial es la fase menos densa y flota sobre la fase acuosa, aunque hay excepciones.

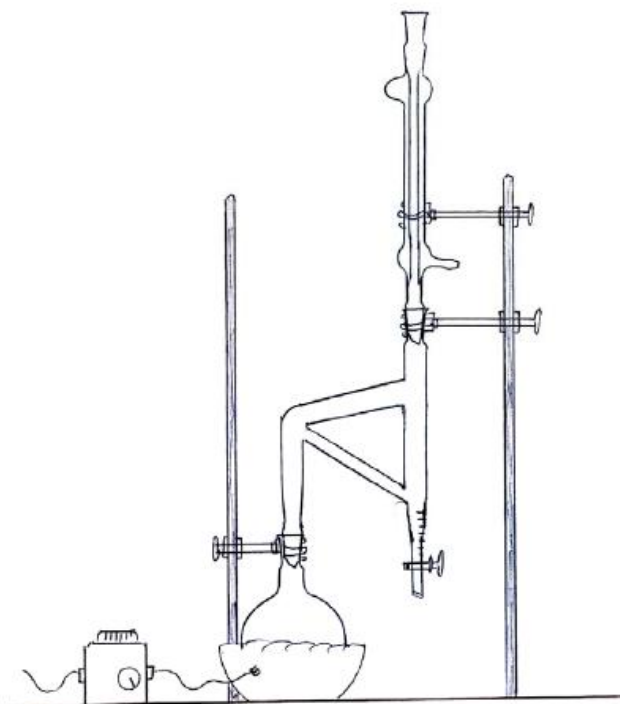


Figura N° 4: Hidroddestilación con trampa de Clevenger

1.2.6. Análisis del aceite esencial

1.2.6.1. Cromatografía de gases

En cromatografía de gases (GC), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas - sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC).

La cromatografía gas - líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC). (39)

La cromatografía gas - sólido se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como

consecuencia de la adsorción física. La cromatografía gas - sólido ha tenido una aplicación limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y a la obtención de picos de elución con colas (una consecuencia del carácter no lineal del proceso de adsorción), de modo que esta técnica no ha encontrado una gran aplicación excepto para la separación de ciertas especies gaseosas de bajo peso molecular. La cromatografía gas - líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases, son: (40)

- Fuente de gas
- Sistema de inyección
- Horno y columna cromatográfica
- Sistema de detección
- Sistema de registro

a. Aplicaciones de la cromatografía gas-líquido

Para evaluar la importancia de la GLC, es necesario distinguir entre los dos papeles que desempeña la técnica. Es el primero como herramienta para realizar separaciones; en este sentido, resulta inmejorable cuando se aplica a muestras orgánicas complejas y a sistemas bioquímicos. El segundo, una función claramente distinta, es el de proporcionar un medio para llevar a cabo un análisis. En este caso se emplean los tiempos o volúmenes de retención para la identificación cualitativa, mientras que las alturas de los picos o sus áreas dan información cuantitativa. Con fines cualitativos, la GLC es una técnica mucho más limitada que otros métodos.

En consecuencia, una tendencia importante en este campo ha consistido en la combinación de las notables cualidades para el

fraccionamiento que tiene la GLC con las mejores propiedades para la identificación que tienen algunos instrumentos como los espectrómetros de masas e infrarrojo.

b. Cromatografía gas-sólido

La cromatografía gas-sólido se basa en la adsorción de sustancias gaseosas sobre superficies sólidas. Los coeficientes de distribución son generalmente mucho mayores que en el caso de la cromatografía gas-líquido. En consecuencia, la cromatografía gas-sólido es útil para la separación de especies que no se retienen en columnas de gas-líquido, tales como los componentes del aire, sulfuro de hidrógeno, disulfuro de carbono, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, dióxido de carbono y los gases nobles. (41)

La cromatografía gas-sólido se lleva a cabo tanto en columnas de relleno como en capilares. En estas últimas, se fija en las paredes del capilar una delgada capa de adsorbente; estas columnas a veces se denominan columnas tubulares abiertas de capa porosa, o columnas PLOT. Se encuentran dos tipos de adsorbentes: los tamices moleculares y los polímeros porosos. (39)

1.2.7. Empleo de los aceites esenciales

Para utilizar los aceites esenciales en cualquiera de sus múltiples aplicaciones es necesario tener presente que estamos manipulando sustancias químicas con propiedades y características concretas. Toda sustancia independientemente de su carácter natural o artificial, puede ser tóxica dependiendo de las características químicas de la sustancia en cuestión y de la dosis de que se trate. (6)

a. En farmacia:

La aromaterapia es una de las nuevas técnicas utilizadas para la cura de algunas enfermedades, esta técnica se basa principalmente en el uso de aceites esenciales asignándole un interés medicamentoso como por ejemplo para activar la circulación y aliviar la osteoartritis y los dolores musculares dar friegas en las zonas afectadas, y en otros casos también se utiliza como saborizante y deodorizante de fármacos. (17)

b. En alimentación:

Los aceites esenciales han sido utilizados para dar sabor y aroma al té, vinos y bebidas alcohólicas. (17)

c. En perfumería:

Son los ingredientes básicos en la industria de perfumes y se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares. (17)

1.2.8. Ensayos de calidad de aceites esenciales

Para controlar la calidad de los aceites esenciales se clasifican en seis tipos, que van desde las características organolépticas hasta las características espectroscópicas, pasando por la determinación de constantes físicas e índices químicos y el estudio del perfil cromatográfico, que incluirá la determinación cuantitativa de los principales componentes. (3,18)

Cuadro N°1: Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales (18)

Descripción	Parámetros
1. Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia
2. Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Miscibilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación.
3. Índices Químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de éster • Índice de aceto • Índice de fenoles
4. Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico por CG • Cuantificación de los principales componentes
5. Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta – visible • Infrarrojo
6. Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Pesticidas • Metales pesados

1.3. Enfermedades infecciosas

La enfermedad infecciosa es un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano y la respuesta inmune del mismo, fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente.

Las bacterias, son células con vida independiente y con capacidad de reproducirse, que se caracterizan por presentar en su estructura los dos ácidos nucleicos. Poseen enzimas y proteínas complejas, estructuras especializadas, así como una membrana celular que los separa del mundo circundante. Provocan cuando infectan al hombre lesiones localizadas o generalizadas de tipo inflamatorio acompañadas de destrucción parenquimatosa.

Los hongos son seres unicelulares, levaduras o pluricelulares, cuyos tejidos se agrupan en filamentos, formados por conjuntos de hifas llamados micelos. Tienen paredes celulares rígidas y absorben los nutrientes del hospedador, transmiten su material genético en reproducción sexual y pueden dividirse en compartimientos especiales.

Tienen gran capacidad de adaptarse a los cambios, como saprófitos colonizan al hombre y actúan como patógenos oportunistas. En los inmuno competentes las lesiones se autolimitan. El uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y corticoides los favorece. (19)

La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando al nivel mundial después de la aparición de los antibióticos. (20)

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por que presentan resistencia a múltiples antibióticos. También en los últimos años se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos, junto a la aparición de algunas enfermedades ligadas a infecciones bacterianas, ha puesto de relieve el potencial de extractos de vegetales y en especial de algunos de sus aceites esenciales como agentes antibióticos. (21)

1.3.1. *Candida albicans*

1.3.1.1. Generalidades

Son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y del aparato gastrointestinal. Las especies de candida colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. La candidiasis es la infección sistémica más común, donde los agentes más comunes son: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*. (22, 28).

1.3.1.2. Morfología e Identificación

Es el principal miembro patógeno del género cándida, es una levadura Gram positiva alargada que forma hifas (pseudohifas). Son organismos aerobios, levaduriformes, capaces de desarrollar pseudofilamentos y producir clamidosporas (tipo de spora asexual). Las pseudohifas son formadas con brotes que se elongan y continúan conectadas, siendo éstas más anchas que las hifas verdaderas, teniendo constricciones en los sitios de unión. Su diámetro varía entre 3 – 6 μ de forma oval y paredes delgadas. (23 – 24)

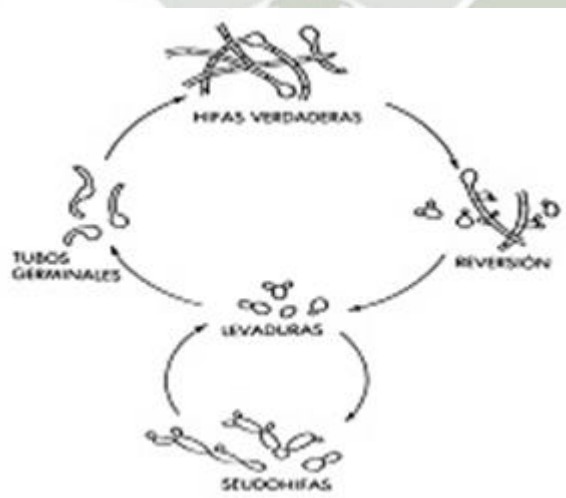


Figura N° 5: Morfogénesis de *Cándida albicans* (25)

Las hifas tan solo se producen en el momento de la invasión de los tejidos, un estímulo indiscutible es el ser humano ya que en 90 minutos a 37°C, ésta comienza a formar hifas; ésta reacción se manifiesta por la aparición de un tubo germinal, un apéndice alongado que crece hacia fuera y que tiene aproximadamente la mitad del ancho y el doble de largo de la célula de la levadura. (25) (Figura N° 5)

La *Cándida albicans* fermenta glucosa y maltosa, produciendo tanto ácido como gas y no degrada la lactosa. Estas fermentaciones de carbohidratos junto con sus características morfológicas coloniales diferencian a *Cándida albicans* de otras especies de cándida. (22)

1.3.1.3. Cultivo

Todas las muestras se cultivan en medio para hongos (Agar Sabouraud) a temperatura ambiente o a 37°C. Se desarrollan colonias blandas, color cremoso. El desarrollo superficial consiste de células ovales en gemación. El desarrollo sumergido consiste en pseudomicelos. Este está compuesto de pseudohifas que forman blastoconidias en los nódulos y, algunas veces, clamiconidias en sus terminales. (22)

El medio Sabouraud o agar peptona – glucosa, es el más ampliamente utilizado en la micología médica para el aislamiento y conservación de los dermatofitos que germina produciendo colonias. Otro tipo de cultivo es el de harina de maíz con tween – 80 y en el agua de papas favorecen el desarrollo. (26).

La mayor parte de los hongos crecen rápidamente pero las formas patógenas suelen hacerlo de una forma relativamente lenta. Pueden ser necesarias hasta semanas de incubación. (27)

1.3.1.4. Manifestaciones clínicas

Las especies de *Cándida* pueden producir gran variedad de formas clínicas que pueden agruparse en dos grupos: formas infecciosas o alérgicas.

Las primeras son mucho más frecuentes y pueden localizarse a nivel superficial en mucosas y piel, o bien en tejidos u órganos profundos. (29)

Cuadro N° 2: Manifestaciones clínicas de Candidiasis (30)

Forma clínica	Órgano Afectado	Clínica	Características
Candidiasis Superficial	Cavidad bucal	Placas blancas (muguet)	Afecta recién nacidos, ancianos e inmunodeprimidos.
	Vagina	Vulvovaginitis	Mujeres en edad fértil, más frecuentes en diabéticas y uso de antibióticos.
	Esófago	Esofagitis	Inmunodeprimidos, principalmente SIDA.
	Intestino delgado	Enteritis	Inmunodeprimidos, principalmente SIDA, uso de antibióticos.
	Piel y uñas	Queilitis, candidiasis inguinal, intertrigo, candidiasis del pañal.	Frecuencia en lactantes, favorecida por uso de antibióticos.
Candidiasis profunda	Pulmón	Neumonía	Inmunodeprimidos
	Riñón	Pielonefritis	Generalmente asociado a uso de sonda vesical
	Huesos – Articulaciones	Osteoartritis	Post – trauma o procedimiento quirúrgico
	Diseminada	Generalizada, predomina corazón (endocarditis) y riñones	A partir de absorción desde intestino, o por uso de catéteres vasculares.

1.3.1.5. Tratamiento

Se dispone de un amplio abanico de opciones terapéuticas frente a la candidiasis. Las infecciones mucosas y cutáneas se tratan por medio de diversas cremas tópicas, lociones, pomadas que contienen distintos fármacos antifúngicos del grupo de los azoles. El tratamiento tópico con agentes antifúngicos como la nistatina o el más reciente terconazol, suelen ser efectivos. (32)

El tratamiento sistémico por vía oral se basa en la administración de fluconazol o itraconazol, en pacientes resistentes a fluconazol necesitan un tratamiento con anfotericina B o caspofungina. (31) La anfotericina B por vía intravenosa es el tratamiento eficaz aceptado de modo amplio para la mayoría de candidiasis profunda. En vulvovaginitis por *Candida*, puede requerirse terapéutica de sostén con Ketoconazol. (28)

1.3.2. *Escherichia coli*

1.3.2.1. Generalidades

Miembro de la familia enterobacteriaceae, del género *Escherichia* que está compuesto de 5 especies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. vulneris*, *E. hertmannii*, *E. fergusonii*, siendo *Escherichia coli* de mayor importancia desde el punto de vista clínico. Es parte de la flora intestinal normal y producen de manera accidental, infección intestinal y extraintestinal. (28,30).

Algunas cepas de *Escherichia coli* son las responsables de las diarreas infantiles, una infección sumamente fatal de los recién nacidos. (33)

1.3.2.2. Morfología e identificación

Son bacilos Gram negativos que poseen un tamaño de alrededor de 0.3 a 3 μm , aerobios y anaerobios facultativos, poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos. (29) Son móviles, y su movilidad depende siempre de la producción de flagelos peritricos. Muchas cepas producen pelos o fimbrias comunes. (34)

Las enterobacterias contienen la típica pared celular estratiforme rica en lípidos de las bacterias Gram negativas. La capa externa contiene el lipopolisacárido responsable de muchas de las propiedades tóxicas y biológicas de éstos microorganismos. La mayor parte son lactosa (+), oxidasa (-), Indol (+), lo mismo que gas a partir de glucosa y que presentan una respuesta característica al grupo de prueba: Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato Simons (IMVIC + + - -). (28, 35)

De las especies de *Escherichia coli* productoras de diarrea, es posible identificar *Escherichia coli* enteropatógena y *Escherichia coli* enterohemorrágica mediante reacciones de aglutinación. Para la identificación de ésta última, es necesario sembrar en placa de agar MacConkey las muestras clínicas de posición, para realizar posteriormente la aglutinación específica. Las otras especies sólo se identifican en laboratorios de referencia. (30)



Figura N° 6: Bacteria *Escherichia coli* (Gram negativa) vistas al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram a 100X.

1.3.2.3. Cultivo

Son fáciles de cultivar, ya sea directamente de heces, orina o sangre o por hisopos de heces en medio Stuart, además de agar sangre y agar nutritivo, las muestras que pueden contenerlas se llevan a placas de medios selectivos y diferenciales.

Escherichia coli y la mayor parte de todas las bacterias intestinales forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes definidos, resplandor metálico en los diferentes medios de cultivo (EMB). *Escherichia coli* produce con frecuencia hemólisis en agar sangre. (28, 34)

Escherichia coli crece bien en agar sangre y agar MacConkey, las enterobacterias crecen en la mayor parte de los medios comunes y en medios con concentraciones de sales biliares y colorantes de anilina que inhiben casi todas las bacterias Gram positivas. (34)

1.3.2.4. Manifestaciones Clínicas

Las patologías más importantes producidos por *Escherichia coli*, son: Infección urinaria, bacteremia, meningitis y gastroenteritis aguda (30). En el caso de *Escherichia coli* productora de diarrea se reconocen 5 distintos grupos que dan origen a diferentes síndromes clínicos:

Cuadro N° 3: Gastroenteritis procedidas por *Escherichia coli* (31)

Microorganismo	Lugar de acción	Enfermedad
<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)	Intestino delgado	Diarrea infantil en países subdesarrollados, diarrea acuosa y vómitos, heces no sanguinolentas.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET)	Intestino Delgado	Diarrea del viajero, diarrea infantil, diarrea acuosa, vómitos, espasmos abdominales, náusea, febrícula.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	Intestino Grueso	Inicialmente diarrea acuosa, seguida de diarrea sanguinolenta con espasmos abdominales, sin fiebre y puede progresar a síndrome hemolítico urémico.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (ECEI)	Intestino Grueso	Inicialmente presenta fiebre, espasmos, diarrea acuosa, puede progresar a disentería con escasas heces sanguinolentas.
<i>E. coli</i> enteroagregativa (ECEA)	Intestino Delgado	Diarrea infantil, diarrea del viajero, diarrea acuosa persistente con vómitos, deshidratación y febrícula.

1.3.2.5. Tratamiento

El tratamiento de muchas de estas infecciones requiere medidas para erradicar los factores predisponentes de la infección oportunista como la retirada de sondas.

Los antibióticos a utilizar como en cualquier infección deben ser activos “in vitro” y alcanzar cantidades suficientes en el foco, debiendo seleccionarse los menos tóxicos de entre los eficaces.

La amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas son medicamentos activos.

En las infecciones urinarias existen muchos condicionantes para el tratamiento, siendo los fundamentales la sensibilidad del microorganismo, los factores predisponentes y la topografía de la infección (cistitis o pielonefritis). La amoxicilina, el cotrimoxazol, las quinolonas y los aminoglucósidos, cuando son activos “in vitro”, son clínicamente muy eficaces. (35)

En las enteritis por *Escherichia coli* no se ha demostrado la eficacia del tratamiento antibiótico e incluso parece contraindicado en la colitis hemorrágica, las formas benignas de enteritis no requieren tratamiento antimicrobiano, aunque hay que vigilar las posibles complicaciones, en particular la deshidratación restaurando el balance electrolítico. (35) Sin embargo, en los brotes graves en salas de recién nacidos o lactantes, producidos por *Escherichia coli enteropatógenos*, se aconseja administrar por vía oral neomicina durante 3 a 5 días o colistina en casos de resistencia. (29)

1.3.3. *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa es un importante patógeno oportunista. (32) Se encuentra distribuida con amplitud en la naturaleza, y es frecuente descubrirla en ambientes húmedos de los hospitales, y es más importante como agente de enfermedad humana que todos los demás bacilos no fermentativos. Puede colonizar al ser humano normal, en el cual es un

microorganismo saprófito. Produce enfermedad en las personas que tienen defensas anormales. (28, 34)

1.3.3.1. Morfología e Identificación

Pseudomona aeruginosa es un bacilo Gram negativo de 1 – 3 μm de longitud y 0,5 – 1 μm de grosor, fino no esporulado y en general no encapsulado, con un solo flagelo polar, no fermentan hidratos de carbono, presentan citocromo oxidasa lo que las diferencia de las enterobacterias. (28, 30)

La mayoría de las células bacterianas presentan un flagelo polar, pero algunas pueden tener de 2 a 3. Las cepas clínicas recién aisladas poseen fimbrias que actúan como adhesinas o pilis sexuales.

Pseudomona aeruginosa se multiplica por un sistema bifásico, ya que alternativamente se desplazan dada su gran movilidad, o bien generan una capa mucoide que propicia la formación de microcolonias adherentes. (35)

Pseudomona aeruginosa puede ser identificada presuntivamente por sistemas automatizados y computarizados para bacterias Gram negativas. Sin embargo no siempre estos métodos pueden diferenciar *Pseudomona aeruginosa* de todas las restantes especies, en cuyo caso puede ser necesario determinar las oxidaciones de azúcares, crecimiento a 42°C, morfología de las colonias y la tinción de flagelos. (35)

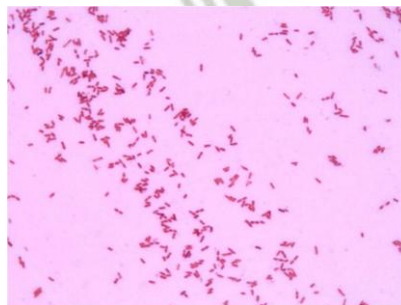


Figura N° 7: *Pseudomona aeruginosa*. Tinción de Gram. Microscopía óptica.
100 X.

1.3.3.2. Cultivo

Pseudomona aeruginosa es un aerobio obligado que crece con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo y produce, en ocasiones, un olor dulzón o de uvas. Algunas cepas hemolizan la sangre. Las colonias son típicas, apareciendo tres variantes: Lisa, rugosa y mucoide, con color verdoso fluorescente. Con frecuencia, produce el pigmento azuloso no fluorescente piocianina, que se difunde en agar. En agar sangre suelen producir betahemólisis, determinada por una fosfolipasa termolábil y un glucolípido termoestable. (28, 35)

Pseudomona aeruginosa crece bien a temperatura oscilante entre 37 a 42°C; su crecimiento a 42°C ayuda a distinguirla de otras especies de Pseudomonas. (28)

Pseudomona aeruginosa no es nutricionalmente exigente, crecen fácilmente en medio agar Macconkey, así todas las cepas crecen en medio selectivo agar cetrimida. (34)

1.3.3.3. Manifestaciones Clínicas

Las infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa*, se presentan en pacientes con sus defensas locales y/o generales disminuidas y habitualmente son infecciones oportunistas intrahospitalarias. Ahora bien, entre las infecciones nosocomiales que se presentan en enfermos con las defensas alteradas, con cáncer, quemaduras, heridas traumáticas y sometidas a instrumentaciones, el bacilo pasa a ser un experto patógeno. Cualquier localización es posible y a partir de ella puede surgir la diseminación hemática, septicemia y lesiones focales en diversos tejidos.

La mayoría de las infecciones se expresan clínicamente por síntomas o signos inespecíficos en relación con los órganos afectados. (35)

Pseudomona aeruginosa produce infección de las heridas y las quemaduras, origina pus de color azul verdoso, meningitis cuando se introduce por punción lumbar, e infecciones de vías urinarias cuando se introduce por

catéteres e instrumentos o en las soluciones de lavado de vías urinarias. La afección de las vías respiratorias, en especial a causa de respiradores contaminados, provoca neumonía necrosante.

La bacteria se encuentra, con frecuencia, en la otitis externa leve de los nadadores. Puede producir otitis externa invasora en pacientes diabéticos. La infección del ojo, que puede culminar en destrucción rápida del mismo, se produce más a menudo después de la lesión traumática, o de los procedimientos quirúrgicos.

Pseudomona aeruginosa tiende a invadir la sangre y originar sepsis mortal; suele suceder así en paciente con leucemia o linfoma que han recibido fármacos antineoplásicos o radioterapia, lo mismo que en pacientes con quemaduras graves. En la mayor parte de las infecciones por *Pseudomona aeruginosa*, los síntomas y signos son inespecíficos y se relacionan con el órgano afectado. (28)

1.3.3.4. Tratamiento

La marcada resistencia a los antibióticos de ésta bacteria hace indispensable, en todos los casos, la necesidad de realizar un antibiograma. (28, 29)

Es recomendable iniciar la terapéutica después de haber tomado las muestras, y si la situación lo permite con datos microbiológicos confirmados. Entre los betalactámicos pueden utilizarse carboxipenicilinas (ticarcilina, sola o asociada a tazobactam), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima), de cuarta (cefepima), monobactam (aztreonam), y carbapenems (imipenem y meropenem). De los aminoglucósidos suelen ser eficaces, amikacina, tobramicina, gentamicina, con variaciones en su actividad comparativa dependiendo de los mecanismos prevalente de resistencia.

Una amplia experiencia avala el tratamiento combinado de un betalactámico y un aminoglucósido para conseguir un efecto bactericida rápido, sobretodo en las infecciones generalizadas. (35)

Las fluoroquinolonas, en especial ciprofloxacino, afloxacina y norfloxacino, han demostrado su actividad in vitro, y su eficacia en la clínica también condicionada por el problema de la resistencia. (28, 35)

1.3.4. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos constituyen el género de la familia micrococáceas de mayor importancia en medicina. Siendo una de las especies *Staphylococcus aureus* que es el microorganismo responsable de casi todos los casos de enfermedad estafilocócica en el hombre. (34) Se encuentra distribuido ampliamente en el ambiente, en humanos y en animales. En los humanos forma parte de la flora normal de la piel, de la nasofaringe y del sistema gastrointestinal. (30)

1.3.4.1. Morfología e identificación

Su morfología es la típica de cocos grampositivos de aproximadamente 1 μ agrupados en racimo, aunque también puede observarse en cadenas cortas o diplococos. En algunas afecciones avanzadas o tras un tratamiento con antimicrobianos, el tamaño de las bacterias puede variar, haciéndose más grande. (35)

Es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, manitol positivo, termonucleasa positivo. Es susceptible a bacteriófagos específicos, que son usados para clasificar al organismo.

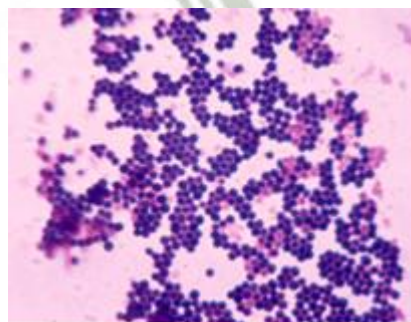


Figura N° 8: Tinción de Gram *Staphylococcus aureus*. 100X

Está entre los microorganismos no formadores de esporas más resistentes, puede mantenerse viable por 6 – 14 semanas en pus, se necesitan 15 minutos de exposición al alcohol a 70% para su eliminación. (30)

Su característica bioquímica más importante es la fermentación de azúcares entre ellos el manitol, para producir ácido láctico lo que le diferencia de los demás estafilococos. El medio agar sal – manitol es útil en el aislamiento e identificación de éste microorganismo. (35)

1.3.4.2. Cultivo

Los estafilococos proliferan fácilmente en la mayor parte de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas. Estos microorganismos son mesófilos y crecen bien en temperaturas de 35 a 37°C. Son anaerobios facultativos y no necesitan un medio especial para su crecimiento. Resisten al calor y la desecación mucho más que otras especies bacterianas. También pueden crecer en condiciones de alta salinidad (7,5 por 100 de ClNa). (35)

Crece bien en agar sangre a 37°. Muchas veces, pero no siempre, presenta un color amarillo dorado (de ahí el nombre de *Staphylococcus aureus* o *Estafilococo dorado*). Puede producir hemólisis beta o ser no hemolítico. (30). Las colonias desarrolladas en medio sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. (28)

1.3.4.3. Manifestaciones Clínicas

Staphylococcus aureus puede formar parte de la flora normal de las personas sanas y se halla en la mucosa nasal del 20 – 40% (portadores nasales) y en la piel del 10 – 20%, especialmente en manos y periné. Se ha observado que cuando los portadores sufren intervenciones quirúrgicas, son más frecuentes los casos de sepsis. (29)

La acción patógena de *Staphylococcus aureus* se manifiesta por la capacidad de invasión del microorganismo y las sustancias que puede elaborar, que ayudan en el proceso infeccioso local y pueden causar lesiones en lugares más distantes. Generalmente son infecciones con gran supuración y necrosis tisular que tienden a la formación de abscesos. Entre todos, éstos son los más importantes, agrupados por las regiones donde se produce la lesión. (35)

Cuadro N° 4: Cuadros Clínicos más importantes causados por *Staphylococcus aureus* (35)

Lugar de infección	Cuadro Clínico	Localización de las lesiones
En piel y mucosa	Forunculosis Impétigo Paroniquia Celulitis	Epidermis (superficial) Epidermis (superficial) Epidermis y dermis Tejido blando junto a las uñas
Generalizadas y en vísceras	Bacteriemia Osteomielitis Artritis Endocarditis Neumonía Meningitis	Torrente circulatorio Hueso (extremidades inferiores) Articulaciones Endocardio Pulmón Meninges
Por acción tóxica	Síndrome de la piel escaldada Síndrome de Shock Tóxico Intoxicaciones alimentarias	Base de epidermis Difuso (piel, riñones, músculos) Aparato digestivo

1.3.4.4. Tratamiento

Las lesiones superficiales y benignas por lo general no requieren tratamiento. Cuando las lesiones son más importantes o existen factores predisponentes, la terapéutica se basa en la selección del antibiótico más

adecuado y en el tratamiento quirúrgico de la infección y del proceso de base que presenta el enfermo. (29, 35)

En general se utiliza cloxacilina en cepas susceptibles y vancomicina en cepas resistentes a oxacilina. Las cepas aisladas de pacientes hospitalizados tienden a ser más resistentes que las de la comunidad. (30)

1.3.5. *Streptococcus pyogenes* o Streptococcus β hemolítico grupo A según la clasificación de Lancefield

La especie más importante de los Streptococcus del grupo A es *Streptococcus pyogenes*. Es una bacteria piogénica (induce la formación de pus), que puede formar parte de la flora de la piel, nariz, faringe y el tracto gastrointestinal. Entre el 5 y 25% de las personas pueden ser portadoras de *Streptococcus pyogenes* en la faringe. (30)

1.3.5.1. Morfología e identificación

Son cocos grampositivos que se disponen en parejas o cadenas, generalmente acapsulados no móviles y aerobios facultativos. Su diámetro varía de 0,5 a 1 μm . Puede tratarse de cocos aislados, de diplococos y típicamente de cadenas de 5, 10 o 20 elementos y a veces más en cadenas largas, cuando se hace por elongación sobre el eje paralelo a la cadena y la división se hace en ángulo recto en el plano ecuatorial. (34)



Figura N° 9: *Streptococcus pyogenes* Tinción de Gram. Microscopía óptica.
100X.

Históricamente se ha identificado a *Streptococcus pyogenes* por su sensibilidad a bacitracina. Con éste método se coloca un disco saturado con bacitracina en una placa inoculada con estreptococos del grupo A y tras un día de incubación, se asigna al grupo A de estreptococos a todas aquellas cepas inhibidas por la bacitracina.

Los estreptococos del grupo A se identifican claramente con la demostración de los hidratos de carbono específicos de grupo, una técnica que no tuvo aplicación práctica hasta las pruebas de detección directa de antigénicos. (31)

1.3.5.2. Cultivo

Las colonias más típicas de *Streptococcus pyogenes* tienen forma de disco, son mate (opacas) y tienen 0,5 a 2 mm. de diámetro. Las colonias opacas derivan de colonias mucoides más jóvenes, cuyas capsulas de ácido hialurónico se deshidratan. Si los cultivos en placa se sellan para evitar la deshidratación las colonias de estreptococo grupo A siguen siendo mucoides. Al perder la virulencia la forma mate revierte a colonias pequeñas lisas de superficie seca y reluciente o a una típica colonia rugosa.

Cuando se cultiva en agar sangre produce una zona clara discreta de verdadera hemólisis alrededor de las colonias, llamada beta hemólisis. El crecimiento y la hemólisis se favorecen por incubación en 10% de CO₂ y una temperatura de 37°C. (28)

Un crecimiento excelente se obtiene generalmente en medios de infusión cerebro corazón o en caldo tripticasa – soja. (34)

1.3.5.3. Manifestaciones clínicas

Los estreptococos del grupo A producen una gran variedad de procesos, una característica exclusiva es su capacidad para inducir secuelas no supurativas en individuos susceptibles.

En la piel y mucosas destacan por su frecuencia, la faringoamigdalitis y en menor grado la piodermitis, el impétigo, la otitis, la sinusitis y la fascitis necrotizante.

Las localizaciones en estructuras internas suelen aplicar una difusión linfática y hemática previa desde los procesos anteriores. Así ocurre menos en el caso de meningitis o endocarditis. La sepsis estreptocócica surge a partir de focos cutáneo mucosos o internos. (36)

1.3.5.4. Tratamiento

La droga de elección es penicilina, su formulación (sódica o benzatina) y la vía de administración (oral, endovenoso o intramuscular) dependerá de cada caso particular.

En pacientes con antecedentes de alergia a la penicilina se puede usar eritromicina o una cefalosporina oral. (35)

La erradicación del agente, cuyo objetivo es evitar las secuelas no supurativas, se logra con una terapia oral prolongada (10 días) o con penicilinas de depósito. En infecciones invasivas se recomienda asociar clindamicina. (30)

1.4. Antibióticos de control

1.4.1. Antibiótico β - lactámico

1.4.1.1. Cefalosporinas (37)

1.4.1.1.1. Origen

Las cefalosporinas se obtienen de hongos del género *Cephalosporium*, siendo la sustancia más importante la cefalosporina C, de estructura química semejante a la de la penicilina.

Las cefalosporinas pueden ser:

- **Cefalosporinas naturales:** De cultivos de hongos del genero *Cephalosporium* se extrajeron una serie de antibióticos denominados cefalosporinas N, P y C, que no se utilizan en terapéutica por no poseer acción antibacteriana potente.

- **Cefalosporinas semisintéticas:**
 - Primera Generación: Actividad similar a penicilinas, tipo ampicilina: parenteral, tenemos: cefalotina, cefalexina, cefazolina, cefaloridina, cefradina, cefadroxil.
 - Segunda Generación: Actividad ampliada contra algunas Enterobacteriaceas, Haemophilus y anaerobios, actividad disminuida contra cocos Gram positivos y tenemos: cefaclor, cefoxitina, cefuroxime.
 - Tercera Generación: Actividad ampliada contra bacilos Gram negativos, incluyendo Pseudomona; generalmente menos actividad contra cocos Gram positivos, donde están: ceftriaxona, cefotaxime, ceftizoxima, Ceftazidima, cefoperazona.
 - Cuarta Generación: Actividad mayor contra Gram negativos y mejor acción contra algunos cocos Gram positivos, tenemos: cefepime, cefpiroma.

1.4.1.1.2. Farmacodinamia

A. Acción antibacteriana

Cefalosporinas de primera generación. Fueron aprobadas para su uso clínico desde 1973-75. Son las más activas frente a la mayoría de los cocos grampositivos aerobios, incluyendo *S. aureus* meticilinosensible.

Cefalosporinas de segunda generación. Son utilizadas desde 1979. Tienen menor actividad frente a *Staphylococcus* spp.

meticilinosensible, pero son más activas frente a algunos gramnegativos. Su actividad frente a la mayoría de anaerobios es escasa.

Cefalosporinas de tercera generación. El espectro antimicrobiano "*in vitro*" comprende los microorganismos de las cefalosporinas de primera y segunda generación y es más amplio aún ya que comprende cocos Gram positivos, cocos Gram negativos, bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos. La acción es especialmente bactericida y se ejerce sobre la pared celular.

"*In vivo*", las cefalosporinas de tercera generación son benéficas en las infecciones experimentales y en el hombre por los microorganismos susceptibles.

Cefalosporinas de Cuarta generación son las de más reciente aparición (1992). Tienen un espectro extendido frente a gramnegativos, grampositivos, siendo su actividad baja frente a anaerobios. Tienen una actividad mayor que las de 3ª generación frente a gérmenes grampositivos. Su actividad es similar a las cefalosporinas de 3ª generación frente a gramnegativos, también son activas frente a cepas productoras de algunas betalactamasas de espectro ampliado, pero son hidrolizados por otras. Su actividad frente a anaerobios es limitada.

B. Resistencia antibacteriana

Se ha descrito la producción de resistencia por parte del *Staphylococcus aureus* o estafilococo. Dicha resistencia se debe a la β - lactamasa producida por dichos microorganismos en grandes cantidades y que inactiva al antibiótico por apertura del anillo β - lactámico. También puede producirse resistencia por parte de bacilos Gram negativos y se debe también a la formación de β - lactamasa, que destruye dichos antibióticos.

C. Mecanismo de acción bactericida

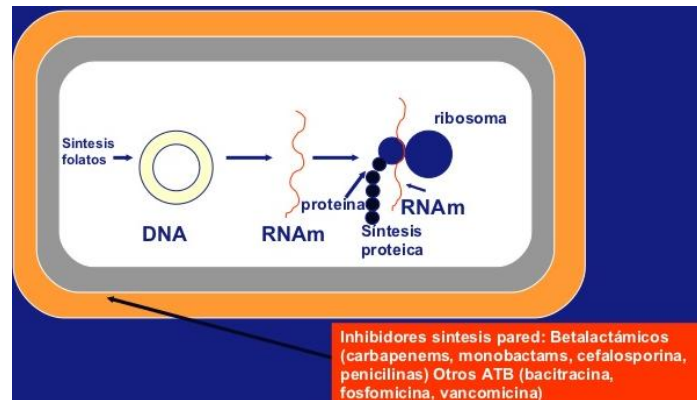


Figura N° 11: Mecanismo de acción de las cefalosporinas(50)

Las cefalosporinas son antibióticos bactericidas, cuya acción se basa en la capacidad de poder unirse a las proteínas ligadoras de penicilina localizadas en las membranas citoplasmáticas bacterianas

La respuesta del antibiótico generalmente depende de la velocidad de la división celular bacteriana, mostrando aquellas con mayor velocidad de replicación una mayor sensibilidad al antibiótico.

Este antibiótico es especialmente útil en infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa*. Las cefalosporinas de tercera generación tienen alta estabilidad en presencia de β lactamasas y un espectro de acción más amplio frente a bacterias Gram negativas. Son menos eficaces que las cefalosporinas de primera y segunda generación frente a cocos Gram positivos.

1.4.2. Aminoglucósido

1.4.2.1. Amikacina (37)

1.4.2.1.1. Origen

La amikacina es un derivado semisintético de la kanamicina.

1.4.2.1.2. Farmacodinamia

A. Acción antimicrobiana

El espectro antimicrobiano de la amikacina comprende bacterias Gram positivas y Gram negativas, y así, son susceptibles el *Staphylococcus aureus* o estafilococo especialmente, mientras que la *Pseudomona aeruginosa* sensible a la amikacina. Cabe señalar que estafilococos resistentes a otros antibióticos muestran susceptibilidad frente a la amikacina.

B. Resistencia bacteriana

La amikacina puede dar lugar a fenómenos de resistencia bacteriana, experimentada especialmente por los bacilos Gram negativos, esta resistencia a los aminoglucósidos ha ido aumentando con el tiempo. Debido a la similitud de la estructura química de los antibióticos aminoglucósidos, es frecuente la existencia de resistencia cruzada entre ellos.

C. Mecanismo de acción bactericida

Se une a la subunidad 30s del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas produciendo la ruptura de las membranas citoplasmáticas bacterianas y muerte celular; su espectro de actividad incluye aerobios Gram negativos. Este fármaco tiene menor actividad contra Gram positivas. No es efectiva contra anaerobios.

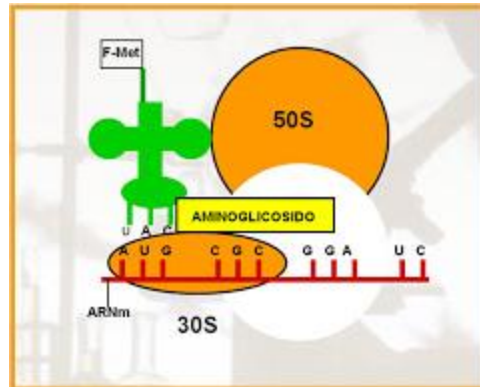


Figura N° 12: Mecanismo de acción de los aminoglucosidos(50)

1.4.3. Polieno

1.4.3.1. Anfotericina B (38)

1.4.3.1.1. Origen

La anfotericina B es un antifúngico de uso parenteral y oral obtenido por fermentación del *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo. La anfotericina B está químicamente emparentada con la nistatina, siendo un polieno. La denominación de este antifúngico se debe a su propiedad anfótera, debido a la presencia un grupo ácido y de un grupo amino, lo que permite que el producto sea relativamente soluble en agua.

1.4.3.1.2. Farmacodinamia

A. Mecanismo de acción

La anfotericina B se une a los esteroides de la membrana celular tanto de los hongos como humanas, deteriorando la integridad de las mismas. Esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares. La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esteroide encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esteroide preferente de las membranas de las células humanas) la anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, en particular a nivel renal.

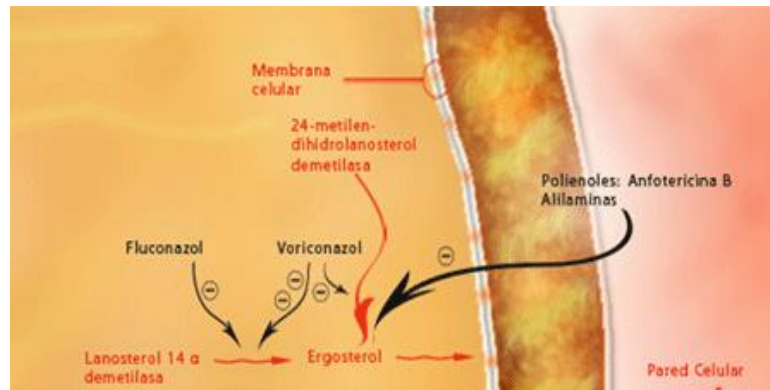


Figura N° 13: Mecanismo de acción de la anfotericina B(50)

B. Resistencia bacteriana

Como con otros microorganismos, la resistencia de los hongos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que puede clasificarse en resistencia microbiológica y resistencia clínica. La primera se puede subdividir en:

- Resistencia intrínseca o innata. Es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico.
- Resistencia primaria. Es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.
- Resistencia secundaria o adquirida. Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.
- La resistencia clínica. Puede definirse como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en éste existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión. La resistencia clínica está relacionada con distintos factores dependientes del fármaco, del paciente o de ambos.



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de Investigación

Es un estudio experimental prospectivo de corte transversal

2.2. Materiales y reactivos

2.2.1. Material biológico

2.2.1.1. Botones florales de *Eugenia caryophyllata* (Clavo de olor)

Para la extracción del aceite esencial se ha empleado los botones florales de la planta (clavo de olor) procedentes de Madagascar.

2.2.1.2. Cepas bacteriológicas y fúngicas

Se obtuvieron las cepas del laboratorio de Análisis Microbiológico del Hospital Goyeneche – Arequipa.

2.2.2. Material de Estudio

2.2.2.1. Aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*

Fue extraído de los botones florales de la planta, por el método de arrastre de vapor de agua (hidrodestilación)

2.2.3. Materiales de laboratorio

2.2.3.1. Materiales de vidrio

- Pera de decantación de 250 ml
- Probeta de 100 ml
- Frascos de vidrio color ámbar x 30 ml
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- Matraz de 250 ml.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Placas petri 15 x 60 mm
- Baguetas

2.2.3.2. Equipos de laboratorio

- Autoclave Sturdy SA-260 MA
- Esterilizadora J.P. Selecta 15 CE
- Balanza Analítica Sartorius
- Mechero bunsen
- Cocina Surge
- Equipo de destilación por arrastre de vapor (Clevenger) Merck

2.2.3.3. Otros

- Hisopos estériles
- Asa de Kolle
- Espátula
- Gradilla para tubos de ensayo
- Gasa y algodón
- Pinzas
- Pizetas

2.2.3.4. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud Merck
- Caldo peptona Microgen
- Agar base sangre Criterion
- Agar Mueller Hinton Merck

2.2.4. Discos de sensibilidad de comparación.

- Amikacina 30 ug
- Ceftazidima 30 ug
- Anfotericina B 10 ug

2.3. Métodos

2.3.1. Métodos fotoquímicos

2.3.1.1. Obtención del material vegetal

El clavo de olor se obtuvo en una especería del centro de la ciudad, ya que es originario de las islas Molucas (islas de especias), en este caso el botón floral obtenido fue procedente de Madagascar.

2.3.1.2. Extracción del aceite esencial del clavo de olor

La extracción del aceite esencial de clavo de olor, se realizó por medio de una destilación de arrastre de vapor de agua, este método es el indicado por las diversas características de investigación y fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería de Industria Alimentaria de nuestra Universidad Católica de Santa María.

Método: Destilación por arrastre de vapor de agua (Hidrodestilación)

Fundamento:

La destilación por arrastre con vapor de agua se fundamenta en que todo compuesto orgánico forma con el vapor de agua mezclas de vapores saturados, los cuales destilan a una temperatura mucho menor al punto de ebullición del compuesto pesado evitando así su descomposición.

La mezcla de vapor de agua – aceite pasa un condensador y luego a un recipiente, donde se separa del aceite, debido a la diferencia de sus densidades.

En este proceso de hidrodestilación, al morir la célula vegetal por acción del calor, la pared celular pierde su carácter de tabique impermeable, transformándose en un tabique poroso, donde el proceso de intercambio deja de ser fisiológico.

La extracción del aceite esencial se realizó en el equipo de Clevenger, primeramente se seleccionó el material vegetal (botones florales) y luego se pesó 200 gr de material, la cual se colocó en el balón, enseguida se agregó agua suficiente para evitar que el material pudiera sufrir daño por quemaduras.

Luego de que el material vegetal este dentro del balón se procedió a cubrir todo el equipo de Clevenger con papel aluminio con la finalidad de que el calor se concentre y después se procedió a calentar hasta ebullición del agua, se fue revisando que la probeta no se llene completamente de agua, producto de la condensación del vapor. La Hidrodestilación se realizó durante 180 minutos, contados después de la obtención de la primera gota de destilación, se recogió 15 fracciones de destilado.

Luego el destilado se almaceno en una pera y se dejó decantar hasta esperar que el aceite y el agua se separe observando dos fases fácilmente

visible e identificable, el aceite del clavo de olor por ser más denso que el agua, este se ubicó en la parte inferior de la pera, facilitando así su separación y obteniéndose un rendimiento promedio de 4 % deduciendo así que el rendimiento del aceite es elevado; una vez que se separó las fases del aceite se envasó en un recipiente de vidrio de color ámbar y se cierra herméticamente para evitar su degradación al estar en contacto con el medio ambiente.

2.4. Determinación fisicoquímica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*

a.- Análisis Organoléptico:

Se realiza una observación sensorial de las características organolépticas tales como:

- color
- olor
- sabor
- aspecto

b.- Solubilidad:

Método para la solubilidad del aceite esencial se evalúa la capacidad de disolución en agua, etanol 70° y etanol de 90°.

Para realizar la solubilidad del aceite se colocó 0.5 ml de aceite esencial del clavo de olor en un tubo de ensayo y luego se adicionó 0.5 ml de agua, paralelamente se realizó el mismo procedimiento con los demás disolventes. Los resultados obtenidos son expresados como solubles e insolubles.

c.- Densidad:

Método: Picnómetro

Fundamento:

Este método se basa en la diferencia de pesos entre el picnómetro vacío relacionándola con la capacidad en volumen del picnómetro.

Para determinar la densidad del aceite se procedió a pesar el picnómetro limpio y seco, una vez obtenido el peso del picnómetro se introdujo el aceite esencial hasta la marca de aforo del picnómetro verificando que el sistema se encuentre a 20° C.

Aplicando la formula por diferencia de ambos pesos y la capacidad en volumen del picnómetro se calcula la densidad

Formula;

$$d = \frac{P_2 - P_1}{v}$$

Donde:

d = Densidad (g/ml)

P₁ = Peso del picnómetro vacío (g)

P₂ = Peso del picnómetro lleno con el aceite esencial (g)

V = Capacidad en volumen del picnómetro

d.- Índice de Refracción

Método: Refractómetro de Abbe.

Fundamento:

La refractometría es un método analítico físico que se basa en la medición del índice de refracción de un haz luminoso correspondiente a la línea espectral.

Esta refracción se debe al cambio de velocidad que experimente, la luz al pasar a un medio de distinta densidad de modo que la relación entre las velocidades de la luz en esos medios diferentes dará una cifra constante que se llama índice de refracción.

La calibración es un factor importante en esta técnica analítica para la cual se utilizó una gota de agua destilada a temperatura de 20°C, cuya lectura coincide con el índice de refracción del agua (1.333).

La medición se realizó después de limpiar cuidadosamente el prisma, con una tela seca o algodón impregnado de alcohol, esperando que este se evapore. Posteriormente se colocó una gota del aceite esencial para medir el índice de refracción dando resultado en la pantalla del refractómetro.

2.4.1. Determinación de la actividad *in vitro* sobre cepas

2.4.1.1. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*.

A. Microorganismos de prueba

Para realizar las pruebas de actividad biológica se emplearon 5 cepas: Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 25212. De la misma manera se emplea la levadura: *Candida albicans* ATCC 1023

B. Pruebas antimicrobianas

B.1. Aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* 100 %

La cuantificación de la actividad *in vitro* del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* se evalúa habitualmente mediante el método de excavación placa cultivo. Este método se basa en la determinación del crecimiento de microorganismos en presencia de concentraciones del aceite esencial, determinando la actividad que presenta el aceite esencial frente a los microorganismos en estudio.

Para la realización de las pruebas antimicrobiana del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* frente a diferentes tipos de microorganismos realizaremos las siguientes preparaciones:

1. Preparación de los inóculos:

- Se prepara 100 mL. de caldo peptonado.
- Se toma 4 a 5 colonias de las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus pyogenes y la levadura *Candida albicans* sumergiéndolos en 10 mL descargando la muestra.

- La turbidez de los medios se ajustan a la del tubo N°5 de la escala de Mac Farland a concentración de 10^8 microorganismos / mL.

2. Preparación de los medios de cultivo

- Preparamos 200 mL del agar tanto para bacterias (Mueller Hinton) y para levadura (Sabouroud)
- Autoclavar el agar para bacterias y dejar enfriar hasta alcanzar los 45°C – 50°C.
- Plaquear sobre una superficie plana asegurándonos de que la profundidad sea de 4 mm aproximadamente.
- Dejar solidificar el medio de cultivo a temperatura ambiente.

3. Aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* 100 %

Una vez obtenido el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) y realizado el análisis correspondiente, ya lo tenemos listo para poder realizar las pruebas frente a las bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeuruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) y la levadura (*Candida albicans*) y poder determinar si presenta alguna actividad frente a los microorganismos en estudio.

4. Método excavación placa cultivo

Fundamento:

Se basa en que la sustancia a investigar es depositada en el hoyo el cual forma contacto con la superficie del agar el cual se encuentra con el microorganismo, de tal manera que difunde hacia el medio circundante, a medida que aumenta la distancia al hoyo hay

una reducción de la concentración de la sustancia hasta alcanzar un punto en que el desarrollo bacteriano en el agar ya no es inhibido. La actividad de la sustancia se evalúa midiendo el halo de inhibición formado.

Para realizar el estudio experimental por el método excavación placa cultivo se procede a realizar los siguientes pasos:

- Se perfora una zona del medio de cultivo (hoyo) de 5 mm de diámetro.
- Colocar 100 μ L del aceite esencial a las diferentes concentraciones en las placas previamente sembradas.
- Incubar entre 18 – 24 horas a temperatura de 37°C, en el caso de *Candida albicans* por 48 horas a temperatura ambiente.

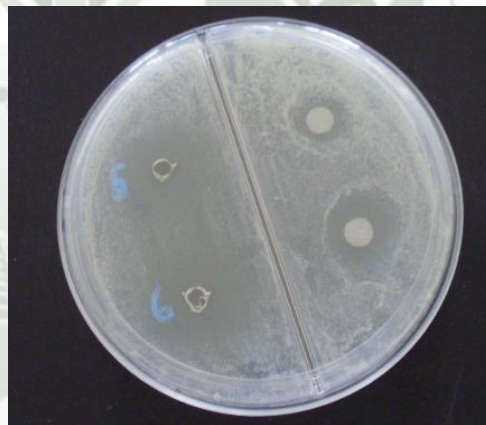


Figura N° 14: Método excavación placa cultivo, cepa *Candida albicans* ATCC 1023

B.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica mediante técnicas de dilución se realiza utilizando una escala por lo que los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) reales de un determinado antibacteriano será la menor concentración del antibacteriano y antifúngico capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada.

a. Método Kirby Bauer.

Fundamento:

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 18 – 24 horas a 35 – 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio.

El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R) de acuerdo a las tablas publicadas por organismos encargados del control de tales métodos. (Ver tabla 1,2,3 y 4 del anexo)

Para obtener resultados confiables y reproducibles mediante este método, es indispensable seguir las instrucciones que daremos a continuación:

- Verter asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor.
- Dejar solidificar el medio de cultivo.
- Inocular las placas mediante un hisopo estéril utilizando el inóculo de la bacteria. Para la inoculación sumergir el hisopo estéril en el inóculo eliminando el exceso rotándolo contra la pared del tubo. Frotar el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo.
- Repetir esta operación rotando la placa para así obtener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie.
- Coloca los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles e incubamos.

Lectura e interpretación: de los halos de CIM, CBM y CFM

La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como resistente (R), sensible (S), intermedio (I).

Para realizar la lectura e interpretación realizaremos los siguientes pasos:

- Medir los diámetros de las zonas inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador.
- Mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.



Figura N° 15: halos de inhibicion frente al aceite esencial

- En medios suplementarios con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa, teniendo cuidado de no medir la zona de hemólisis si no la de inhibición del crecimiento.(ver tabla en anexo)

1. Diluciones del aceite esencial del tubo 2 al 10

- Se coloca en cada uno de los tubos 1 mL de diluyente con tween 80 a excepción de tubo N° 1.
- Al tubo N° 1 se le añade 1 mL de aceite esencial.
- Al tubo N° 2 se agrega 1mL de aceite esencial, se mezcla y se retira 1 mL para luego añadirle al tubo N° 3.
- Del tubo N° 3 se retira 1mL y se añade al tubo N° 4
- Del tubo N° 4 se retira 1 mL y se añade al tubo N°5
- Hasta llegar al tubo N° 10 donde se retira 1 mL para ser eliminado.

Características	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
Diluyente + tween 80 (mL)		1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aceite esencial 40ug/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Diluciones del Aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (%)	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195

b. Método de dilución en caldo

Fundamento:

Es la base de casi todos los métodos utilizados en la actualidad donde se colocan concentraciones decrecientes del agente antibacteriano, generalmente diluciones 1:2 en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo.

Es el método indicado cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida.

Para la realización de este método se realiza los siguientes pasos:

- Llevamos el inóculo de 10^8 a 10^6 mediante dilución.
- La dilución del aceite lo realizamos mediante el siguiente cuadro:

Tubo N°	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
Diluyente + tween 80	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aceite esencial (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inóculo 10^6 (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dilución final del Aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (%)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	0,097
Concentración final del Aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039

- Luego se incuba por 24 horas a temperatura de 37° C y el caso de *Candida albicans* a 48 horas a temperatura ambiente.

Finalmente se realiza un subcultivo de las diluciones con la finalidad de determinar la concentración bactericida

Lectura e interpretación

- Observar si hubo halo de inhibición para luego determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

- Finalmente se procede a medir los halos de inhibición formados alrededor de cada hoyo, utilizando una regla expresando los resultados en milímetros.
- Determinamos si hay sensibilidad (presencia de halo) o resistencia al aceite esencial (ausencia de halo)



Figura N° 16: Método de dilución en caldo

B.3. Determinar de la Concentración Bactericida Mínima.

La CBM se puede calcular a partir del método de dilución en caldo, generalmente macrométodo, y determinando la proporción de bacteria viables después de 18 – 24 horas de contacto con el caldo que contiene el antibiótico.

Lectura e interpretación

- Observar si hubo crecimiento de los microorganismos en los subcultivos.
- Contar las colonias de las placas de agar con las diluciones del CIM.
- Contar el número de colonias en las placas para la determinación de la CBM.

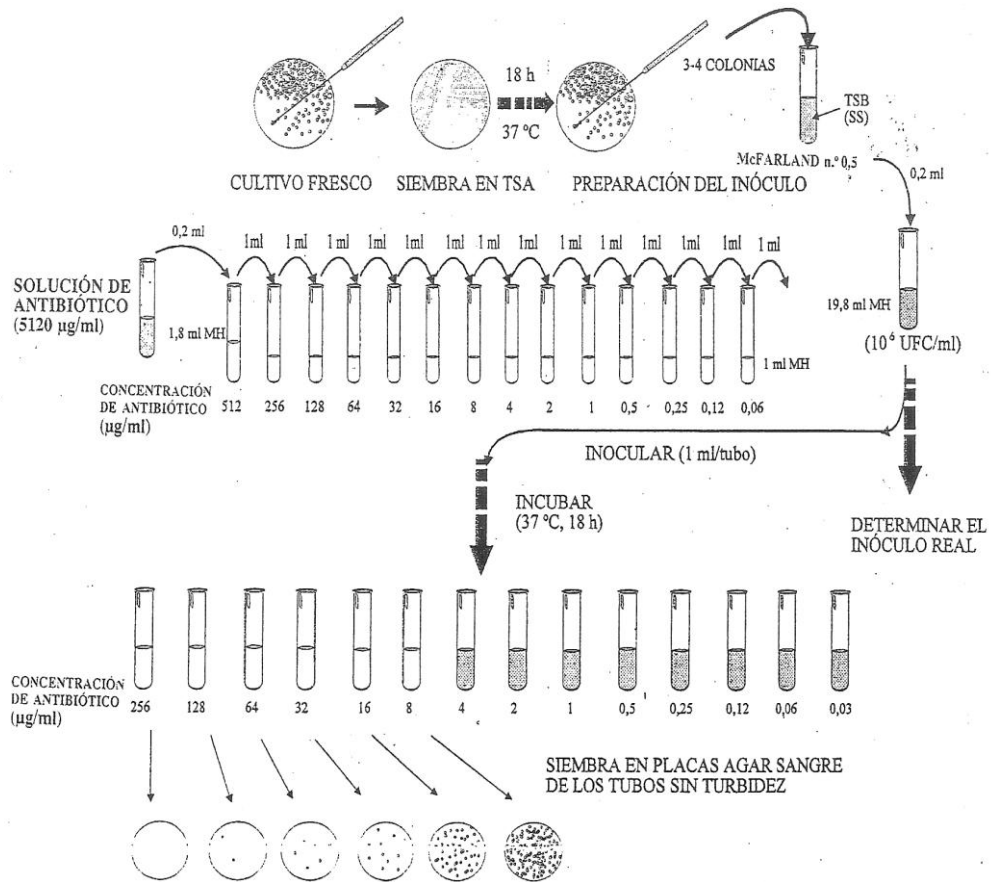


Figura N° 1: Determinación de la CIM y CBM. Método de dilución en caldo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllata*

La extracción del aceite esencial se realizó por el método de arrastre con vapor de agua en un equipo tipo Clevenger utilizando 200 g. de material vegetal durante cuatro horas, de lo cual obtuvimos como rendimiento total de 4 % de aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*. Este resultado es similar según a lo que menciona Jean Bruneton (12) que el rendimiento debe ser como máximo 4 % y el de clavos alterados debe ser inferior al 2%, esto nos indica que el material vegetal utilizado para la investigación no presenta alteraciones ni contaminación obteniendo así un aceite esencial puro.

3.2. COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllata*

Con respecto a la composición del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*, este fue analizado mediante un cromatografo de gases (CG) acoplado a un espectrómetro de masa (EM). Los compuestos fueron identificados por comparación de sus patrones de fragmentación reportando en los espectros de masas con los presentes en la biblioteca de espectrómetro de masa 98 NITS

(Instituto Nacional de Estándares y Tecnología ,EE.UU.),se identificaron los siguientes componentes: eugenol 92.53 %, cariofileno 1.79 % y fenol 5.68 %, según Jean Bruneton(12) menciona que el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* contiene: eugenol 75 a 88 % y cariofileno tiene de 5 a 14 %; mientras M. Hakkı Alma y colaboradores(46) mencionan que el aceite de brote de clavo proveniente del Mediterráneo de Turquía obtuvo eugenol 87 % , cariofileno 3.56 % y acetato de eugenilo 8.01 %. A comparación con nuestros resultados obtenidos el eugenol tiene mayor concentración y el cariofileno menor concentración, esta diferencia se debe probablemente a factores genéticos, el clima, el suelo y técnicas de cultivo que fueron aplicados.



3.3. ACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllata*

Como prueba inicial se realizó el estudio antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) frente a, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans* usando el método de Kirby Bauer para evaluar su efectividad en una concentración del 100% realizando las pruebas por triplicado, obtuvimos como resultado que hubo inhibición del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y la levadura *Candida albicans*; a diferencia que frente a *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomona aeruginosa* no presentó ninguna actividad, esto se debe a la composición estructural de la pared celular que contienen ambas bacterias, la primera presenta una proteína M que determina la virulencia de la bacteria y así evitar la fagocitosis y la segunda presenta una exotoxina A y alginato, por lo tanto ambas bacterias presenta mayor resistencia bacteriana.

Tabla 1

Actividad del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) frente a, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*.

Microorganismo	Aceite esencial de <i>Eugenia caryophyllata</i> al 100% (40ug/mL)
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Candida albicans</i>	+

+ : indica actividad frente al microorganismo

- : indica ausencia de actividad frente al microorganismo

3.4. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

Para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima se realizó por el método de dilución en caldo por triplicado; estos ensayos fueron realizados para las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans*. De los resultados observados en el Anexo 11; se construyó las Tablas 2 y 3 en donde observamos que el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron inhibidos a una concentración de 5 ug/mL lo que corresponden a su Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y según L. Hernandez Ochoa y colaboradores presentaron valores de CIM menores para las Gram positivas lo cual ellos difieren que el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* es más sensible para bacterias Gram positivas que para las Gram negativas, según nuestra investigación deducimos que presentan la misma sensibilidad para ambas bacterias.

Tabla 2

Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) para *Escherichia coli*

Repeticiones	Concentración del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ : Indica que hubo crecimiento

- : indica ausencia de crecimiento

Tabla 3

Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) para la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Repeticiones	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ : Indica que hubo crecimiento

- : indica ausencia de crecimiento

Adicionalmente en la Tabla 4 se evidencia que en los tres ensayos realizados con el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) sobre cepas de *Candida albicans* hubo crecimiento a concentraciones menores de 5 ug/mL a 0.078 ug/mL y mientras que a concentraciones mayores de 10 ug/mL fueron inhibidas las levaduras, siendo a dicho valor su Concentración Inhibitoria Mínima.

Tabla 4

Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) frente a la *Candida albicans*.

Repeticiones	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- + : Indica que hubo crecimiento
- : indica ausencia de crecimiento

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que *Candida albicans* requiere mayor concentración del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* para poder impedir el crecimiento de la levadura presentando una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Ilustrado en el Grafico 1), esto se debe a que *Candida albicans* tiene la capacidad de producir esporas de resistencia por ello requiere mayor cantidad de aceite esencial para poder impedir el crecimiento de dicho microorganismo (34).

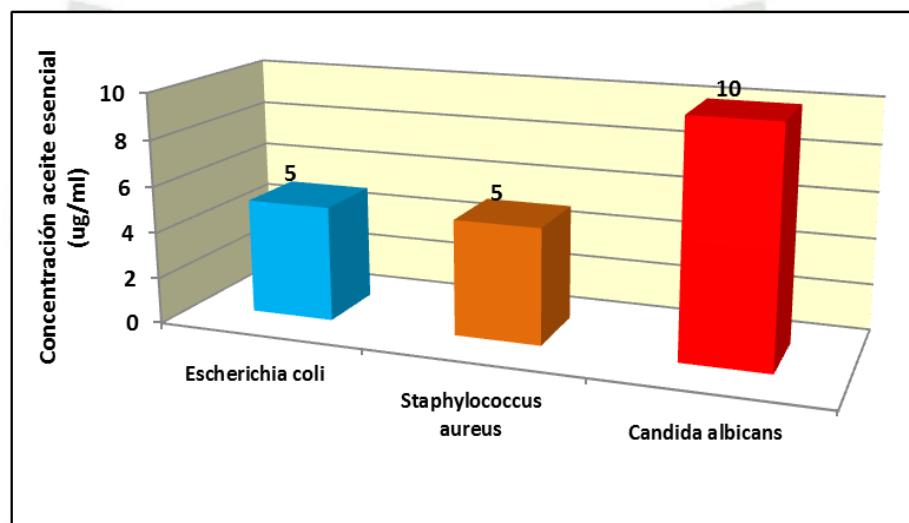


Gráfico 1

Concentración Inhibitoria Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

3.5. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA Y FUNGICIDA MÍNIMA

De acuerdo al estudio experimental realizado las Tablas 5 y 6 nos muestran la Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* luego de dilución en caldo se realiza el subcultivo en placa que fue de 5 ug/mL y 20 ug/mL en las tres repeticiones realizadas. Según M.Orozco y colaboradores (51) utilizaron menor cantidad de concentración del aceite esencial (5 ug/mL) para hallar la Concentración Bactericida Mínima frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; este resultado difiere con los datos obtenidos en nuestra investigación debido a que la extracción del aceite esencial se realizaron por diferentes métodos de extracción; los solventes orgánicos tienen mayor capacidad de extracción de los componentes activos de las plantas (48).

Tabla 5
Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre el microorganismo *Escherichia coli*.

Repeticiones	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

* + : Indica que hubo crecimiento
* - : indica ausencia de crecimiento

Tabla 6
Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus*.

Repeticiones	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

* + : Indica que hubo crecimiento

* - : indica ausencia de crecimiento

Se puede observar en la Tabla 7 que a concentraciones menores de 5 ug/mL hasta 0.078 ug/mL del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* hubo crecimiento de levaduras; mientras a contracciones mayores de 10 ug/mL no se observó crecimiento siendo a este valor su Concentración Fungicida Mínima para *Candida albicans*, debido a que los componentes de los aceites esenciales desestabilizan la membrana citoplasmática, derivando en una pérdida de su citoplasma, e incluso inhibe la respiración celular(49).

Tabla 7

Concentración Bactericida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre la levadura *Candida albicans*.

Repeticiones	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
1 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3 ^a	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

* + : Indica que hubo crecimiento

* - : indica ausencia de crecimiento

Los resultados obtenidos se comparó a los tres microorganismos, como se puede observar en la Tabla 8 y en el Grafico 2 donde *Escherichia coli* necesita menor concentración de aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* para inhibir su crecimiento mientras que *Staphylococcus aureus* requiere mayor concentración de aceite esencial para impedir el crecimiento de la bacteria siendo su Concentración Bactericida de 5 ug/mL y 20 ug/mL. Por otro lado *Candida albicans* requiere de 10 ug/mL de concentración del aceite esencial para impedir el crecimiento de levadura siendo este la Concentración Fungicida Mínima. De los resultados podemos deducir que el aceite esencial presenta mayor efectividad antimicrobiana para las bacterias Gram positivas, ello se debe a que el aceite del clavo de olor tiene un alto contenido de eugenol, actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular (38).

Tabla 8
Concentración Bactericida y Fungicida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Microorganismos	Concentración de aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)									
	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

* + : Indica que hubo crecimiento
* - : indica ausencia de crecimiento

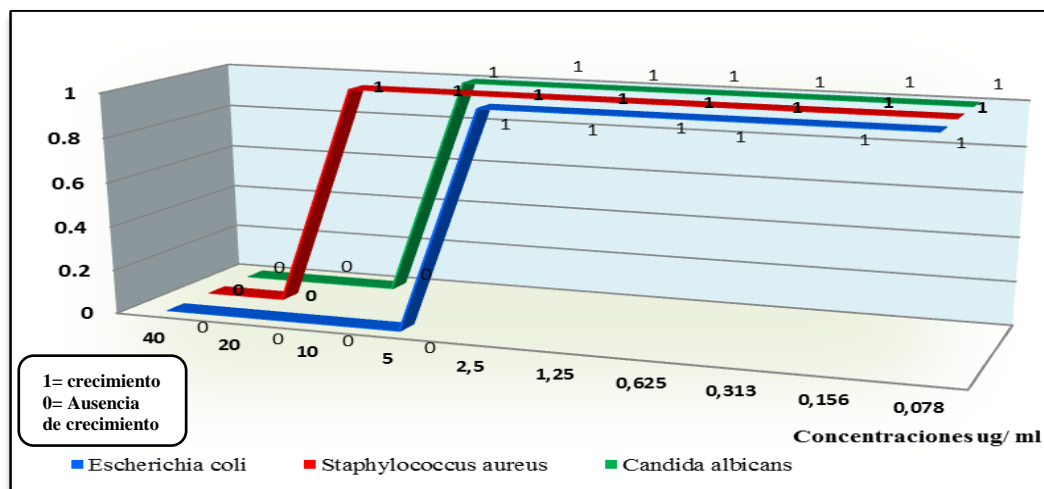


Grafico 2

Concentración Bactericida y Fungicida Mínima del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Dichos resultados en ambos métodos de dilución en caldo y agar (Tabla 9 y Grafico 3) nos indica que el aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) presenta mayor sensibilidad frente a *Escherichia coli* encontrando su CIM y CBM es 5 ug/mL por lo que podemos inferir que el aceite esencial *Eugenia caryophyllata* tiene una acción bactericida mientras que para *Staphylococcus aureus* tiene acción bacteriostático debido que su CIM es 5 ug/mL y CBM es 20 ug/mL. Por otro lado *Candida albicans* presenta CIM y CFM de 10 ug/mL según a estos resultados deducimos que el aceite esencial *Eugenia caryophyllata* tiene un efecto fungicida.

Tabla 9

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor)

Microorganismos	Actividad del aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i> (ug/mL)	
	CIM	CBM y CFM
<i>Escherichia coli</i>	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	20
<i>Candida albicans</i>	10	10

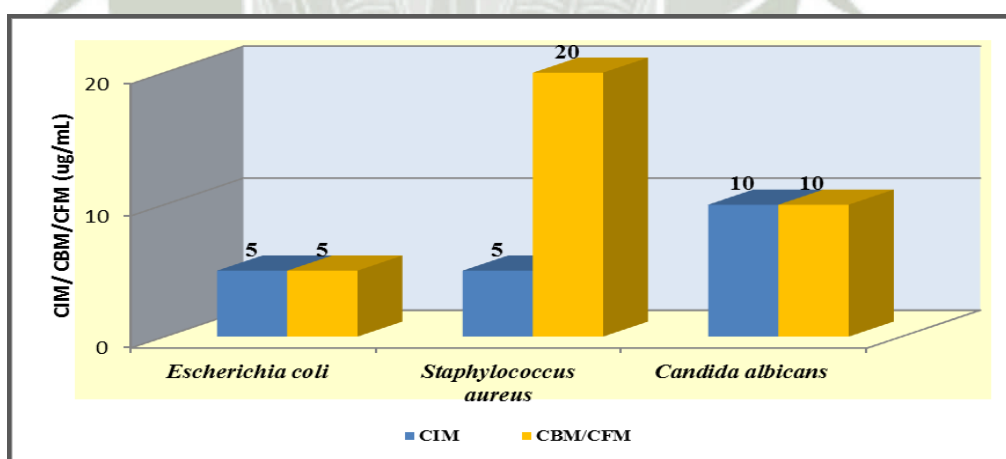


Grafico 3

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor)

Por otro lado los estudios realizados con el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) por el método placa cultivo difusión en el Grafico 4 nos muestra que el promedio del halo de inhibición más alto (20.0 mm) fue para la bacteria *Escherichia coli* y con un menor halo promedio (11.0mm) para *Staphylococcus aureus* según el Anexo 12. Adicionalmente se observa también un halo promedio de inhibición (13.5 mm) cuando se trata de la levadura *Candida albicans* demostrando así actividad antibacteriana a la concentración de 20 ug/mL; de acuerdo a Juliana Moura Mendes y colaboradores (47) mencionan que el valor mínimo de la zona de inhibición para presentar esta actividad es de 10 mm ,diferiendo así que el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* obtenido si presenta actividad antimicrobiana debido a que sobrepasa el límite de la zona de inhibición, utilizando la técnica adaptada del antifungigrama.



Gráfico 4

Promedio del diámetro de los halos de inhibición antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) por microorganismos.

3.6. INHIBICION DE MICROORGANISMOS SEGÚN DISCOS DE SENSIBILIDAD

Según las pruebas de control realizada por el método placa cultivo difusión a una concentración de 4.2 ug de aceite esencial *Eugenia caryophyllata* podemos observar en la Tabla 10 y en los Gráficos 5 y 6 muestran los diámetros de los halos de inhibición que presentan las bacterias estudiadas según los diferentes discos de sensibilidad de los antibióticos. En el caso de *Escherichia coli* el aceite esencial *Eugenia caryophyllata* fue más efectivo obteniendo un halo de inhibición de 20 mm frente a la Ceftazidima que tuvo 18 mm pero fue menos efectiva que la Amikacina que obtuvo un halo de inhibición de 22 mm. También se observa que la Amikacina y Ceftazidima muestra una mayor eficacia frente al aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (11 mm) para la bacteria *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 20 mm y 19 mm. Según la Tabla 1, 2, 3 y 4 del anexo concuerdan los halos de inhibición que se obtuvieron con los discos de sensibilidad de antibióticos, estos resultados se encuentran dentro de los rangos sensibilidad para dichas bacterias.

Tabla 10

Halos de inhibición por microorganismos indicadores según discos de sensibilidad.

Discos de sensibilidad	Contenido del disco	Microorganismos indicadores		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Ceftazidima	30 ug	18	19	
Amikacina	30 ug	22	20	
Anfotericina B	10 ug	-	-	19
Aceite esencial <i>Eugenia caryophyllata</i>	4.2 ug	20	11	13,5

- : No hubo actividad del disco de sensibilidad

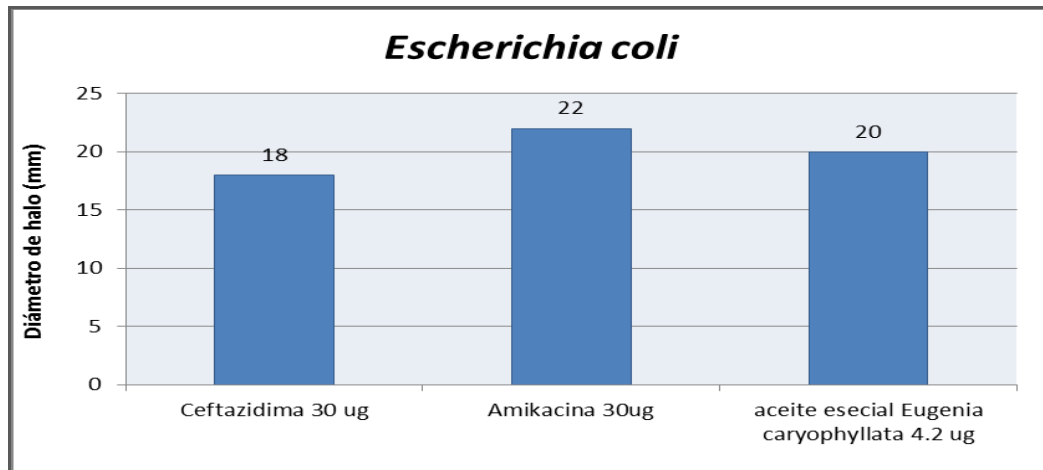


Grafico 5

Halos de inhibición del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor), Ceftazidima 30 ug y Amikacina 30 ug para *Escherichia coli*

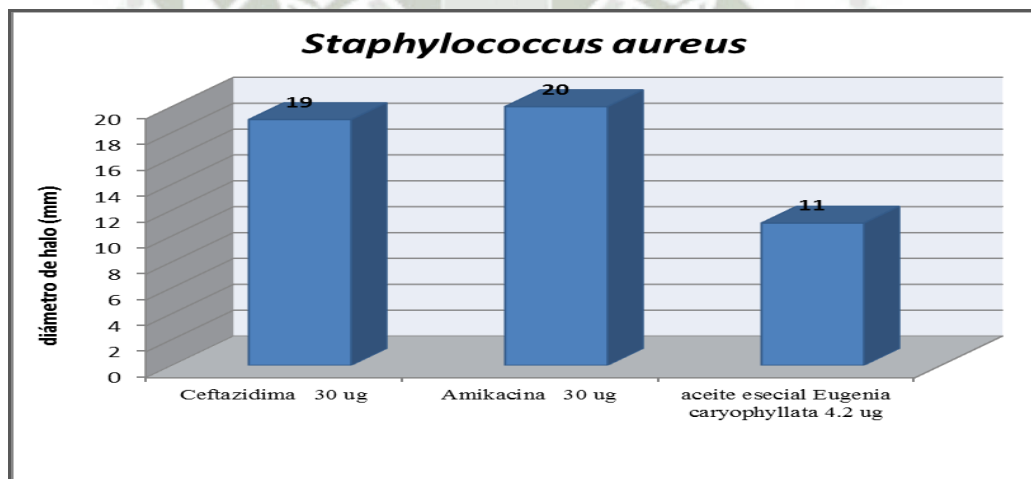


Grafico 6

Halos de inhibición del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor), Ceftazidima 30 ug, Amikacina 30 ug para la bacteria *Staphylococcus aureus*

En la investigación realizada por C. Luciana de Souza Prestes (43), los aceites esenciales de hojas de guayabo, presento actividad bactericida frente a *E. coli*, en la concentración de 2 ug, por lo tanto podemos deducir que el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) presenta una actividad bactericida similar frente a *E. coli* a una concentración de 4.2 ug, resultados obtenidos semejantes a la de este trabajo.

De acuerdo a las pruebas realizadas el Grafico 7 nos ilustra que el aceite esencial *Eugenia caryophyllata* a una concentración de 4.2 ug se obtuvo un halo de 13.5 mm siendo este menor a comparación con la Anfotericina B que tiene un halo de inhibición de 19 mm, siendo este más efectivo que el aceite esencial *Eugenia caryophyllata*, debido a su mayor afinidad hacia el ergosterol, un esterol encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica (38).

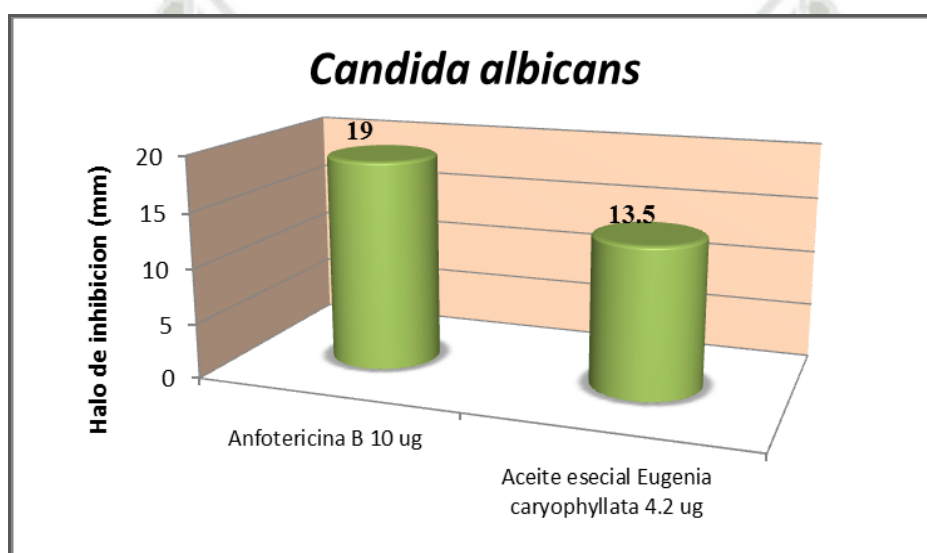


Grafico 7

Tamaño halos de inhibición (mm) del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* 4.2 ug y Anfotericina B 10 ug para *Candida albicans*

CONCLUSIONES

- 1) El Aceite esencial se obtuvo de los botones florales de de *Eugenia caryophyllata* (Clavo de olor) por el método de arrastre de vapor también llamado hidrodestilación, lográndose un rendimiento promedio del 4 %.
- 2) El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) contiene eugenol 92.53 %, cariofileno 1.79 % y fenol 5.68 %; estos compuestos fueron identificados por Cromatografía de Gases acoplado a un espectrómetro de masa (EM). Las características organolépticas que presentó el aceite esencial fueron un color amarillo, olor intenso y sabor picante. Las características fisicoquímicas fueron densidad 1,0463 g/ml, índice de refracción 1,5285.
- 3) El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) presentó una Concentración Inhibitoria Mínima de 5 ug/mL para las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y 10 ug/mL para el caso de *Candida albicans*; así mismo, presentó una Concentración Bactericida Mínima de 5 ug/mL en el caso de *Escherichia coli* y 20 ug/mL para *Staphylococcus aureus* y una Concentración Fungicida Mínima para *Candida albicans* de 10 ug/mL. Se determinó así que para *Escherichia coli* y *Candida albicans* tiene una actividad bactericida y fungicida mientras que para *Staphylococcus aureus* sólo presenta una actividad bacteriostático. Para *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* no tuvo ningún efecto antibacteriano.
- 4) El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) muestra halos de inhibición inferiores a los obtenidos al ser comparado con Anfotericina B sobre *Candida albicans* y con los discos de Ceftazidima sobre *Staphylococcus aureus* por lo que su efecto fue menor a dichos antibióticos. Sin embargo *Escherichia coli* muestra halos de inhibición superiores al ser comparado con los discos de Ceftazidima, demostrando un mayor efecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marie – Pierre Any y Francois Gallovin; Especias, Aromatizantes y Condimentos; Editorial Mundi Prensa; España 2007.
2. Fernando Cabieses; Cien siglos de Pan; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC); Editores AB; Lima, 1995.
3. Claudia Kuklinski; Farmacognosia; Ediciones Omega; Barcelona 2000.
4. J. Borboa Flores; O. Rueda Puente y otros; Revista Tropical and Subtropical agroecosistemas; Volumen 12, número 3; Universidad Autónoma Yucantan – México; Septiembre a diciembre, 2010.
5. Maria Arteta Beltrán; Etnobotánica de plantas vasculares en el centro poblado Llachon, distrito Copadica, departamento Puno; 2008.
6. Manuel Francisco Ortuño Sánchez; Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes; Primera Edición; Editorial Aiyara; España 2006.
7. Jesus Pala Paúl; Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género Eryngium en la Península Ibérica; Madrid 2002.
8. Alejandro Martínez M.; Aceites Esenciales; Universidad de Antioquia; Medellín; Febrero 2003.
9. Brawermam J. B. S.; Introducción a la bioquímica de los alimentos; Ediciones Omega S.A.; Barcelona, 1967.
10. Stashenko, E. En Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica; Universidad Industrial de Stander; Escuela de Química; Febrero 1996.
11. P. Gonzales; Utilización terapéutica de nuestras plantas medicinales; Capítulo VI; Universidad de la Salle, Bogotá 1984.
12. Jean; Bruneton; Elementos de fitoquímica y farmacognosia; Editorial Acribia; Zaragoza 1991.

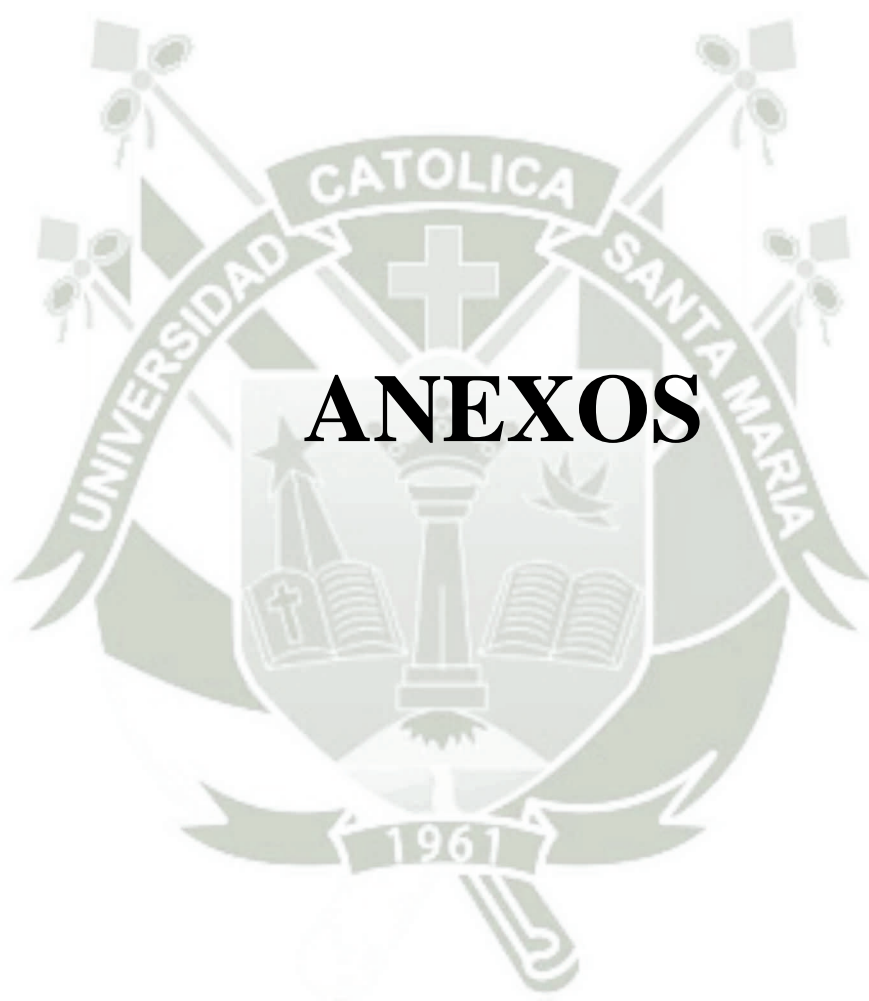
13. Juan, Llorens Molina; Obtención de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (equipo clavenger); Universidad Politécnica de Valencia, 2009.
14. Francisco, Sánchez Castellano; Extracción de aceites esenciales. Experiencia Colombiana; Colombia – Bogotá D.C. 2006.
15. <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias químicas y farmacéuticas/apbot-farm 2C/montesm02/20.html>.
16. Ernest Guenther, The Essential Oils Nostrand Company INC. New York, 1952.
17. Fernando Muñoz; Plantas Medicinales y Aromáticas; Estudio, Cultivo y procesamiento; 2da edición; Editorial Mundi Prensa; Madrid, 1987.
18. Arnoldo Bandoni; Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica; Argentina; Editorial Universidad Nacional de la Plata 2000.
19. Antoni S. Raymundo; Clínica de enfermedades infecciosas; Facultad de Medicina de la UNT, Tucumán –Argentina; 2005.
20. C. Cabrera, R. Gómez, Zúñiga; La resistencia de bacterias y antibióticos, asépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación; Colombia Médica; Vol. 38; 2007.
21. D. Zekaria; Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos; Laboratorios Calier; 2007.
22. Jawetz, Melnick y Adelberg; Microbiología Médica; Manual Moderno S.A; 19va. Edición; México D.F; 2008.
23. Michael Pelczar; Microbiología; Editorial Mc. Graw – will, México; 1992.
24. Lloyd H. Smith, Fames B. Wyngoarden y A.H. Samy; Microbiología clínica; Editorial Médica Panamericana; Buenos Aires – Argentina.
25. Raquel Granados Pérez, Microbiología; Editorial Thomson; España; 2006.
26. <http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/03-Medicas/M-040.pdf>.

27. José Liébana Urega; Microbiología Oral; Editorial Interamericana Mc Graw – will; Madrid 1995.
28. Jacuetz, Melnick y Albelberg; Microbiología Médica; 15ª.edición; Manual Moderno; México D.F. 1995.
29. A. Pumarola, A. Rodríguez, J.A. García, G. Pierola; Microbiología y Parasitología Médica; 2ª. Edición, Editorial Masson. S.A.; Barcelona. 1987.
30. Katia Abarca, Patricia García y Pablo A. Vial; Microbiología Clínica; 1ª edición; Ediciones Universidad Católica de Chile; Santiago de Chile, 2001.
31. Patrick Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller; Microbiología Médica; 5ª edición; Editorial Elsevier; España 2008.
32. Catherine A. Ingraha; Introducción a la microbiología; Editorial Reveté; Vol. II; Barcelona, 1998.
33. William Walter, Richard Mc. Kenneth Tample; Introducción a la microbiología; 1ª edición; Editorial Continental S.A.; México, 1980.
34. Abram Braude; Microbiología Clínica; Editorial Panamericana; Vol. II, Buenos Aires.
35. José Ángel García, Juan J. Picazo; Microbiología Médica General; Editorial Harcourt; 1ra. Impresión; España 1998.
36. R. Arenas; Microbiología Médica; Editorial Interamericana Mc Graw – will; México, 1993.
37. Juan C. Alvarado; Antibióticos y Quimioterápicos; AMP ediciones; 2º edición; Perú, 2006.
38. Marco Gonzales, William Lopera y Álvaro Arango; Manual de Terapéutica; Corporación para investigaciones Biológicas; Medellín – Colombia, 2006.
39. Gutierrez A., Del Rio, J.C., Gonzalez-Villa, F.J. y Martín, F. "Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography". Journal of chromatography 1998.
40. Jesús Ricardo Salazar Rosas; Instituto Politécnico Nacional; E.I.S.Q.I.E. Química y Catálisis del Petróleo

41. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf
42. Mario Carhuapoma Y, Sofía López, Mirtha Roque; “Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Mintostachys mollis* Griseb “RUYAQ muña”; Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM;2009.
43. C. Luciana de Souza Prestes, Luiz Filipe, Damé Schuch, otros; “Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá” Universidad Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Brasil; 2011
44. World Health Organization-antimicrobial Resistance (2002). Fact sheet N°194. Disponible en: [ww.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/print.html)
45. <http://www.lashierbasmedicinales.com/clavo-de-olor-propiedades-y-beneficios/>
46. M.Hakki Alma, Murat Ertas, Siegfried Nitz y Hubert Kallmannsbergerf.2007.Composicion quimica y contenido del aceite esencial desde el brote de Clavo Turco cultivada (*Syzygium aromaticum*)
47. Juliana Moura Mendes, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Felipe de Oliveira Pereira, Janiere Pereira de Sousa, Vinicius Nogueira Trajano y Edeltrudes de Oliveira Lima.2012.Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos.
48. L. Hernandez Ochoa, A. Gonzales Gonzales, N. Gutierrez Mendez, L.N. Muñoz Castellanos y A. Quintero Ramos . Mexico 2011.Estudios de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especies como agentes antimicrobianos.
49. Martha I.Ardila Q., Andres F. Vegas A., Jorge E. Perez C. y Luis F. Mejia G. Colombia 2009. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*.
50. <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/14agquimicos.htm>

51. Mariana Lizeth Orozco Morales, Andrea Gabriela Ochoa Ruiz y Alejandro Nuño Ayala, Unima Soluciones Naturales SAPI de CV, Departamento de Investigación y Desarrollo. Desarrollo y evaluación de microemulsiones de aceites esenciales de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), clavo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*) y de una mezcla de extractos cítricos (*Citrus paradisi*, *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata* y *Citrus sinensis*) como antimicrobianos.





ANEXO 1



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

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



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA18J12.000621

Nombre del Cliente	: NELLY HUALLPA/VIRGINIA MAMANI
Dirección del Cliente	: ASOC. SAN MARTIN DE PORRES MZNA 4 LOTE 6 - CAYMA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR
Envase	: Frasco Gotero de Vidrio ámbar
Peso de Muestra	: 15 mL
Fecha de Recepción	: 18/10/2012
Fecha de Emisión de informe	: 26/10/2012
Paginas	: Pagina 1 de 3

I. ANALISIS FISICO QUIMICO

ANALISIS	RESULTADO
Determinación cualitativa de metabolitos secundarios Cromatografía Gaseosa con detección de masas	<ul style="list-style-type: none"> • Eugenol • Caryophyllene • Phenol,2-methoxy-4-(2-propenyl)-,acetate
Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%) Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)	<ul style="list-style-type: none"> • Eugenol (95,97%) • Caryophyllene (1,01%) • Phenol,2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate (3,01%)



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

ANEXO 2



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

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



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA18J12.000621A

Nombre del Cliente	: NELLY HUALLPA/VIRGINIA MAMANI
Dirección del Cliente	: ASOC. SAN MARTIN DE PORRES MZNA 4 LOTE 6 - CAYMA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR
Envase	: Frasco Gotero de Vidrio ámbar
Peso de Muestra	: 15 mL
Fecha de Recepción	: 18/10/2012
Fecha de Emisión de informe	: 26/10/2012
Páginas	: Pagina 1 de 1

I. ANALISIS ORGANOLEPTICO

ANALISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN ASPECTO, COLOR, OLOR, SABOR Y ASPECTO (sensorial)	Líquido de color amarillo, olor intenso, de sabor picante e intenso y olor sui-géneris, limpio libre de partículas extrañas

II. ANALISIS FISICOQUIMICO

ANALISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE ACIDEZ LIBRE (% ACIDO OLEICO) NTP 209.005:1968 ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES. Método para la determinación de la acidez libre	6,06
DETERMINACION DE INDICE DE REFRACCION, NTP 209.121:1975, ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES. Método de determinación del índice de refracción	1,5285
DETERMINACION DE INDICE DE SAPONIFICACION NTP 209.058:1980, ACEITES Y GRASAS COMESTIBLES. Método de determinación del índice de saponificación	15,08
DETERMINACION DE DENSIDAD (g/mL a 20 °C) Metodo gravimetrico del picnómetro	1,0463

Q.F. Juan Ramirez Orellana
 Q.F.A. 052
 DIRECTOR TÉCNICO LECC



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

ANEXO 3



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



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



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA18J12.000621

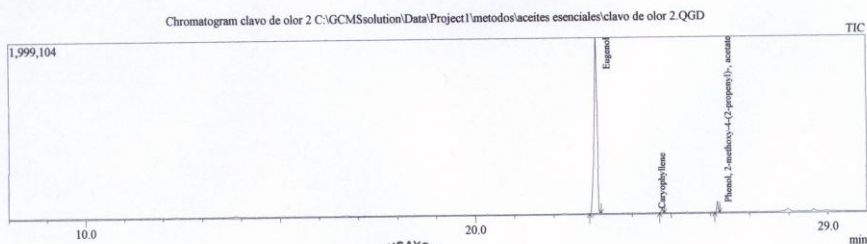
Nombre del Cliente	: NELLY HUALLPA/VIRGINIA MAMANI
Dirección del Cliente	: ASOC. SAN MARTIN DE PORRES MZNA 4 LOTE 6 - CAYMA
Condición del Muestreo	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR
Envase	: Frasco Gotero de Vidrio ámbar
Peso de Muestra	: 15 mL
Fecha de Recepción	: 18/10/2012
Fecha de Emisión de informe	: 26/10/2012
Páginas	: Pagina 2 de 3

I. ANEXO

CROMATOGRAMA

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 25/10/2012 02:41:09 p.m.
 Sample Type : Standard
 Level # : 1
 Sample Name : clavo de olor 2
 Sample ID : clavo de olor 2
 IS Amount : [1]-1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1
 Injection Volume : 2.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\metodos\aceites esenciales\clavo de olor 2.QGD
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\metodos\aceites esenciales\clavo de olor 2.QGD
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\metodos\aceites esenciales\cato ok.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\metodos\aceites esenciales\cato ok.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\30092011 28-09-2012.qgt
 [Comment]
 25/10/12
 Modified by : Admin
 Modified : 25/10/2012 03:18:34 p.m.



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

ANEXO 4



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



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



INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA18J12.000621

Nombre del Cliente	: NELLY HUALLPAVIRGINIA MAMANI
Dirección del Cliente	: ASOC. SAN MARTIN DE PORRES MZNA 4 LOTE 6 - CAYMA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR
Envase	: Frasco Gotero de Vidrio ámbar
Peso de Muestra	: 15 mL
Fecha de Recepción	: 18/10/2012
Fecha de Emisión de informe	: 26/10/2012
Paginas	: Pagina 3 de 3

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Peak Report TIC			A/H	Mark	Name
					Area%	Height	Height%			
1	23.104	22.910	23.205	10492845	95.97	1984942	92.53	5.29		Eugenol
2	24.761	24.700	24.825	110843	1.01	38464	1.79	2.88		Caryophyllene
3	26.183	26.110	26.245	329265	3.01	121875	5.68	2.70		Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate
				10932953	100.00	2145281	100.00			

Q.F. Juan Ramirez Orellana
C.F.A. 052
DIRECTOR TECNICO LECC



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

ANEXO 5

Tabla 1

Antibióticos y Diámetros Críticos para *Pseudomonas aeruginosa*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
CEFALOSPORINAS				
Ceftazidima	30 µg	ε 14	15-17	≥18
Cefepime	30 µg	ε 14	15-17	≥18
B LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Cefoperazona/sulbactam*	75 µg/30 µg	ε 15	16-20	≥21
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	ε13	14-15	≥16
Meropenem	10 µg	ε13	14-15	≥16
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	ε 15	16-21	≥22
AMINOGLUCOSIDO				
Gentamicina	10 µg	ε 12	13-14	≥15
Amikacina	30 µg	ε 14	15-16	≥17
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	ε 15	16-20	≥21
Norfloxacina	10 µg	ε 12	13-16	≥17
Ofloxacina	5 µg	ε12	13-15	≥16

* Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001

Tabla 2

Antibióticos y Diámetros Críticos para *Streptococcus spp* (excepto *Neumococo*)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina (beta hemolíticos)	10 µg	-	-	≥24
Penicilina	10 unidades	-	-	≥24
CEFALOSPORINAS				
Cefotaxima (beta hemolíticos)30 µg	30 µg	-	-	≥24
Cefotaxima (viridans)	30 µg	ε 25	26-27	≥28
Ceftriaxona (beta hemolíticos)	30 µg	-	-	≥ 24
Ceftriaxona (viridans)	30 µg	ε24	25-26	≥27
Cefepime (beta hemolíticos)	30 µg	-	-	≥24
Cefepime (viridans)	30 µg	-	22-23	≥24
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	≥17
Teicoplanina*	30 µg	-	-	≥17
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	ε 15	16-20	≥21
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	ε 15	16-18	≥19
QUINOLONAS				
Levofloxacina	5 µg	ε13	14-16	≥17
Ofloxacina	5 µg	ε 12	13-15	≥16
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	ε 17	18-20	≥21

* Concentraciones críticas adaptadas del CFA – SFM 2000 – 2001.

ANEXO 6

Tabla 3

Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	ε 13	14-16	≥17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30 µg	ε 14	15-17	≥18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	ε 14	15-22	≥23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	ε 14	15-17	≥18
Cefoxitina	30 µg	ε 14	15-17	≥18
Cefotaxima	30 µg	ε 14	15-22	≥23
Ceftriaxona	30 µg	ε 13	14-20	≥21
Ceftazidima	30 µg	ε14	15-17	≥18
Cefixima	5 µg	ε 15	16-18	≥19
Cefpirome *	30 µg	ε 14	15-17	≥18
Cefepime	30 µg	ε 14	15-17	≥18
B LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	ε 11	12-14	≥15
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	ε 13	14-17	≥18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	ε 15	16-20	≥21
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	ε 15	16-21	≥22
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	ε 13	14-15	≥16
Meropenem	10 µg	ε 13	14-15	≥16
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	ε 12	13-14	≥15
Amikacina	30 µg	ε 14	15-16	≥17
QUINOLONAS				
Acido nalidixico	30 µg	ε 13	14-18	≥19
Norfloxacin	10 µg	ε 12	13-16	≥17
Ciprofloxacina	5 µg	ε 15	16-20	≥21
Ofloxacin	5 µg	ε 12	13-15	≥16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	ε 14	15-18	≥19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	ε 12	13-17	≥18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	ε 10	11-15	≥16

* Diámetros críticos adaptados del CFA – SFM, 2000 – 2001.

+ Adaptado a partir de los diámetros críticos de la Cefoperazona según el NCCLS 2001

ANEXO 7

Tabla 4

Criterios de interpretación basados en el método de Bauer-Kirb

Antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro (mm) de la zona de inhibición		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina	30 µg	14 o menos	15-16	17 o más
Ampicilina en pruebas con microorganismos gramnegativos y enterococos	10 µg	11 o menos	12-13	14 o más
Ampicilina ¹ en pruebas con estafilococos y microorganismos sensibles a la penicilina	10 µg	20 o menos	21-28	29 o más
Azlocilina	75 µg	17 o menos	-	18 o más
Carbenicilina ² en pruebas con especies de <i>Proteus</i> y con <i>E. coli</i>	100 µg	17 o menos	18-22	23 o más
Carbenicilina ² en pruebas con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 µg	13 o menos	14-16	18 o más
Cefaloridina cuando se registra sensibilidad a la cefaloridina, cefaclor, cefradoxil, cefalotina, cefalexina, cefapirina, cefazolina, cefacetilo y cefradina	30 U	14 o menos ⁴	15-17	18 o más ³
Cefazolina	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más
Ceftriaxone	30 µg	13 o menos	14-20	21 o más
Cefotaxima	30 µg	14 o menos	15-22	23 o más
Cloranfenicol	30 µg	12 o menos	13-17	18 o más
Colimicina	10 µg	8 o menos	9-10	11 o más ⁴
Eritromicina	15 U	13 o menos	14-17	18 o más
Estreptomicina	10 U	11 o menos	12-14	15 o más
Gentamicina cuando se registra sensibilidad a la gentamicina y a la sisomicina	10 U	12 o menos	13-14	15 o más
Kanamicina	30 U	13 o menos	14-17	18 o más
Meticilina ⁵	5 µg	9 o menos	10-13	14 o más
Novobiocina	30 U	17 o menos	18-21	22 o más ⁶
Oxacilina	1 µg	10 o menos	11-12	13 o más
Penicilina en pruebas con estafilococos	6 µg	10 o menos	11-28	29 o más
Penicilina en pruebas con otros microorganismos	6 µg	11 o menos	12-21	22 o más
Tetraciclina ⁷	30 U	14 o menos	15-18	19 o más
Vancomicina	30 U	9 o menos	10-11	12 o más
Cefuroxima	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más
Ceftazidima	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más
Ciprofloxacina	5 µg	15 o menos	16-20	21 o más
Sulfametoxazol-trimetoprim	23,75 µg/1,25 µg	10 o menos	11-15	16 o más

Tomado de: Discos para antibiograma. EPB Carlos J Finlay.

ANEXO 8

Tabla 5

Criterios de interpretación para antimicóticos

ANTIMICOTICO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
Fluconazol	25 ug	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Anfotericina B	10 ug	≤ 10	11 – 14	≥ 15
Itraconazol	8 ug	≤ 10	11 – 14	≥ 15
ketoconazol	15 ug	≤ 20	21 – 27	≥ 28

ANEXO 9

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllata*



Botones florales de Clavo de olor *Eugenia Caryophyllata*

Se pesa 200 gr de los botones de Clavo de olor, se vierte al balón y se agrega agua hasta la mitad del balón



Se lleva la muestra y se arma el equipo de Clevenger y se cubre con papel platino todo el equipo y se pone a ebullición a una temperatura de 150°C

ANEXO 10

Se pone a ebullición a una temperatura de 150°C



Aceite esencial de Clavo de olor
obtenido por decantación a una
concentración del 4 %

ANEXO 11

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Eugenia caryophyllata*

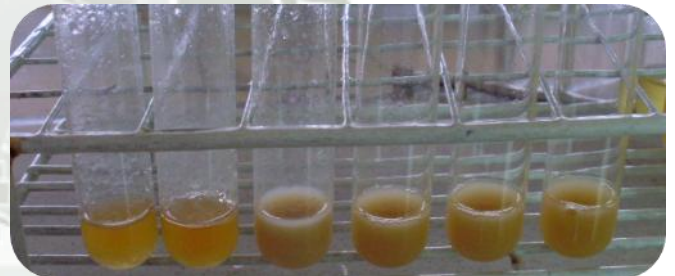


Cultivo: *Staphylococcus aureus*
Medio: Caldo peptona + Aceite
esencial de clavo de olor

Observamos crecimiento bacteriano del 1er al 7mo tubo (de izquierda a derecha), en los 7 tubos visualizamos turbidez lo cual nos indica que hay crecimiento bacteriano.

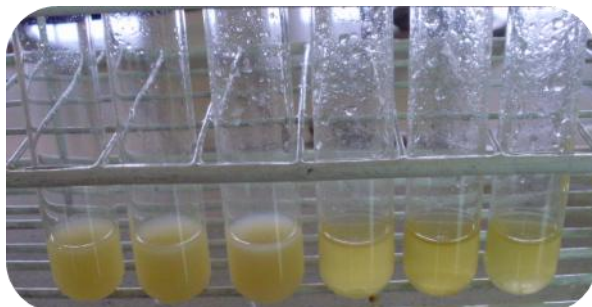
Cultivo: *Candida albicans*
Medio: Caldo peptona + Aceite
esencial de *Eugenia
caryophyllata*.

Observamos que no hubo
crecimiento en los 2 primeros
tubos en ellos visualizamos que
no presenta turbidez.

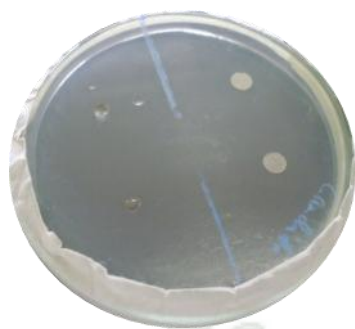


Cultivo: *Escherichia coli*
Medio: Caldo peptona + Aceite
esencial de *Eugenia
caryophyllata*.

Se observa que hubo crecimiento
en los 3 primeros tubos, estos
presentan una turbidez pero los 3
últimos tubos no se observa
ninguna turbidez



ANEXO 12

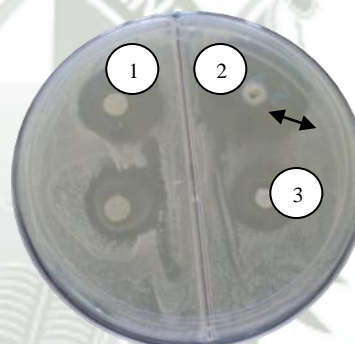


Cultivo: *Candida albicans*
Medio de cultivo: Agar Sabouraud

En la placa observamos el crecimiento de halos mediante los método de hoyo en placa y con los disco de aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*

Inhibición de *Staphylococcus aureus* según discos de sensibilidad.
Medio de cultivo: Agar Mueller Hinton

Se observa crecimiento del halo de 19 mm para Cefotaxidima(1), 20mm de diámetro para Amikacina(2) y 11mm de diámetro para aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*.



ANEXO 12

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SABOURAUD

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo). En el medio de cultivo, la peptona, la tripteína y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante.

Fórmula (en gramos por litro)

Peptona	5.00gr.
Tripteína	5.00gr.
Glucosa	40.00gr.
Cloranfenicol	0.05gr.
Agar	5.00gr.

pH final: 5.6 ± 0.2

Preparación

- Suspender 65 g del polvo en 1 litro de agua purificada.
- Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar.
- Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver completamente.
- Distribuir en tubos o en otros recipientes apropiados.
- Esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.
- Colocar los tubos en posición inclinada para solidificar el medio de cultivo (pico de flauta). También puede distribuirse en placas de Petri estériles.

Nota: mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor aumenta la hidrólisis de los componentes.

ANEXO 13

CALDO PEPTONA

Fundamento

La peptona, el extracto de carne y la lecitina de soya, aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Este medio de cultivo, tiene la capacidad para neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soya, que además de ser una fuente nutritiva, neutraliza compuestos de amonio cuaternario. El agregado de polisorbato 80 (Tween 80), es útil para neutralizar compuestos tales como fenol, formalina, hexaclorofeno, y la combinación de la lecitina con el Tween, permiten neutralizar etanol.

Fórmula (en gramos por litro)

Peptona de carne	10.0gr.
Extracto de carne Z	5.0gr.
Lecitina de soya	0.7gr.
Cloruro de sodio	5.0gr.
pH final :	7.0 ± 0.2

Preparación

- Suspender 20,7 g del polvo en 1 litro de agua purificada.
- Agregar 5 ml de polisorbato 80 (Tween 80).
- Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición para lograr disolución completa.
- Distribuir en recipientes adecuados.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

ANEXO 14

AGAR BASE SANGRE

Fundamento

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. El agregado de 5-10 % sangre ovina defibrinada estéril (Britasheep) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

FÓRMULA

Infusión de músculo de corazón	375.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Nota: la infusión de músculo de corazón es equivalente a 10 g de polvo.

Preparación

- Suspender 40 g del polvo en un litro de agua destilada.
- Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea.
- Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto.
- Esterilizar 20 minutos a 121°C.
- Enfriar a 45-50°C agregar sangre defibrinada al 5%.
- Homogeneizar y distribuir en placas.

Preparación de la placa de Agar Sangre: añadir en forma aséptica un 5% de sangre estéril defibrinada a temperatura ambiente, el agar debe estar a 45°C.

ANEXO 15

AGAR MUELLER HINTON

Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fórmula (en gramos por litro)

Infusión de carne	300.0 g.
Peptona ácida de caseína	17.5 g.
Almidón	1.5 g.
Agar	15.0 g.

pH FINAL: 7.3 ± 0.1

Nota: la infusión de carne es equivalente a 3 g de polvo.

Preparación

- Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada.
- Dejar embeber de 10 a 15 minutos.
- Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar a $45^{\circ}\text{--}50^{\circ}\text{C}$ y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).