

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DEL
EXTRACTO Y EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Chenopodium
Ambrosioides* L. “PAICO” EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus*,
Staphylococcus epidermidis, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida
albicans*”**

**Tesis presentada por las bachilleres en
Farmacia y Bioquímica:**

Denysel Lizet Chambi Quispe

Karen Paola Pacheco Málaga

**Para obtener el Título Profesional de
Químico-Farmacéutico**

Asesor:

QF. Fernando Torres Vela

AREQUIPA – PERÚ

2017

DEDICATORIAS

A Dios, quién me dió la oportunidad de iniciar mis estudios en la Universidad y poder alcanzar mis objetivos.

A mis padres Dina y Mario, por los consejos, paciencia y superación que impartieron en mí, y por todo el esfuerzo que dieron en mi formación como persona.

A mi esposo Walter, quién me brinda su amor, comprensión y apoyo, gracias por creer en mí, y ser la persona que me motiva en la búsqueda constante de superación.

A mi hijo Nicolas Gonzalo, por ser la razón que me impulsa a esforzarme más, a seguir mejorando en mi profesión y mi calidad de persona, para que vea en mí un ejemplo a seguir, a mi hermano Sidmar, para que le sirva de estímulo en la búsqueda de superación.

Denysel Lizet Chambi Quispe

A Dios, por su amor, por darme un día más de vida y permitirme alcanzar mis metas y anhelos.

A mis ángeles, que siempre son la inspiración para vencer los obstáculos, porque siempre están presente, aunque ahora estan lejos y porque nunca olvide sus palabras de aliento y todo el amor que me dieron en vida.

A mis padres, por su amor, su ejemplo, consejos y valores, por motivarme a seguir adelante y por todo el esfuerzo y sacrificio que permitieron que hoy culmine una gran etapa.

A mi familia, por ser parte de mi vida, por su amor, por su apoyo y por siempre estar presente en todos los momentos importantes.

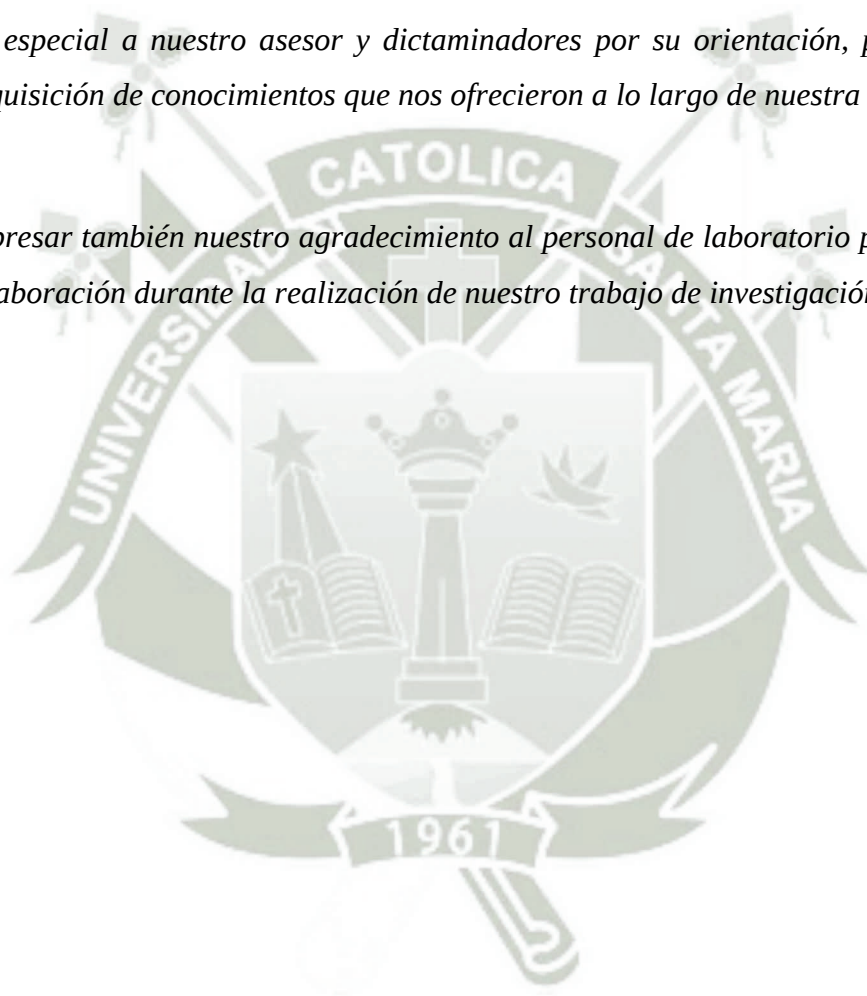
Karen Paola Pacheco Málaga

AGRADECIMIENTOS

Brindarles nuestra mayor gratitud a todos nuestros docentes del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, por el tiempo brindado y todas las enseñanzas y consejos aportados a nuestra formación profesional y personal durante toda nuestra carrera universitaria.

En especial a nuestro asesor y dictaminadores por su orientación, paciencia y la adquisición de conocimientos que nos ofrecieron a lo largo de nuestra tesis.

Expresar también nuestro agradecimiento al personal de laboratorio por su apoyo y colaboración durante la realización de nuestro trabajo de investigación.



ÍNDICE

	Págs.
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN	XIX
OBJETIVOS	1
HIPÓTESIS	2
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1. <i>CHENOPODIUM AMBROSIoidES</i> L. “PAICO”	3
1.1.1. Nombre científico.....	3
1.1.2. Nombres vulgares.....	3
1.1.3. Clasificación taxonómica.....	3
1.1.4. Aspectos botánicos	4
1.1.5. Hábitat	4
1.1.6. Distribución geográfica	4
1.1.7. Droga	5
1.1.8. Composición química.....	5
1.1.9. Usos medicinales.....	8
1.1.10. Dosificación	8
1.1.11. Otros usos.....	8
1.2. MICROBIOLOGÍA.....	8
1.2.1. Genero <i>Staphylococcus</i>	8
1.2.1.1 Concepto y caracteres del género <i>Staphylococcus</i>	8

1.2.1.2	Clasificación, especies más importantes.....	9
1.2.1.3	Acción patógena e interés clínico	10
1.2.1.4	Aislamiento	12
1.2.2.	Género <i>Escherichia</i>	12
1.2.2.1	Concepto y caracteres del género <i>Escherichia</i>	12
1.2.2.2	Clasificación, especies más importantes	13
1.2.2.3	Acción patógena e interés clínico	13
1.2.2.4	Aislamiento	14
1.2.3.	Género <i>Pseudomona</i>	14
1.2.3.1	Concepto y caracteres del género <i>Pseudomona</i>	14
1.2.3.2	Clasificación especies más importantes	15
1.2.3.3	Acción patógena e interés clínico	16
1.2.3.4	Aislamiento	17
1.2.4.	Género <i>Cándida</i>	18
1.2.4.1	Concepto y caracteres del género <i>Cándida</i>	18
1.2.4.2	Acción patógena e interés clínico.....	19
1.2.4.3	Aislamiento	20
1.3.	EXTRACTOS VEGETALES	20
1.3.1.	Clasificación de extractos según su consistencia	20
1.3.1.1	Extractos Blandos.....	20
1.3.1.2	Extractos Fluídos.....	21
1.3.1.3	Extractos secos	21
1.3.1.4	Crioextractos	21
1.3.2	Procesos de extracción	21
1.4.	ACEITES ESENCIALES	22
1.4.1.	Concepto de aceites esenciales.....	22
1.4.1.1	Compoción de los aceites esenciales	23
1.4.1.1.1	No terpenoides.	23
1.4.1.1.2	Terpenoides.	23
1.4.2.	Método y técnica de extracción de aceite esencial.....	25
1.4.2.1	Métodos oficinales	25
1.4.2.1.1	Método destilación por arrastre a vapor:.....	25
1.4.2.1.2	Método mecánico (expresión).....	26

CAPÍTULO II	27
MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. UBICACION	27
2.2. MATERIALES	27
2.2.1. Material biológico	27
2.2.2. Material de laboratorio.....	28
2.2.2.1 Instrumental de vidrio	28
2.2.2.2 Equipos y aparatos	29
2.2.2.3 Otros accesorios	29
2.2.2.4 Reactivos	30
2.2.2.5 Medios de Cultivo	31
2.3. MÉTODOS	32
2.3.1. Recolección y selección del material biológico vegetal.	32
2.3.2. Obtención del extracto etéreo	32
2.3.2.1 Estabilización y desecación.....	32
2.3.2.2 Trituración.....	32
2.3.2.3 Proceso de obtención del extracto etéreo	33
2.3.2.3.1 Método	33
2.3.2.3.2 Fundamento.....	33
2.3.2.3.3 Procedimiento	33
2.3.2.4 Rendimiento del extracto etéreo.....	34
2.3.2.5 Características organolépticas del extracto etéreo.....	34
2.3.3. Obtención del aceite esencial.....	35
2.3.3.1 Proceso de obtención del aceite esencial.....	35
2.3.3.1.1 Método	35
2.3.3.1.2 Fundamento.....	35
2.3.3.1.3 Procedimiento	35
2.3.3.2 Rendimiento del aceite esencial.	36
2.3.3.3 Características organolépticas del aceite esencial	36
2.3.3.4 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial	37
2.3.3.4.1 Solubilidad	37

2.3.3.4.2	Índice de refracción.....	38
2.3.3.4.3	Densidad	39
2.3.3.4.4	Determinación del índice de acidez	40
2.3.4	Caracterización fitoquímica	41
2.3.4.1	Método.	41
2.3.4.2	Fundamento.....	41
2.3.4.3	Procedimiento cromatográfico.	41
2.3.4.4	Constante R _f (Ratio of front)	43
2.3.4.5	Cromatografía en capa fina del extracto etéreo.....	43
2.3.4.5.1	Identificación general.....	43
2.3.4.5.2	Identificación de sustancias terpénicas	43
2.3.4.5.3	Identificación de flavonoides	43
2.3.4.5.4	Identificación de taninos	44
2.3.4.5.5	Identificación de Alcaloides.....	45
2.3.4.6	Cromatografía en capa fina del aceite esencial	46
2.3.4.6.1	Identificación general.....	46
2.3.4.6.2	Identificación de sustancias terpénicas	46
2.3.5	Evaluación del efecto antimicrobiano	47
2.3.5.1	Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etéreo	47
2.3.5.1.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	47
2.3.5.1.1.1	Dilución en caldo	47
2.3.5.1.1.2	Preparación de la emulsión madre	47
2.3.5.1.1.3	Preparación del inóculo.....	47
2.3.5.1.1.4	Preparación de las diluciones	48
2.3.5.1.2	Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)	49
2.3.5.2	Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial.	50
2.3.5.2.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	50
2.3.5.2.1.1	Preparación de la emulsión madre	50
2.3.5.2.1.2	Preparación del inóculo.....	50

2.3.5.2.1.3 Preparación de las diluciones	51
2.3.5.2.2 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)	43
CAPÍTULO III.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS HOJAS DE CHENOPODIUM AMBROSIODES L. “PAICO”	53
3.2. EXTRACTO ETÉREO.....	53
3.2.1. Estabilización, desecación y trituración del material biológico vegetal	56
3.2.2. Proceso de obtención y concentración del extracto etéreo	56
3.2.3. Rendimiento extracto etéreo.....	56
3.2.4. Determinación organoléptica del extracto etéreo.....	56
3.3. ACEITE ESENCIAL	53
3.3.1. OBTENCION DEL ACEITE ESENCIAL.	57
3.3.2. Rendimiento del aceite esencial.....	57
3.3.3. Determinación organoléptica del aceite esencial	58
3.3.4. Evaluación fisicoquímica del aceite esencial	58
3.4. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA	61
3.4.1. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo	61
3.5.2. Cromatografía en capa fina del aceite esencial.....	65
3.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO	67
3.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides L.</i> para distintas cepas microbianas	69
3.5.2. Determinación de la concentración bactericida mínima CBM del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides L.</i> para distintas cepas microbianas	69
3.5.3. Frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	69
3.5.4. Frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	70

3.5.5 Frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i>	71
3.5.6. Frente a <i>Escherichia coli</i>	72
3.5.7. Frente a <i>Cándida albicans</i>	72
3.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL....	75
3.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides L.</i> para distintas cepas microbiológicas	76
3.6.2. Determinación de la concentración bactericida mínima CBM del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides L.</i> para distintas cepas microbiológicas	76
3.6.3. Frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	76
3.6.4. Frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	77
3.6.5. Frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i>	79
3.6.6. Frente a <i>Escherichia coli</i>	79
3.6.7. Frente a <i>Cándida albicans</i>	81
CONCLUSIONES	83
SUGERENCIAS.....	85
BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS.....	98

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Principales componentes del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	49
Tabla N° 2: Diluciones seriadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etéreo	49
Tabla N° 3: Diluciones seriadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial	52
Tabla N° 4: Rendimiento del método de extracción Soxhlet para la obtención del extracto etéreo	56
Tabla N° 5: Descripción organoléptica del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	56
Tabla N° 6: Rendimiento del método de extracción por arrastre de vapor de agua para la obtención del aceite esencial	58
Tabla N° 7: Descripción organoléptica del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	58
Tabla N° 8: Prueba de solubilidad del aceite esencial.....	59
Tabla N° 9: Evaluación fisicoquímica del aceite esencial	60
Tabla N° 10: CMI y CMB del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas bacterianas de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Tabla N° 11: CMI y CBM del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas bacterianas de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	70
Tabla N° 12: CMI y CMB del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	71
Tabla N° 13: CMI y CMB del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Escherichia coli</i>	72
Tabla N° 14: CMI y CMB del extracto etéreo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Cándida albicans</i>	73
Tabla N° 15: CMI y CMB del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Tabla N° 16: CMI y CMB del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	78

Tabla N° 17: CMI y CMB del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	79
Tabla N° 18: CMI y CMB del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Escherichia coli</i>	80
Tabla N° 19: CMI y CFM del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. frente a cepas hospitalarias de <i>Cándida albicans</i>	81



INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Plantación de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	4
Figura N° 2 . Rama de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	5
Figura N° 3. Estructuras químicas de los principales componentes del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L	7
Figura N° 4. Principales monoterpenos de los aceites esenciales.	24
Figura N° 5. Principales sesquiterpenos de los aceites esenciales.	24
Figura N° 6. Ramas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Paico).....	53
Figura N° 7. Hojas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Paico)	54
Figura N° 8. Destilación por método de Soxhlet.....	55
Figura N° 9. Concentración del extracto etéreo en equipo rotavapor.	55
Figura N° 10. Equipo artesanal de destilación por arrastre de vapor	57
Figura N° 11. Aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	59
Figura N° 12. Identificación general para el extracto etereo de Paico: CCF	61
Figura N°13. Identificación de sustancias terpénicas del extracto etéreo de Paico: CCF.....	64
Figura N°14. Identificación de sustancias terpénicas del extracto etéreo de Paico: CCF.....	63
Figura N°15. Identificación general de taninos para el extracto etéreo de Paico: CCF.....	64
Figura N° 16. Identificación general del aceite esencial de Paico: CCF.....	65
Figura N°17. Identificación de sustancias terpénicas del aceite esencial de Paico: CCF.....	64
Figura N°18. Identificación de sustancias terpénicas del aceite esencial de Paico: CCF.....	64

RESUMEN

La presente investigación es un estudio experimental, cuyo objetivo principal es la evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto y del aceite esencial de las hojas de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*; siendo analizadas 5 cepas de cada tipo microbiano, haciendo un total de 25 cepas, pertenecientes a hospitales de la ciudad de Arequipa.

Lo primero que se realizó fue la recolección de hojas, lo más frescas posible de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico”, ello con la finalidad de lograr buen rendimiento tanto de su extracto etéreo como del aceite esencial obtenido. Para la obtención del extracto etéreo se utilizó como método la extracción con Soxhlet, se realizó tres extracciones teniendo como rendimiento promedio $15.67\% \pm 1.12$; Por su parte la obtención del aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” se realizó por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, el rendimiento del aceite por cada 100 g de hoja fresca fue del $0.1\% \pm 0.015$.

Para el aceite esencial posteriormente se realizó un estudio para caracterizarlo fisicoquímicamente, se ensayó su solubilidad, siendo insoluble en agua y soluble en alcohol etílico, su densidad fué de 0.89954 g/mL, el índice de refracción fué de 1.4789 y el índice de acidez fué de 2.8 mg de KOH/g de aceite esencial. Este aceite esencial fué reservado y acondicionado adecuadamente para su posterior evaluación antimicrobiana.

Se realizó un análisis fitoquímico preliminar mediante el método de cromatografía en capa fina (CCF), se detectó en el extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” la presencia de sustancias terpénicas y taninos, siendo ausente para flavonoides y alcaloides. Por su parte mediante el mismo método de análisis en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” se observó la presencia de sustancias terpénicas.

Finalmente se procedió a la evaluación antimicrobiana para ello fué necesario la adquisición de cepas patógenas, estas tuvieron procedencia de hospitales de la ciudad, las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans* fueron obtenidas del Hospital Goyeneche de Arequipa, mientras que *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa* tuvieron como fuente el Hospital Honorio Delgado Espinoza de Arequipa, se consiguieron cinco cepas de cada microorganismo.

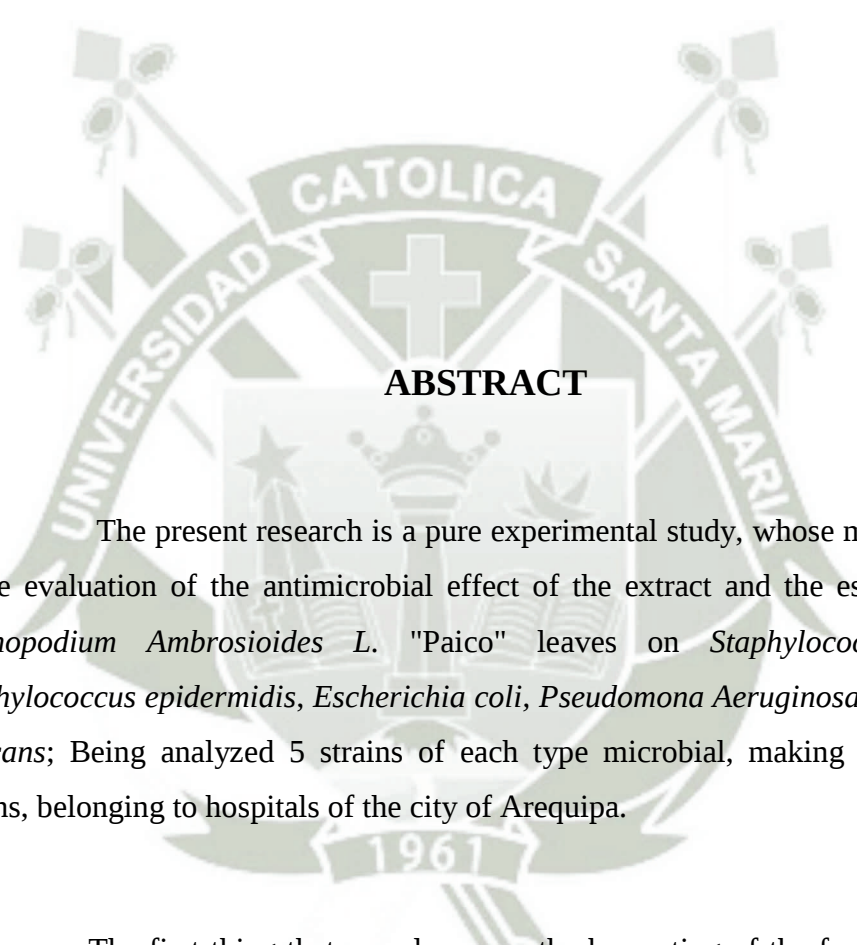
El extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” partió de una concentración inicial de 600 mg/mL mientras que el aceite esencial por su escaso rendimiento fué evaluado mediante el método de microdilución, a partir de una concentración de 80 µL/mL. Para ambos productos de extracción se realizó un cuadro inicial de 8 diluciones, ello con el afán de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), y a partir de esta la concentración bactericida mínima (CBM).

Los resultados finales de la CMI y CBM para el extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a las diferentes cepas microbianas fué de 150 mg/mL sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y de 75mg/mL para *Cándida albicans*, no observándose efecto alguno sobre *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Los valores para el aceite esencial fueron de 25 μ L/mL para *Staphylococcus aureus*, 20 μ L/mL para *Staphylococcus epidermidis*, 35 μ L/mL para *Escherichia coli* y 30 μ L/mL para *Cándida albicans*. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* no se obtuvo ningún efecto.

Palabras claves

Chenopodium ambrosioides L., extracto, aceite esencial, efecto antimicrobiano, Concentración mínima inhibitoria, Concentración bactericida mínima.





ABSTRACT

The present research is a pure experimental study, whose main objective is the evaluation of the antimicrobial effect of the extract and the essential oil of *Chenopodium Ambrosioides* L. "Paico" leaves on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona Aeruginosa* and *Cándida albicans*; Being analyzed 5 strains of each type microbial, making a total of 25 strains, belonging to hospitals of the city of Arequipa.

The first thing that was done was the harvesting of the freshest possible leaves of *Chenopodium ambrosioides* L "Paico", in order to achieve good yield of both its ethereal extract and the essential oil obtained. To obtain the ethereal extract was used as extraction method, the distillation with Soxhlet equipment, three extractions were performed with an average yield of $15.67\% \pm 1.12$. *Chenopodium Ambrosioides* L. "Paico" essential oil was obtained by the steam distillation method, the yield of oil per 100 g of fresh leaf was $0.1\% \pm 0.015$.

For the essential oil, then a study was carried out to characterize it physicochemically, its solubility was tested, being insoluble in water and soluble in ethyl alcohol, its density was 0.89954 g/mL, the refractive index was 1.4789 and the acidity index was 2.8 mg KOH/g of essential oil. This essential oil was reserved and adequately conditioned for its subsequent antimicrobial evaluation.

A preliminary phytochemical analysis using the thin layer chromatography (TLC) method was detected in the ethereal extract of *Chenopodium ambrosioides* L. "Paico" the presence of terpene substances, and tannins, being absent for flavonoids and alkaloids. On the other hand, by the same method of analysis in the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. "Paico" the presence of terpene substances was observed.

Finally, an antimicrobial evaluation was carried out. The acquisition of pathogenic strains from the hospitals, the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Cándida albicans* were from Goyeneche Hospital in Arequipa, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomona aeruginosa* were used as source. Hospital Honorio Delgado Espinoza of Arequipa, five strains of each microorganism were obtained.

Chenopodium ambrosioides L. "Paico" essential oil was evaluated by the microdilution method, starting at a concentration of 80 μ L/mL, the ethereal extract starting from an initial concentration of 600 mg/mL. For both extraction products, an initial table of 8 dilutions was made, with the aim of determining the minimum inhibitory concentration (MIC), and from this the minimum bactericidal concentration (MBC).

The final results of the MIC and MBC for the ethereal extract of *Chenopodium ambrosioides* L. "Paico" against different bacterial strains were 150 mg/mL for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and 75 mg/mL for *Cándida albicans*, with no effect some on *Escherichia coli* and *Pseudomona*

aeruginosa. The values for the essential oil were 25 $\mu\text{L/mL}$ for *Staphylococcus aureus*, 20 $\mu\text{L/mL}$ for *Staphylococcus epidermidis*, 35 $\mu\text{L/mL}$ for *Escherichia coli* and 30 $\mu\text{L/mL}$ for *Cándida albicans*. In the case of *Pseudomona aeruginosa*, no effect was obtained.

Key Words

Chenopodium ambrosioides L., extract, essential oil, antimicrobial effect, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.



INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen 250.000 a 500.000 especies vegetales, de las cuales se estima que al menos el 10% han sido estudiadas en sus aspectos químicos y propiedades biológicas, esta temática no es nueva, se había dejado en el olvido por un largo período de tiempo, y recientemente el interés ha sido renovado valorando la diversidad de estructuras químicas que poseen y en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. ⁽⁹⁶⁾

Esa búsqueda dió sus frutos en el campo de la antibioticoterapia y así surgieron medicamentos como las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y tetraciclinas por citar algunos, en estos casos la naturaleza proporcionó los núcleos químicos que motivaron la obtención de nuevos antibióticos. ⁽³¹⁾

Sin embargo en la actualidad según reportes de la OMS (Organización mundial de la salud) están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que se propagan a nivel mundial, poniendo en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, provocando el aumento de la discapacidad y muertes, además de la prolongación de enfermedades. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Convirtiéndose por tal motivo la resistencia bacteriana en un fenómeno creciente de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico, es por ello que se está tomando nuevamente la utilización de plantas como una alternativa frente a diferentes tipos de infecciones.

Por otra parte pese al protagonismo de la industria farmacéutica y sus productos la población aún recurre a tratamientos naturales para el alivio de sus dolencias, y muchas veces en lugar de optar por formas farmacéuticas tópicas con

agentes antibióticos para el tratamiento o la prevención de la infección de una herida, recurre a plantas medicinales que tienen la denominación de “curativa de heridas”.
(2,29)

En este sentido se utilizan las partes aéreas del “Paico” cuyo nombre científico es *Chenopodium ambrosioides* L. perteneciente a la familia Amaranthaceae, planta medicinal por excelencia y que sin embargo sobre su utilización a nivel antimicrobiano los estudios precedentes son relativamente escasos, razón por la cual mediante el presente plan de investigación se tiene como objetivo central evaluar la actividad antimicrobiana no solo del extracto sino también de su aceite esencial sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, otras Gram negativas como *Escherichia Coli*, *Pseudomona aeruginosa* y levaduras como *Cándida albicans*.

En otro orden también se pretende conocer aspectos sobre la composición fitoquímica cualitativa preliminar, aspecto importante para que mediante estudios posteriores se relacione la estructura química con la actividad farmacológica. Por ello queremos orientar los estudios realizados en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento y poner de manifiesto nuestros conocimientos adquiridos.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto y el aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Cándida albicans*.

Específicos

- ❖ Obtener un extracto y aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico”.
- ❖ Determinar el rendimiento del extracto etéreo y el aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico”.
- ❖ Describir las características fisicoquímicas que presenta el aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico”.
- ❖ Determinar cualitativamente los grupos de metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el extracto etéreo y el aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” luego del análisis mediante cromatografía en capa fina.
- ❖ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etéreo y del aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” frente a los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

HIPÓTESIS

Si en la medicina tradicional las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” son utilizadas para la curación de heridas es probable, que el extracto y/o el aceite esencial de esta droga vegetal presenten efecto antimicrobiano *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. *Chenopodium Ambrosioides* L. “PAICO”.

1.1.1.Nombre científico

Chenopodium ambrosioides L.

1.1.2.Nombres vulgares

- Añaspayqu
- Payqo
- Pazote
- Cashiva
- Amash
- Amasamas
- Amush
- Camatai
- Alpostes
- Hierba hormiguera
- Tè de espinó
- Tè de Nueva España
- Tè de Mejico
- Quenopodio ^(111,113)

1.1.3.Clasificación taxonómica

- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliosida*
- Subclase: *Cariophyllidae*
- Orden: *Cariophyllales*
- Familia: *Amaranthaceae*
- Género: *Chenopodium*
- Especie: *Chenopodium Ambrosioides* L. ^(anexo 4)

1.1.4. Aspectos botánicos

Es una hierba anual perenne y aromática, perteneciente a la familia Amaranthaceae, caracterizada por presentar una altura entre 40 cm a un metro; posee hojas pecioladas oblongo-lanceoladas, de 3 a 10 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho; tiene inflorescencia en forma de espigas con numerosas flores amarillentas o verdosas dispuestas en panícula piramidal, que hacen su aparición en el verano. El fruto es un utrículo de color verde y la semilla es alargada, de color negro brillante. (3,113)



Figura N° 1. Plantación de *Chenopodium ambrosioides* L.

Fuente: Elaboración propia

1.1.5. Hábitat

Crece espontáneamente en las cercanías de chacras, bordes de jardines, potreros, orillas de caminos, terraplenes, terrenos de cultivo y parques, hasta los 2760 msnm. (82)

1.1.6. Distribución geográfica

El género *Chenopodium* comprende unas 250 especies de amplia distribución en todo el mundo. El Paico es oriundo de México y de las zonas templadas de todo el continente americano. (82,119)

En nuestro país puede encontrarse en los departamentos de Tumbes, Piura, Amazonas, Lambayeque, La Libertad, Ancash, San Martín, Lima, Arequipa, Puno y Tacna.⁽⁸²⁾

1.1.7.Droga

Se utilizan los tallos, hojas y frutos. El olor de las hojas es desagradable.⁽³⁾

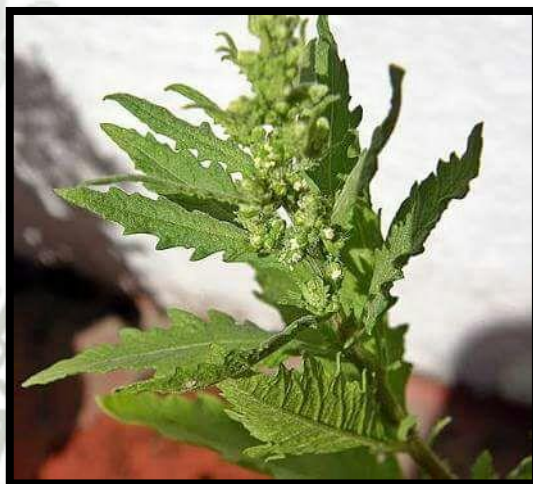


Figura N° 2. Rama de *Chenopodium ambrosioides* L.

Fuente: Elaboración propia

1.1.8.Composición química

En su composición química la planta *Chenopodium ambrosioides* L. presenta principalmente aceites esenciales entre los que se encuentran monoterpenos como el alcanfor, silvestreno, mirceno, entre otros; además de mucilagos, oxalato de Calcio, resinas, cenizas, cloruros, sulfatos, Magnesio, etc.⁽¹⁾

En diferentes partes de la planta se reportaron también los siguientes compuestos: ácido cítrico, ácido salicílico, ácido tartárico y ácido succínico (partes aéreas), quercetina, kaempferol y rhamnósido (frutos), heterósidos triterpénicos, ambrósidos, betaína(raíz).⁽³⁾

- Aceite esencial:

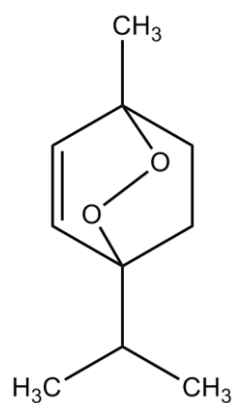
Los principales componentes en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. son productos de naturaleza monoterpénica (C₁₀) y sesquiterpénica (C₁₅), teniendo como uno de los principal componentes el monoterpene ascaridol, un peróxido terpénico en concentraciones de hasta un 70 % de la esencia.

Así también encontramos en el aceite monoterpenos como alcanfor, Cineol, p-Cimeno, alfa-pineno, beta-pineno, alfa-felandreno, alfa-terpineno, limoneno, cis-anetol, carvona, timol, carvacrol, linalol, mirceno, etc; componentes que pueden estar presentes o no dependiendo de la zona en la que fue recolectada la planta, la época del año entre otros factores .^(64,118)

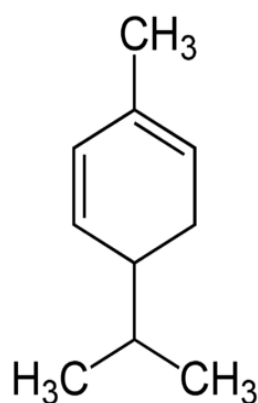
Tabla N° 1. Principales componentes del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.

No	COMPONENTES	PM	FORMULA
1	Cineol	134	C ₁₀ H ₁₀ O
2	p-cimeno	134	C ₁₀ H ₁₄
3	alfa-pineno	136	C ₁₀ H ₁₆
4	beta-pineno	136	C ₁₀ H ₁₆
5	alfa-felandreno	136	C ₁₀ H ₁₆
6	alfa-terpineno	136	C ₁₀ H ₁₆
7	Limoneno	136	C ₁₀ H ₁₆
8	cis-anetol	148	C ₁₀ H ₁₄ O
9	Carvona	150	C ₁₀ H ₁₄ O
10	Timol	150	C ₁₀ H ₁₄ O
11	Carvacrol	150	C ₁₀ H ₁₄ O
12	Linalol	154	C ₁₀ H ₁₈ O
13	Ascaridol	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂

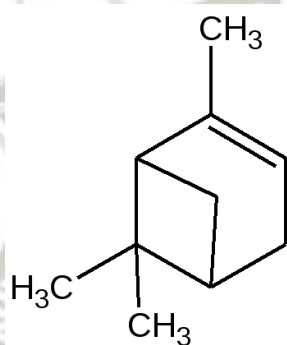
Fuente: León Romani⁽⁴¹⁾.



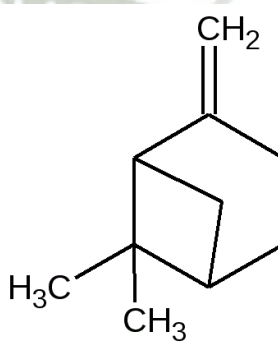
ascaridol



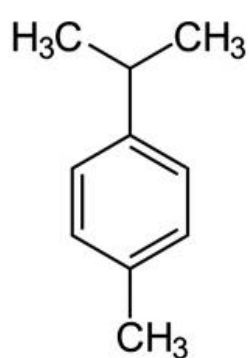
alfa -felandreno



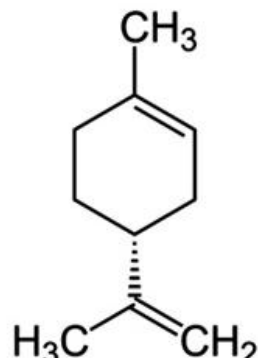
alfa - pineno



beta - pineno



p - cimeno



limoneno

Figura N° 3. Estructuras químicas de los principales componentes del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides L.*

1.1.9. Usos medicinales

Partes de la planta que se utilizan en infusión son las hojas y las flores. *Chenopodium Ambrosioides L.* “Paico” es utilizado generalmente como curativo de heridas, antihelmíntico, purgante, antiinflamatorio, diurético, analgésico, vermífugo, depurativo, antidisentérico, antiespasmódico, carminativo, digestivo, antirreumático, estomacal, antihemorrágico, hematuria. ^(82, 115, 119)

1.1.10. Dosificación

Infusión: En Francia consideran apto como antihelmíntico para uso humano la administración de una sola infusión de 100 g de hojas y flores en 1.5 litros de agua, dejando reposar 5 minutos, administrando 3 tazas diarias (450 mL) a los adultos y una taza (150 mL) dividida en tres tomas, para los niños parasitados mayores de tres años. A las 72 horas se recomienda administrar un purgante salino u oleoso para facilitar su eliminación. ⁽³⁾

1.1.11. Otros usos

El aceite también se emplea como componente de fragancias en cremas, detergentes, lociones, perfumes y jabones, con un máximo nivel permitido de 0.4%. ⁽³⁾

1.2. MICROBIOLOGÍA

1.2.1. Género *Staphylococcus*

1.2.1.1 Concepto y caracteres del género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* corresponde a cocos Grampositivos inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas y de tamaño entre 0.5 y 1µm. Se agrupan en forma de racimos, producen catalasa en su metabolismo y degradan por fermentación de azúcares. Crecen bien en medios generales y son bastante resistentes a muchos agentes externos; de ahí su amplia distribución en la naturaleza.

Es frecuente que formen parte de la flora normal de las mucosas y de la piel e incluso en procesos infecciosos, tales como intoxicaciones alimentarias, heridas y en general en distintos procesos patógenos. ⁽⁴⁶⁾

En su composición celular tiene membrana citoplasmática trilaminar que está separada de la pared celular por una región periplasmática. La pared celular consiste de tres componentes: peptidoglicano, ácidos teicóicos y proteína A. ⁽⁵⁴⁾

1.2.1.2 Clasificación, especies más importantes.

Se pueden distinguir las siguientes especies:

- ❖ *Staphylococcus aureus*
- ❖ *Staphylococcus epidermidis*
- ❖ *Staphylococcus saprophyticus*

S.aureus es con diferencia la especie más patógeno, agente etiológico de muchas infecciones. También es conocido como estafilococo dorado por el pigmento no difusible de color amarillo que forma. Bioquímicamente produce coagulasa y fermenta manitol. En su pared celular se han encontrado en torno a 30 antígenos distintos, siendo los más importantes el polisacárido A, formado por ácidos teicoicos y polímeros de fosfato de Ribitol, que inducen a la formación de anticuerpos. También se encuentra la proteína A, que forma parte de la pared celular de la bacteria y actúa también como un agente antigénico. ⁽⁴⁶⁾

S.epidermidis y *S.saprophyticus* son estafilococos oportunistas, encontrándose frecuentemente en el medio ambiente, en la piel y mucosas, ocasionando, solo en situaciones de debilidad por parte del paciente, casos de patogenicidad.

No producen toxinas, no producen coagulasa, no fermentan el manitol y no forman el pigmento amarillo característico de *S.aureus*. ⁽⁴⁶⁾

1.2.1.3 Acción patógena e interés clínico

El efecto patógeno de *S. aureus* para el hombre podría depender de:

- ❖ Antígenos presentes en la pared celular (polisacárido A, proteína A y otras proteínas de carácter antigénico).
- ❖ Toxinas (hemolisinas, toxina exfoliativa y enterotoxina).
- ❖ Enzimas (coagulasas, fibrinolisinases o estafilioquinasas y penicilinasas)
(46,83)

Con respecto a los antígenos de superficie, es decir, que se encuentran en la pared celular, nos encontramos sobre todo con los polisacáridos A y proteína A, que presentan propiedades antifagocitarias e inducen la liberación de factores quimiotácticos que intervienen en la formación de estructuras piógenas, muy características en las lesiones producidas por *Staphylococcus*.⁽⁴⁶⁾

Las toxinas más importantes van a corresponder a hemolisinas, que presentan composición protéica y que en general lisan con facilidad los eritrocitos además de tener efectos tóxicos sobre otras células como por ejemplo los macrófagos y leucocitos. Debido a esta propiedad estas exotoxinas son conocidas también como citotoxinas, son en general muy sensibles al calor.

Dentro de las toxinas, además de las hemolisinas, nos encontramos otras como la toxina exfoliativa, que es una exotoxina protéica causante de eritemas en piel, si pueden resultar graves.

Otras toxinas van a corresponder a las leucocidinas, que van a afectar a los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, destruyéndolos, proporcionando gran resistencia a la bacteria.

Por último, nos encontramos con las enterotoxinas, que son responsables de casos de intoxicaciones alimentarias y cuadros de enterocolitis. Este tipo de toxinas son exotoxinas de carácter protéico, capaces de anular la acción del jugo

gástrico, uniéndose posteriormente a los receptores nerviosos del tubo digestivo y actuando de esta forma sobre el centro del vómito, lo que originará numerosas náuseas y vómitos, y en mucha menor proporción diarreas.

Con respecto a las enzimas, la coagulasa es uno de los más importantes. Esta es capaz de activar la protrombina lo que va a acelerar el paso del fibrinógeno a fibrina, coagulando de esta forma el plasma sanguíneo. Así pues, la coagulasa va a intervenir en la formación de coágulos, facilitando procesos sépticos. Otras fermentos son las fibrinolisin, que tienen un gran efecto proteolítico, siendo capaces de romper los coágulos de fibrina transformando el plasminógeno en plasmina o fibrinolisin, es decir, ejercen un efecto completamente opuesto al de la coagulasa. Las penicilinas son otro tipo de fermentos o enzimas de carácter beta-lactamasa que van a romper el anillo β -lactámico de las penicilinas, creando resistencias frente a estos antibióticos. ⁽⁴⁶⁾

Así pues, y en función de la mayor o menor presencia de estos factores de virulencia *S.aureus* puede ser o no altamente patógeno para el hombre; de cualquier forma, *S.aureus* es frecuente encontrarla en la mucosa nasal, en la piel (sobre todo en las manos), o en la flora bacteriana normal de la persona sana. ⁽⁴⁶⁾

- ❖ Si afecta a la piel y mucosas pueden ser frecuentes procesos inflamatorios, forúnculo, infecciones en heridas y quemaduras, procesos supurativos y piógenos, etc.
- ❖ Si afecta al aparato digestivo, se producen cuadros de intoxicación alimentaria debido a la acción de enterotoxina, que crece muy bien en alimentos ricos en hidratos de carbono, como por ejemplo, las cremas y muchos productos de pastelería.
- ❖ Otros casos más o menos graves son artritis, pleuritis, endocarditis, osteomielitis o meningitis, que son más frecuentes en individuos debilitados. ^(46,112)

1.2.1.4 **Aislamiento**

Si la muestra procede de heridas, orinas, esputos, lesiones abiertas, supuraciones, etc; se necesitará de medios colectivos que faciliten el crecimiento de estafilococos e inhiban el crecimiento de otros gérmenes contaminantes.

Para ello consideraremos el carácter halófilo de *Staphylococcus*, es decir, *S.aureus* es capaz de crecer en medios ricos en cloruro sódico; además, es capaz de fermentar el manitol, lo que le distinguirá de otros. ⁽⁴⁶⁾

Si partimos de muestras no contaminadas se puede utilizar agar Sangre que permita observar las características de las colonias, su color y su posible hemólisis. ⁽⁴⁶⁾

1.2.2. **Género *Escherichia***

1.2.2.1 **Concepto y caracteres del género *Escherichia***

El género *Escherichia* está constituido, por bacterias con morfología bacilar, aunque las formas jóvenes son de tipo cocobacilar, fermentadoras de glucosa, móviles, Gramnegativas, son fermentadoras de lactosa con producción de ácidos y gas, aguantan temperaturas altas, lo que permite diferenciarlo de otros coliformes. Resiste muy bien los agentes externos y es fácil encontrarla en el agua, alimentos, etc. ⁽⁴⁶⁾

Es saprófito de la flora aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo y, en general, la presencia de este en aguas y alimentos es indicativo de contaminación fecal reciente. ⁽⁴⁶⁾

A veces puede crear trastornos gastrointestinales tipo diarreas debido a la acción de ciertos antígenos, produce infecciones urinarias, meningitis en neonatos y, en casos excepcionales graves bacteremias. ⁽⁴⁶⁾

1.2.2.2 Clasificación, especies más importantes

Principalmente son *E. coli* y *E. blattae*. La más importante para el hombre es la primera, y dentro de esta existen multitud de cepas distintas, según la presencia o no de antígenos, enzimas y toxinas (endotoxinas).⁽⁴⁶⁾

1.2.2.3 Acción patógena e interés clínico

Algunas cepas de *E. coli* son capaces de formar antígenos, confiriéndole propiedades antifagocitarias y de resistencia frente a sustancias bactericidas, proporcionándole con ello un alto poder invasivo.

Existen otras cepas de *E. coli* capaces de originar distintos tipos de toxinas como, por ejemplo, algunas cepas que forman endotoxinas responsables de cuadros febriles y diarreicos.⁽⁴⁶⁾

De acuerdo con esto tenemos:⁽⁴⁶⁾

- ❖ Si la cepa de *E. coli* forma enterotoxina citotóxica se producirán cuadros diarreicos en brotes epidémicos que afectaran especialmente a niños y lactantes y que responde a *E. coli* enteropatógena.
- ❖ Si la cepa de *E. coli* forma una enterotoxina tenemos procesos diarreicos que afectan tanto a niños como a adultos originándose en casos esporádicos o en brotes epidémicos (diarrea del viajero) y responde a *E. coli* enterotoxígena.
- ❖ Si forma una enterotoxina citotóxica, se producen procesos diarreicos graves de tipo hemorrágico, que se dan en casos esporádicos o en brotes, va a responder a *E. coli* enterohemorrágica.
- ❖ Si presenta ciertos plásmidos que incrementan su capacidad de invasión se producen cuadros diarreicos graves que afectan a niños y a adultos

originados en brotes epidémicos o en casos aislados, va a responder a *E.coli* enteroinvasiva.⁽⁴⁶⁾

También podrían originar otro tipo de infecciones como, por ejemplo, urinarias (cistitis, pielonefritis, etc.), infecciones biliares, infecciones de heridas, infecciones de meninges (meningitis, especialmente en neonatos), etc.⁽⁴⁶⁾

1.2.2.4 **Aislamiento**

Con la muestra se realiza un frotis, se realiza Gram, lo que permitirá observar el predominio de bacilos Gramnegativos. Se aísla a través de cultivos específicos. Los medios más utilizados son el medio Mac Conkey, medio Levine, caldo lactosado, etc. Se seleccionan las colonias lactosa positiva y se procede a su consiguiente identificación a través de pruebas bioquímicas.⁽⁴⁶⁾

1.2.3. **Género *Pseudomona***

1.2.3.1 **Concepto y caracteres del género *Pseudomona***

El género *Pseudomona* corresponde a bacilos generalmente de pequeño tamaño, Gramnegativos (aunque se tiñen con dificultad en la tinción Gram), son móviles, debido a la presencia de uno o varios flagelos polares (según especies), aerobios estrictos, catalasa y citocromo oxidasa positivos y salvo, alguna excepción, forman cápsula.

No son esporulados y se encuentran muy distribuidos en la naturaleza, especialmente en el agua y en el suelo, pasando a partir de aquí a los animales y al hombre. No existe ninguna especie estrictamente patógena para el hombre, sino oportunistas, provocando solo ante determinadas circunstancias (huésped debilitado) infecciones de carácter sobre todo hospitalario, que en ocasiones pueden resultar graves.^(3, 105)

La presencia de citocromo oxidasa se emplea para distinguirla de las Enterobacteriaceae.⁽⁸³⁾

Algunas cepas aparecen mucoides por la abundancia de una capsula de polisacárido. Algunas especies producen pigmentos difundibles como por ejemplo Piocinina (azul o verde) Pioverdina (verde amarillento) y Piorrubina (pardo-rojizo) que explica su aspecto característico en cultivo. ⁽⁸³⁾

La adherencia de *P. aeruginosa* se debe a cuatro componentes estructurales en su superficie: flagelos, pili, polisacáridos (LPS) y Alginato. ⁽⁴⁶⁾

Los flagelos y los pilis influyen sobre la movilidad de *P. aeruginosa* y el componente de lípido A de los lipopolisacaridos es responsable de la actividad de la endotoxina, el Alginato es un exopolisacarido mucoide que forma una cápsula prominente sobre la superficie bacteriana y protege al microorganismo de la fagocitosis y la actividad de los antibióticos. ⁽⁸³⁾

1.2.3.2 Clasificación especies más importantes

Se distinguen los siguientes grupos:

- ❖ *P.aeruginosa* o Bacilo piociánico, *P.pútida* y *P.fluorescens*; todos ellos se caracterizan por presentar pigmentos fluorescentes. Se pueden encontrar en forma saprófita en la piel y en el tubo digestivo, aunque pueden crecer en organismos debilitados (quemados, infecciones ulceradas, etc.) provocando cuadros más o menos graves, incluso mortales, si se produjera septicemia.
- ❖ *P.mallei* y *P.pseudomallei* generalmente se asocian a zoonosis, aunque excepcionalmente se podrían aislar en el hombre. La primera es el agente causal del muermo en animales.
- ❖ *P.cepacia*, *P.diminuto*, etc., son especies que no suelen afectar al hombre, aunque excepcionalmente podrían ser responsables de algún efecto patógeno.

- ❖ El resto de especies del género *Pseudomona* no son patógenas para el hombre. ⁽⁴⁶⁾

1.2.3.3 Acción patógena e interés clínico

La especie más importante para el ser humano es *P. aeruginosa*, y su interés clínico se debe a su posible efecto patógeno, que depende de la estructura antigénica de dicha bacteria. ⁽⁴⁶⁾

P. aeruginosa presenta tres tipos de antígenos: el antígeno somático O, que le proporciona especificidad, el antígeno flagelar H, de carácter protéico, y que afecta, no solo al flagelo polar de *P. aeruginosa*, sino también a su superficie, y el antígeno mucoide M. También es capaz de formar sustancias tóxicas, como exotoxinas, responsables de cuadros diarreicos (enterotoxina). ⁽⁴⁶⁾

En la naturaleza y en los ambientes húmedos de los hospitales, puede colonizar de forma transitoria el tracto respiratorio y digestivo de los pacientes hospitalizados, fundamentalmente de los que se tratan con antibióticos de amplio espectro, con equipos de tratamiento respiratorio o que tienen hospitalizaciones prolongadas. ⁽⁸³⁾

Las enfermedades producidas por *P. aeruginosa* son:

- Infecciones pulmonares comprenden desde irritación leve de los bronquios (traqueobronquitis) hasta necrosis del parénquima pulmonar (bronconeumonía necrosante).
- Infecciones cutáneas primarias infecciones oportunistas de heridas existentes (ej. Quemaduras) a infecciones localizadas de los folículos pillosos (ej. asociadas a la inmersión en aguas contaminadas como jacuzzis).

- Infecciones del aparato urinario infecciones oportunistas en pacientes con sondas urinarias permanentes y exposición a antibióticos de amplio espectro.
- Infecciones de oído comprenden desde una irritación leve de oído externo (oído de nadador) hasta la destrucción invasiva de los huesos craneanos adyacentes del oído infectado.
- Infecciones oculares infecciones oportunistas de corneas expuestas que presentan alguna lesión leve.
- Bacteriemia diseminación de las bacterias desde el foco de infección primaria (ej. pulmonar) hasta otros órganos y tejidos, pueden caracterizarse por la presencia de lesiones cutáneas necróticas.
- Otras infecciones como aquellas que se localizan en el aparato digestivo en el sistema nervioso central y en el sistema musculoesquelético.⁽⁸³⁾

1.2.3.4 Aislamiento

Se aísla el microorganismo problema a través de medios de cultivo específicos, para comprobar el crecimiento de lo que buscamos.

En general, el bacilo piocianico es fácil de cultivar, creciendo bien sobre medios simples a temperaturas próximas a 37°C.

En estos casos, es muy importante estudiar la presencia de pigmentos, pudiendo distinguirse cuatro distintos que se difunden en el medio. La piocianina es un pigmento responsable de la coloración azul o verdosa que puede adquirir el medio, y es características de *P.aeruginosa*.⁽⁸³⁾

Además de los pigmentos en el medio de cultivo se han de considerar las características de sus colonias, que pueden ser de tipo S, lisas y pequeñas, de tipo R o rugosas que generalmente suelen ser más grandes con bordes irregulares

blanquecinos o ligeramente grisáceos, y de tipo M o mucoso. La *P.aeruginosa* posee un olor dulce característico semejante al de las uvas.^(46, 83, 105)

Las *Pseudomonas* son patógenos oportunistas con requerimientos nutricionales mínimos, puede tolerar un intervalo de temperatura de (4- 42°C) y son resistentes a muchos antibióticos y desinfectantes.⁽⁸³⁾

1.2.4. Género *Cándida*

1.2.4.1 Concepto y caracteres del género *Cándida*.

Actualmente, se ha determinado que las especies del género *Cándida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas. Las especies incluidas en este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas (adquiridas en el hospital) y superan a cualquier patógeno Gramnegativo individual.⁽⁸³⁾

Se han descrito más de 100 especies del género *Cándida*, aunque tan solo un pequeño número de ellas se ha implicado en infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90 % y un 100 % de las cepas aisladas de muestras de mucosa y entre un 50 y 70 % de pacientes con infecciones nosocomiales septicémicas.⁽⁸³⁾

Se desarrollan como células levaduriformes ovaladas (3-5 µm) que forman yemas o blastoconidias, producen también pseudohifas e hifas verdaderas.

Por otra parte *C. albicans* produce tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa.⁽⁸³⁾

In vitro casi todas las especies de este género dan lugar a colonias lisas en forma de domo de color blanco a crema; pueden sufrir modificaciones fenotípicas en las que una cepa de *Cándida* se transforma de manera reversible en alguna de varias morfologías diferentes que comprenden desde la típica colonia blanca y lisa

formada principalmente de células levaduriformes de gemación a colonias muy peludas o vellosas compuestas fundamentalmente por pseudohifas o hifas. ⁽⁸³⁾

1.2.4.2 **Acción patógena e interés clínico.**

En seres humanos saludables puede colonizar piel y mucosas, por lo cual son comensales de la cavidad bucal, tubo digestivo y mucosa vaginal, causando a menudo infecciones superficiales. ⁽⁸³⁾

Las especies del género *Cándida* pueden producir una infección clínica en cualquier sistema orgánico. El espectro de infecciones abarca desde la enfermedad mucosa y cutánea superficial hasta la diseminación hematógena externa con afección de órganos diana como el hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el cerebro. En este último caso la mortalidad atribuible de forma directa al proceso infeccioso es del 50 %. ⁽⁸³⁾

Las infecciones mucosas conocidas como “muguet” pueden limitarse a la buco faringe o bien extenderse al hacia el esófago y el tubo digestivo .En la mujer en la mucosa vaginal también constituye un lugar frecuente de infección.

Generalmente, estas infecciones se observan en sujetos con una inmunodepresión local o generalizada o bien en condiciones que favorecen la proliferación de estas levaduras. Estas infecciones suelen manifestarse con máculas blancas semejantes al requesón en la superficie de la mucosa afectada.

Las especies del género *Cándida* pueden originar infecciones cutáneas localizadas en zonas en que la superficie cutánea esta obstruida y húmeda (ej. ingle, axilas, espacios interdigitales de los pies, pliegues mamarios).

Estas infecciones debutan con un exantema prurítico con lesiones vesiculopustulosas eritematosas. ⁽⁸³⁾

1.2.4.3 Aislamiento.

Para hallar el diagnóstico se realiza el estudio mediante microscopía directa y cultivo.

Las muestras de raspado de las lesiones mucosas o cutáneas se pueden examinar directamente con KOH al 10 % o el 20 %.

Las formas levaduriformes de gemación y las pseudohifas se detectan con facilidad por medio de la microscopía.⁽⁸³⁾

Los cultivos en medio micológicos se emplean con la finalidad de aislar el microorganismo para su posterior identificación a nivel de especie, como la producción de tubos germinales para *Cándida*.⁽⁸³⁾

1.3. EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos son preparados concentrados que pueden tener consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, estas se obtienen mediante una evaporación total o parcial del disolvente.

Este consiste en poner en contacto la droga con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la droga al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción del vegetal con disolventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos.⁽⁸⁸⁾

1.3.1. Clasificación de extractos según su consistencia

1.3.1.1 Extractos blandos

Poseen una concentración de principio activo superior a la droga original y tienen consistencia semisólida.⁽⁸⁸⁾

1.3.1.2 Extractos fluidos

El solvente se ha evaporado en el rotavapor hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo en la droga original. Tienen consistencia líquida y se obtienen generalmente por maceración o percolación. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas.

1.3.1.3 Extractos secos

Se obtienen por evaporación total del solvente y tienen una consistencia de polvo.

Presentan una concentración muy superior de principio activo comparada a la droga original. Son preparados bastante estables y de fácil manipulación que se pueden utilizar para preparar tinturas, extractos fluidos, etc. ⁽⁸⁸⁾

1.3.1.4 Crioextractos

Se obtienen de la droga fresca congelada, de la que se extraen los principios activos mediante nitrógeno líquido y luego se añade alcohol etílico. Los crioextractos resultan muy caros pero son muy útiles para la extracción de proteínas y enzimas de ciertas especies. ⁽⁸⁸⁾

1.3.2. Proceso de extracción

El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o espesarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar. ⁽⁴⁵⁾

Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente como:

- ❖ **Extracción con agua:** infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.

❖ **Extracción en solventes orgánicos:** maceración, lixiviación, o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico. La selección de uno de ellos dependerá de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con que se cuenten. ⁽⁴⁵⁾

La extracción en solventes organicos puede ser. ⁽⁴⁵⁾

- **Simple o maceración**, en la que la materia vegetal está en contacto con un volumen dado de disolvente durante un periodo de tiempo determinado. ⁽¹²⁶⁾
- **Continua por percolación**, el disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal.
- **Continua mediante el empleo de aparato Soxhlet**, Es un sistema de extracción solido-liquido, es un método en caliente que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. ⁽⁴⁵⁾

1.4. ACEITES ESENCIALES

1.4.1. Concepto de aceites esenciales.

Los aceites esenciales son sustancias naturales volátiles de composición generalmente muy complejas que se encuentran en gran variedad en las plantas y son responsables de su aroma, en la naturaleza los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la defensa y protección de la planta. Generalmente son insolubles en agua y deben conservarse en un lugar fresco y en recipientes de vidrio. ^(97, 103)

Todas las moléculas encontradas en los aceites esenciales extraídas por el arrastre de vapor de agua están constituidas por moléculas cuya estructura base está

formada por una cadena carbonada de entre 5-15 átomos de Carbono, Hidrogeno y Oxígeno. Los más comunes son los de C_{10} (monoterpenos).⁽¹⁰³⁾

Actualmente se han identificado alrededor de 400 componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La mezcla compleja pertenece a grupos característicos distintos como: el grupo de los terpenos originados de la condensación isoprenica y el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano provenientes del ácido shikímico.⁽⁴⁵⁾

1.4.1.1 Composición de los aceites esenciales

1.4.1.1.1 No terpenoides.

En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta como hidrocarburos (C,H) o sustancias con función oxigenada (C,H y O); sustancias volátiles aromáticas, sustancias con azufre, sustancias nitrogenadas y derivados cumarínicos.⁽⁶¹⁾

❖ Derivados del fenilpropano.

Los elementos de la estructura fenil-propano están compuestos por un radical fenil-aromático con una cadena de propano tres carbonos (C_3) radical fenil-benceno C_6-C_3 . Partiendo del metabolismo del ácido Shikímico: Son los aldehidoanísico, apiol, safrol, etc.⁽¹⁰³⁾

Este grupo contiene alcoholes, aldehídos, ácidos y otros de cadena corta carbonada como los compuestos azufrados y nitrogenados.^(103,126)

1.4.1.1.2 Terpenoides.

Es la serie más volátil y de menor peso molecular. Los terpenos derivan de unidades de Isopreno (C_5) unidas en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales. Principalmente se encuentran en los aceites esenciales monoterpenos (C_{10}), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C_{15}). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos. Los grupos que más destacan son:^(61,126)

❖ Monoterpenos

Es la molécula más pequeña, ya que está formada como máximo por $C_{10}H_{15}$. Son hidrocarburos alicíclicos, monocíclicos, bicíclicos, o policíclicos. Van acompañados de sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, etc. y las estructuras más representativas son: p -cimeno, β -terpineol, limoneno, α -pinenos, nerol, mentol, eucaliptol, timol, carvacrol etc. ^(61,103, 126)

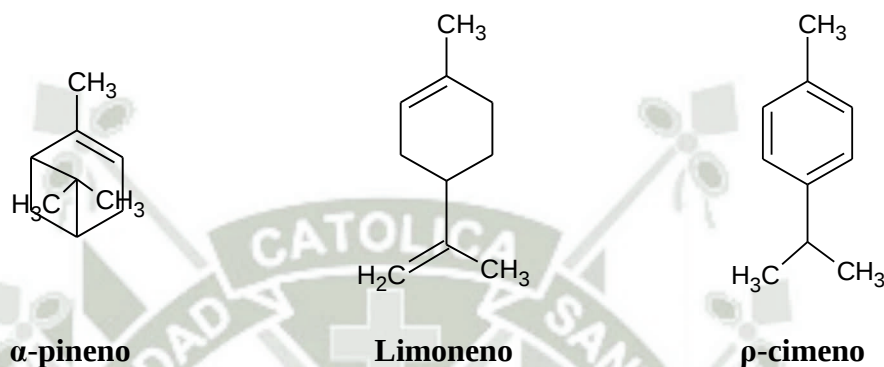


Figura N° 4. Monoterpenos de los aceites esenciales.

❖ Sesquiterpenos

Formados por quince carbonos (C_{15}); al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones hace que aparezcan millares de compuestos relacionados con una centena de esqueletos carbonados como el: α -zingibereno, alcohol del Pachulí, α -Cisbergamoteno, Longifoleno, Camazuleno, β -Cariofileno, Nerolidol, Carotol, Viridiferol, etc. ^(61,103)

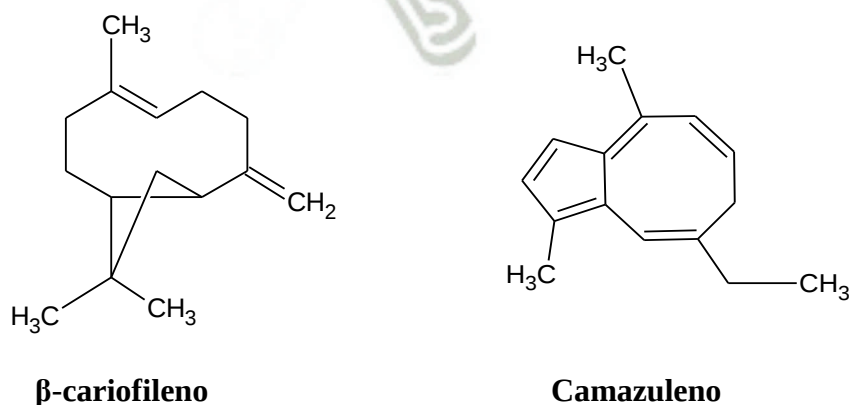


Figura N° 5. Sesquiterpenos de los aceites esenciales.

1.4.2. Métodos y técnicas de extracción de aceites esenciales

Para la obtención de los aceites esenciales existen métodos oficinales y no oficinales siendo los primeros usados para la obtención de aceites esenciales de uso farmacéutico y los últimos para la obtención de esencias de uso en perfumería o alimentación.⁽⁶¹⁾

1.4.2.1 Métodos oficinales

Dentro de los métodos oficinales tenemos:

1.4.2.1.1 Método Destilación por arrastre a vapor

El proceso está basado en que la mayor parte de las componentes volátiles que se encuentran en un material vegetal puedan ser arrastradas por el vapor de agua. Es así que la droga convenientemente troceada fresca es sometida a una corriente de vapor de agua que arrastra a los componentes volátiles del material vegetal hacia una trampa fría o refrigerante donde se condensan y debido a la diferencia de densidades y la insolubilidad del aceite esencial en el agua, este sobre nada en ella.⁽¹²⁶⁾

La destilación por arrastre de vapor puede realizarse de tres formas distintas y son comúnmente conocidas como:

- ❖ **Método de inyección de vapor de agua.-** muy utilizado 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 condensan y se recogen en un recipiente. Posteriormente por diferencia de densidades se pueden separar formando dos fases.
- ❖ **Hidrodestilación.-** se ponen en contacto el agua y la droga y se llevan a ebullición, el vapor de agua arrastra la esencia, se recoge en un recipiente y por densidad se separa el aceite esencial y el agua formando dos fases.

❖ **Destilación mixta o vapor saturado.-** consiste en poner el agua en el mismo recipiente de la droga pero sin tener contacto ya que la droga se encuentra en una rejilla y el agua esta en el fondo del recipiente. Se hace hervir el agua y el vapor que este origina atraviesa la rejilla con la droga y arrastra consigo los aceites esenciales. Después ambos se condensan en un refrigerante y por diferencia de densidades se forman dos fases y se separan.⁽⁶¹⁾

Por su sencillez, bajo costo y rendimiento el método de destilación con vapor saturado es el más usado y el más viable en la industria de aceites esenciales, siendo recomendado como el método óptimo de obtención de aceites esenciales.⁽⁴⁵⁾

1.4.2.1.2 **Método mecánico (expresión).**

Consiste en exprimir los frutos principalmente de los cítricos para que liberen los aceites esenciales de las cavidades donde se localizan.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACION

El presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Católica de Santa María de acuerdo a las actividades realizadas, así, la obtención del aceite esencial, el extracto de Paico y el análisis fitoquímico de ambos, se realizó en el laboratorio de Farmacognósia (H-103) además de la determinación de las pruebas físicoquímicas del aceite esencial, mientras que la identificación de las cepas y la investigación microbiológica se realizó en el laboratorio de Microbiología (H-402).

Por otro lado la clasificación taxonómica de la planta se realizó en la facultad de ciencias biológicas en el *HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)* y el índice de refracción se determinó en la facultad de ciencias naturales y formales en el Laboratorio SERVILAB ambos servicios ofrecidos por la Universidad nacional de San Agustín Arequipa.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico

Como material biológico se utilizó lo siguiente:

- ❖ Ramas frescas de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” extraídas en su totalidad del distrito de la Joya en la ciudad de Arequipa.
- ❖ Cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus*: Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Goyeneche de Arequipa.
- ❖ Cepas Gram positivas de *Staphylococcus epidermidis*: Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Honorio Delgado de Arequipa.
- ❖ Cepas Gram negativas de *Escherichia coli*: Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Goyeneche de Arequipa.

- ❖ Cepas Gram negativas fitopatógenas de *Pseudomona aeruginosa*: Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Honorio Delgado de Arequipa.
- ❖ Cepas levaduriformes de *Cándida albicans*: Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Goyeneche de Arequipa.
- ❖ Luego de obtenidas todas las cepas microbianas ya antes mencionadas se realizaron las pruebas de identificación de cada cepa, pese a que las 25 muestras se entregaron identificadas en los laboratorios de los diferentes hospitales de donde fueron recolectados. (anexo 4)

2.2.2. Material de laboratorio

2.2.2.1 Instrumental de vidrio

- ❖ Bagetas de vidrio
- ❖ Balón
- ❖ Bureta 25mL
- ❖ Cubeta cromatográfica
- ❖ Capilares de vidrio
- ❖ Fióla de 100 mL
- ❖ Matraces de vidrio 100, 500 y 1000 mL.
- ❖ Pera de decantación de 250 mL (Pirex)
- ❖ Placas Petri de vidrio
- ❖ Pipetas de 1mL, 2mL, 5mL y 10 mL
- ❖ Portaobjeto.
- ❖ Probeta graduada 50 y 100 mL
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Varillas de vidrio
- ❖ Vasos de precipitado: 50, 100, 250mL

2.2.2.2 Equipos y aparatos

- ❖ Alambique artesanal de Aluminio
- ❖ Autoclave (J P Selecta)
- ❖ Balanza analítica (Dakota)
- ❖ Cámara fotográfica
- ❖ Cocina eléctrica
- ❖ Equipo de reflujo
- ❖ Equipo de Soxhlet (Isolab Germany)
- ❖ Estufa (J P selecta)
- ❖ Evaporador rotatorio de destilación al vacío (R-Buchi).
- ❖ Lámpara de luz UV de 254 - 366nm (Camag CA 004)
- ❖ Mechero Bunsen
- ❖ Refractómetro de ABBE
- ❖ Refrigeradora (Bosch)

2.2.2.3 Otros accesorios

- ❖ Algodón estéril
- ❖ Asa de Kohle
- ❖ Espátulas
- ❖ Frascos estériles color ámbar
- ❖ Gasas estériles.
- ❖ Gradilla de metal para tubos de ensayo
- ❖ Gorro
- ❖ Guantes quirúrgicos estériles.
- ❖ Lápiz marcador
- ❖ Ligas
- ❖ Mascarillas

- ❖ Micropipeta graduada
- ❖ Papel Aluminio
- ❖ Papel kraf
- ❖ Pinzas de metal
- ❖ Plumón marcador
- ❖ Pulverizador
- ❖ Placas de microdilución
- ❖ Soporte universal
- ❖ Trípode

2.2.2.4 Reactivos

- ❖ Acetato de etilo (Merk, Q.P)
- ❖ Ácido acético cc. (JT Barker, Q.P)
- ❖ Ácido fórmico (JT Barker, Q.P)
- ❖ Ácido sulfúrico cc.(Merck, Q.P)
- ❖ Agua destilada (UCSM H-103)
- ❖ Alcohol cetona (UCSM H-103)
- ❖ Alcohol etílico (Merck, Q.P)
- ❖ Alfa naftol (UCSM H-402)
- ❖ Anhídrido acético (Merck, Q.P)
- ❖ Cristal violeta (UCSM H-402)
- ❖ Cloroformo (JT Barker, Q.P)
- ❖ Cloruro de Aluminio (UCSM H-103)
- ❖ Cloruro férrico (UCSM H-103)
- ❖ Etanol (JT Barker, Q.P)
- ❖ Éter de petróleo (Diproquim Q.P)
- ❖ Fenolftaleína (UCSM H-103)
- ❖ Hexano (Merck Q.P)
- ❖ Hidróxido de Potasio 0.1 M y 0.5 N (UCSM H-103)

- ❖ Iodo de Gram (UCSM H-402)
- ❖ Metanol (Merck Q.P)
- ❖ Nitrato básico de Bismuto (UCSM H-103)
- ❖ Oxidasa (UCSM H-402)
- ❖ Peróxido de Hidrógeno (UCSM H-402)
- ❖ Reactivo de Kovacs (UCSM H-402)
- ❖ Safranina (UCSM H-402)
- ❖ Suero fisiológico (UCSM H-402)
- ❖ Tolueno (Merck Q.P)
- ❖ Tween 80 (UCSM H-103)
- ❖ Vainillina (UCSM H-103)
- ❖ Yoduro de Potasio(UCSM H-103)

2.2.2.5 Medios de cultivo

- ❖ Agar citrato de Simmons
- ❖ Agar EMB
- ❖ Agar LIA
- ❖ Agar manitol salado
- ❖ Agar Mac Conkey
- ❖ Agar rojo de metilo
- ❖ Agar Vogues Proskauer
- ❖ Agar Mueller Hinton
- ❖ Agar nutritivo
- ❖ Agar Saboraud
- ❖ Agar sangre
- ❖ Agar TSI
- ❖ Caldo BHI

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Recolección y selección del material biológico vegetal

Para la obtención del extracto y aceite esencial de Paico, fué muy necesaria la recolección de hojas de Paico (en sus ramas) lo más fresco posible, por lo que nos dirigimos a la localidad de la Joya en el departamento de Arequipa a una altura de 1665 a 1169 msnm.

En este lugar se logró recolectar cerca de 15 kg de ramas de Paico, estas fueron acondicionadas en cajas de cartón envueltas en papel kraft para su traslado y conservación hasta su posterior identificación y procesamiento siendo transportadas inmediatamente a la ciudad de Arequipa. ⁽⁷⁰⁾

La selección tuvo por finalidad no solo retirar el material ajeno a nuestra droga sino también para dividir el lote recolectado en dos partes. La primera estuvo conformado por aproximadamente 10 kilos de hojas frescas en buen estado, las que tuvieron como destino la extracción de sus hojas para ser destiladas inmediatamente en el alambique de Aluminio y obtener el aceite esencial. La otra parte estuvo conformado por aproximadamente 1 kg de hojas las que siguieron los procedimientos descritos a continuación con la finalidad de obtener el extracto.

2.3.2. Obtención del extracto etéreo

2.3.2.1 Estabilización y desecación

La estabilización de las hojas que se utilizaron en el proceso de obtención del extracto se realizó en estufa a una temperatura de 105°C durante 2 minutos. Posteriormente se atemperó la misma estufa a una temperatura de 40°C y se procedió con la desecación la cual demando 5 horas aproximadamente. ⁽¹²⁶⁾

2.3.2.2 Trituración

Las hojas secas de Paico fueron debidamente trituradas con la finalidad de favorecer la acción del disolvente durante el proceso de extracción en Soxhlet. ⁽¹²⁶⁾

2.3.2.3 Proceso de obtención del extracto etéreo

2.3.2.3.1 Método

El método fue extracción continua a través del equipo de Soxhlet. ⁽¹²¹⁾

2.3.2.3.2 Fundamento

El solvente que se utiliza en la extracción cumple un ciclo de purificación continua, esta se realiza por destilación del solvente, de manera que la muestra siempre está en contacto con el solvente puro; obteniéndose así una extracción exhaustiva de la droga, la regeneración del solvente se realiza automáticamente evitando excesivos manipuleos. ^(45,47)

❖ El equipo de Soxhlet

Es un aparato de vidrio, consta de tres partes, en la primera se dispone el matríz del disolvente, en contacto con una manta calefactora, en la segunda se encuentra el cuerpo extractor que dispone un cartucho de papel de filtro o tela que contiene un peso dado de la droga, y el tercero es el refrigerante, en el se condensa el disolvente que por efecto de la gravedad, cae en la segunda parte antes mencionada embebiendo el material vegetal.

Cuando este cuerpo extractor está lleno de líquido extractivo, mediante un sistema de sifón, cae de nuevo en la primera parte, iniciándose de nuevo el proceso.

2.3.2.3.3 Procedimiento

- ❖ Se colocó en el matríz redondo cantidad suficiente de disolvente (150 mL de éter de petróleo) con mucho cuidado ya que es un compuesto muy volátil.
- ❖ Posteriormente se colocó en el tubo de extracción (parte superior del equipo de Soxhlet) aproximadamente 14 gramos de droga correspondiente a hojas secas y trituradas de Paico, las que se acondicionaron en papel filtro y sujetaron con un pabilo.

- ❖ Se instaló todo el equipo y se inició el proceso de extracción, el matrás se encontraba en una olla a baño María.
- ❖ Este proceso tuvo una duración de 5 horas a una temperatura de 30 a 40°C en las que se pudo observar aproximadamente 15 ciclos de extracción con una duración de 20 minutos entre cada ciclo.
- ❖ Finalmente se retiró el líquido extraído para su posterior concentración.^(25,84)
- ❖ Se transfirió el líquido extraído al balón rotavapor a una temperatura de 25°C.
- ❖ La concentración terminó en baño María hasta la eliminación total del disolvente.
- ❖ Por diferencia se halló el peso total del extracto llevado a sequedad, y considerando el total de droga inicial se calculó el rendimiento de cada extracción.⁽⁴⁵⁾

2.3.2.4 Rendimiento del extracto etéreo

El porcentaje de rendimiento relaciona cantidad de extracto obtenido con la cantidad de droga utilizada. Permitiendo determinar cuánto obtengo de producto final. La cantidad de extracto a partir de su materia prima.

Para hallar el porcentaje de rendimiento del extracto etéreo apartir de la extracción con Soxhlet se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{Peso del extracto etéreo obtenido}}{\text{Peso de hojas de muestra}} \times 100$$

Ecuación No 1. Porcentaje de rendimiento del extracto etéreo

2.3.2.5 Características organolépticas del extracto etéreo.

Dentro de los procesos directos de identificación de los extractos están las características organolépticas, aquellas que pueden ser definidas por los sentidos como:

- ❖ **Determinación del olor:** Se introdujo una tira de papel filtro 1 x 10 cm en el extracto etéreo, se percibió y se determinó su olor característico.
- ❖ **Determinación del color:** se colocó el extracto etéreo en un tubo de ensayo y se observó su color.
- ❖ **Determinación del aspecto:** En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de extracto etéreo mediante el tacto y a contraluz se determinó su aspecto.

2.3.3. Obtención del aceite esencial

2.3.3.1 Proceso de obtención del aceite esencial

2.3.3.1.1 Método

El método seleccionado fué destilación con arrastre de vapor de agua bajo el modo de destilación con vapor saturado o destilación mixta.

2.3.3.1.2 Fundamento

Consiste en separar sustancias ligeramente volátiles o insolubles en agua, que por efecto de la temperatura del vapor este asciende pasando por el tejido vegetal liberando el aceite esencial que junto con el agua son condensador en el refrigerante con un cambio de temperatura en frío.⁽⁹³⁾

2.3.3.1.3 Procedimiento

- ❖ Se colocó agua destilada en el alambique una cantidad aproximada de 5 Litros, a esta cantidad el nivel de agua se encuentra por debajo de la criba.
- ❖ Se introdujo las hojas frescas de Paico previamente seleccionadas y pesadas, una cantidad aproximada de 3 kg.
- ❖ Se cerró el destilador y se procedió a encender la hornilla para iniciar el proceso de destilación.
- ❖ Antes que empiece a destilar el aceite esencial se colocó una pera de decantación en la parte final del condensador, ello como recipiente para recolectar y decantar el aceite esencial.

- ❖ El agua inició su ebullición produciendo vapor proceso por el cual se inició el proceso de obtención de nuestro aceite esencial.
- ❖ El proceso duró aproximadamente 4 horas hasta según los volúmenes recolectados indicaban que la cantidad de agua en el alambique era mínima.
- ❖ Posteriormente se procedió a separar el aceite del agua de destilación o agua aromática, ello aprovechando la inmiscibilidad del aceite esencial con el agua y la diferencia de densidades, este proceso se realizó con sumo cuidado a fin de evitar pérdidas o presencia de agua en el aceite.
- ❖ El aceite recolectado se conservó en una botella de vidrio color caramelo de cierre hermético envuelto en papel aluminio en un lugar fresco sin contacto con la luz. ⁽¹²⁵⁾

2.3.3.2 Rendimiento del Aceite Esencial.

El porcentaje de rendimiento relaciona cantidad de aceite esencial obtenido con la cantidad de droga utilizada. Permitiendo determinar cuánto obtengo de producto final. La cantidad de aceite esencial a partir de su materia prima.

Para hallar el porcentaje de aceite esencial apartir de la extracción con vapor saturado de agua se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{Peso del aceite esencial obtenido} \times \text{densidad de muestra}}{\text{Peso de la muestra en gramos}} \times 100$$

Ecuación No 2. Porcentaje de rendición aceite esencial

2.3.3.3 Características organolépticas del aceite esencial

Son características o propiedades percibidas por los órganos de los sentidos, como; la vista, el olfato, el tacto, estas sensaciones son evaluadas y emitidos en juicio, por lo que se considera:

- ❖ **Determinación de olor:** Se introdujo una tira de papel filtro de 1 x 10 cm en el aceite esencial, se percibió y se determinó su olor característico.
- ❖ **Determinación del color:** se colocó una alícuota de aceite esencial en un tubo de ensayo y se observó su color.
- ❖ **Determinación del aspecto:** En un tubo de ensayo se colocó una alícuota de aceite esencial mediante el tacto y a contraluz se determinó su aspecto.

2.3.3.4 **Caracterización fisicoquímica del aceite esencial**

Para la utilización de los aceites esenciales es necesario conocer sus características fisicoquímicas que sirven como parámetros que establecen la calidad del producto usado mayormente para fines comerciales.

2.3.3.4.1 **Solubilidad**

Los aceites esenciales son muy solubles en etanol. Si al alcohol le vamos añadiendo agua de forma progresiva, la mezcla disolverá cada vez menos aceite esencial. Dependiendo del aceite esencial del que se trate se disolverá completamente en una mezcla alcohol agua que lleve como máximo una determinada proporción de agua, si la proporción de agua es mayor, parte del aceite esencial no se disolverá.⁽⁸⁶⁾

Procedimiento

- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 0.5 mL de agua destilada, luego se solubiliza.
- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 1 mL de agua destilada.
- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 3 mL de agua destilada.
- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 0.5 mL de alcohol de 96°.

- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 1 mL de alcohol de 96°.
- ❖ Se colocó 1 mL de aceite esencial de Paico en un tubo de ensayo y luego se le adicionó 3mL de alcohol de 96°.

2.3.3.4.2 Índice de Refracción

El índice de refracción es la relación que existe entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso, de una longitud de onda determinada, que pasa del aire a la sustancia en examen. Esta se mantiene a una temperatura constante y determinada.⁽¹²⁶⁾

❖ Refractómetro

Se utilizó un refractómetro tipo ABBE que permitió la lectura directa del índice de refracción entre 1.3000 y 1.7000 con una precisión de ± 0.0002 . El refractómetro puede ajustarse mediante el empleo de un índice de refracción conocido como el agua (1.3333).⁽⁸⁵⁾

Procedimiento

- Se ajustó y estandarizó el refractómetro con el índice de refracción conocido.
- Se hizo circular una corriente de agua para mantener la temperatura de manera que se obtenga 20°C.
- Se colocaron las muestras de aceite esencial (pequeñas gotas) en los prismas limpios y secos.
- Se esperó a que se estabilice la temperatura.
- Al cerrar el portamuestras, se abrió el conducto de entrada de luz, para visualizar mejor.
- Se calibró el refractómetro con las perillas
- Se efectuó la lectura.^(85,93)

2.3.3.4.3 Densidad

Se determina mediante la diferencia de pesos de un picnómetro lleno con aceite esencial menos el peso de un picnómetro vacío relacionado con la capacidad en volumen del picnómetro a una temperatura constante para ambos. ⁽⁹³⁾

❖ Picnómetro

Aparato que se utiliza para determinar las densidades de distintas sustancias.

Consiste en un pequeño frasco de vidrio de cuello estrecho, cerrado con un tapón esmerilado, hueco y que termina en la parte superior en un tubo capilar con graduaciones, en el cual se ubica la muestra, la capacidad del picnómetro es de 10 mL. ⁽⁹³⁾

Procedimiento

- Previamente se lavó y secó en horno eléctrico o estufa.
- A continuación se llevó los Picnómetros al desecador, el cual posee una tapa la misma que debe moverse en movimientos circulares, durante varios segundos para que la sílica pueda extraer toda la humedad y gases restante de los picnómetros.
- Terminado el proceso, se procedió a tomar la masa de los picnómetros (vacíos) con ayuda de una balanza.
- Finalmente se ubicó las muestras de aceites esenciales, dentro de ellos, con el objetivo de tomar su respectiva masa (picnómetro + muestra). ⁽⁹³⁾
- $D = \text{Densidad}$

$M_1 = \text{Densidad del picnómetro vacío.}$

$M_2 = \text{Densidad del picnómetro con muestra de aceite esencial}$

$V = \text{Volumen de aceite esencial}$

$$D = \frac{M_2 - M_1}{V}$$

Ecuación No 3. Densidad aceite esencial.

2.3.3.4.4 Determinación del índice de acidez

❖ Fundamento

El índice de acidez expresa la cantidad de miligramos de hidróxido de Potasio necesarios para la neutralización de la acidez libre en 1 gramo de aceite esencial. ^(7,98)

El índice de acidez es una medida del grado de descomposición de un aceite por lo tanto permite determinar la presencia de componentes de procedencia ácida presentes en el aceite esencial.

❖ Procedimiento

- En un Erlenmeyer, se pesó exactamente 1 gramo de muestra.
- Se añadió 20 mL de alcohol neutralizado caliente, se agitó y se agregó 3 gotas de fenolftaleína.
- De una bureta se dejó caer una solución alcohólica de hidróxido de Potasio 0.1 M.
- V = volumen en mL de la solución de KOH utilizada.

M = Molaridad de la solución de KOH utilizada

P = peso en gramos del aceite problema.

$$\text{mg KOH} = \frac{V(\text{mL})_{\text{KOH}} \times M_{\text{KOH}} \times 56,1}{P}$$

Ecuación No 4. Índice de acidez.

2.3.4. Caracterización fitoquímica

2.3.4.1 Método

El método utilizado es cualitativo, mediante cromatografía en capa fina.

2.3.4.2 Fundamento

La cromatografía de capa fina (CCF), se considera como un método fisicoquímico cromatografico, cuyo fundamento es la separación de los componentes de una mezcla, teniendo en cuenta la afinidad de estos por la fase estacionaria o por la fase móvil a través de la migración diferencial, para luego producir un rastro (corrida) cromatográfico de las sustancias integrantes de la mezcla. ^(121,126)

La retención de los componentes y su consiguiente separación depende de la capacidad de las moléculas para ser absorbidas temporalmente por medio de fuerzas electrostáticas o puente de Hidrógeno. ⁽¹²⁶⁾

En este método se utiliza una cámara de vidrio, en las que se deposita una fina capa de absorbente (gel de sílice, almidón, polvo de celulosa, etc).

2.3.4.3 Procedimiento cromatográfico.

❖ Preparación de la fase estacionaria

Se utilizó placas de sílica gel las cuales fueron recortadas en dimensiones de 5 cm de ancho por 10 cm de altura, luego a la altura de 1 cm (aproximadamente) de una de las bases se marca débilmente con un lápiz fino una línea teniendo cuidado de no romper la capa absorbente. Esta línea servirá de base para situar las muestras a analizar.

Con un capilar se deposita la sustancia a analizar sobre los puntos en la línea base (línea de aplicación) con una separación de 1cm de sembrada y sembrada. ⁽¹²²⁾

❖ Preparación de la fase móvil

Tras la aplicación de la muestra, se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación la placa se introdujo a una cubeta que contenía un sistema de disolventes de desarrollo llamada fase móvil que son una mezcla de solventes en proporciones.

Una vez en la cubeta de vidrio el nivel de la fase móvil no tuvo contacto con la línea de siembra.

❖ Desarrollo cromatográfico

- Se tuvo cuidado con la preparación de la fase móvil ya mencionada y se dejó reposar en la cámara cromatográfica por 3 minutos aproximadamente para que los compuestos pudieran estabilizarse evitando movimientos.
- Se colocó en la cámara cromatográfica en forma oblicua la placa de sílica gel ya sembrada con la muestra a analizar y se esperó a que la fase móvil inicie con la reacción.
- Se retiró la placa cromatográfica sin dañarla y cuidadosamente se dejó que seque al medio ambiente.
- Se roseó con el revelador indicado y se mantuvo en reposo.
- Se llevó a estufa a 110° C durante 5-10 min.
- A continuación se observó unas bandas de colores que posteriormente fueron analizadas. ^(45,123)

❖ Selección del agente revelador

Se utilizaron reactivos reveladores indicados para cada familia de metabolitos secundarios separados en la placa cromatográfica, con un atomizador o frasco spray se pulverizó el revelador por toda la placa con cuidado, tratando de no agregar exceso de reactivo. Las sustancias se visualizaron en la placa una vez desarrolladas, mediante el color por absorción ultravioleta o revelado específico que produce una reacción coloreada. ⁽¹²²⁾

2.3.4.4 Constante Rf (Ratio of front)

Llamado también factor de referencia es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal. Se define como: ⁽²²⁾

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el eluyente.}}$$

Ecuación No 5. Factor de referencia

2.3.4.5 Cromatografía en capa fina del extracto etéreo.

2.3.4.5.1 Identificación general

Para identificar la presencia de sustancias terpénicas, alcoholes superiores, fenoles, esteroides, etc en el extracto etéreo se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ FASE MOVIL:

- Tolueno: 70%
- Acetato de etilo: 30%

❖ REVELADOR: Vainillina- Ácido sulfúrico.

- Solución A: Sol. etanólica al 1% de vainillina.
- Solución B: Sol. etanólica al 5% de ácido sulfúrico.

2.3.4.5.2 Identificación de sustancias terpénicas.

Para identificar la presencia de sustancias terpénicas y saponinas esteroidales en el extracto etéreo se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ FASE MOVIL:

- Hexano: 70%
- Acetato de etilo: 30%

❖ **REVELADOR:** Liebermann - Burchard

Solución etanólica de anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico. Se mezcló 1mL de anhídrido acético con 1mL de cloroformo, esta mezcla se enfrió a 0°C y se le adicionó 1 gota de ac sulfúrico.

❖ Se observó la placa cromatográfica en la luz UV- 254 nm.

2.3.4.5.3 Identificación de flavonoides

Para identificar la presencia de flavonoides en el extracto etéreo se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ **FASE MOVIL:**

- Acetato de etilo: 60%
- Ácido acético: 10%
- Ácido fórmico: 10%
- Agua: 20%

❖ **REVELADOR:** Cloruro de Aluminio 1%

- Cloruro de Aluminio: 0.5 g.
- Etanol: 50 mL

❖ Se observó la placa cromatográfica en la luz UV- 366 nm.

2.3.4.5.4 Identificación de taninos

Para identificar la presencia de taninos en el extracto etéreo se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ **FASE MOVIL:**

- Metanol: 75%
- Agua: 25%

❖ **REVELADOR:** Cloruro de férrico 1%

- Cloruro férrico: 0.5 g.
- Etanol: 50 mL

2.3.4.5.5 Identificación de Alcaloides

Para identificar la presencia de alcaloides en el extracto etéreo se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ **FASE MOVIL:**

- Acetato de etilo: 80%
- Metanol: 10%
- Agua destilada: 10%

❖ **REVELADOR:** Reactivo de Dragendorf

• **Solución A:**

Se disolvió 0.85 g de nitrato básico de Bismuto en 10 mL de ácido acético y 40 ml de agua tibia.

• **Solución B:**

Se disolvió 8 g de yoduro de Potasio en 30 mL de agua destilada.

• **Solución stock:**

Se mezcló A y B (1:1).

2.3.4.6 Cromatografía en capa fina del aceite esencial

2.3.4.6.1 Identificación general

Para identificar la presencia de sustancia terpénicas, alcoholes superiores, fenoles, esteroides, etc en el aceite esencial se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos:

❖ FASE MOVIL:

- Tolueno: 70%
- Acetato de etilo: 30%

❖ REVELADOR: Vainillina- Ácido sulfúrico.

- Solución 1: Sol. etanólica al 1% de vainillina.
- Solución 2: Sol. etanólica al 5% de ácido sulfúrico.

2.3.4.6.2 Identificación de sustancias terpénicas

Para identificar la presencia de sustancia terpénicas en el aceite esencial se utilizó un determinado sistema de disolventes y los reactivos reveladores que a continuación detallaremos.

❖ FASE MOVIL:

- Hexano: 95%
- Acetato de etilo: 5%

❖ REVELADOR: Liebermann – Burchard

Solución etanólica de anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico. Se añadió 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo, esta mezcla se enfrió a 0°C y se le agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.

❖ Se observó la placa cromatográfica en la luz UV- 254 nm.

2.3.5. Evaluación del efecto antimicrobiano

Se realizó tanto la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etéreo de Paico así como del aceite esencial.

2.3.5.1 Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etéreo.

2.3.5.1.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La concentración mínima inhibitoria es definida como la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en condiciones normalizadas.

Se puede determinar la concentración mínima inhibitoria de los tubos mediante la turbidez de los mismos al estar en contacto con el microorganismo, sin embargo si este no presenta turbidez sea por la coloración u otro factor del extracto se procede a sembrar y visualizarlo por su crecimiento en placas.

2.3.5.1.1.1. Dilución en caldo

Consistió en colocar concentraciones decrecientes del extracto en tubos con caldo de cultivo como BHI, medio que ayudó a mantener el desarrollo del microorganismo. El extracto se preparó en emulsión concentrada y luego fué diluida hasta obtener nuevas concentraciones.

2.3.5.1.1.2. Preparación de la emulsión madre.

Se preparó una emulsión madre con aproximadamente 30g de extracto etéreo de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico”. Se añadió el emulgente Tween 80 o polisorbato 80, una cantidad de 2.5 mL aproximadamente el cual facilitó la emulsificación del extracto con el agua destilada previamente calentada a 45°C, hasta completar a 50 mL. Esta proporción extracto, Tween 80 y agua destilada nos dió una concentración de 600mg/mL. Se mezcló con mucho cuidado hasta obtener una mezcla homogénea, sin gránulos. ⁽⁵⁵⁾

2.3.5.1.1.3. Preparación del inóculo

Se seleccionó aproximadamente de 4 a 5 colonias de la superficie de cada colonia de los microorganismos en estudio con un asa de siembra, luego se depositaron en 5 tubos (un tubo por muestra) que contenían 5 mL de caldo BHI estéril. La turbidez del tubo correspondió a la del tubo N° 5 de la escala de Mac Farland que representó a 10^8 UFC/mL.⁽⁵⁵⁾

Posteriormente se procedió a realizar una dilución tomando 0.1 mL de inóculo que representó 10^8 UFC/mL y se agregó enseguida 9.9 mL de caldo BHI, se agitó cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea que representó a 10^6 UFC/mL, este procedimiento se realizó con todos los microorganismos en estudio. Se trabajó con 25 baterías de tubos en total teniendo en cuenta que cada cepa microbiana es diferente.⁽⁵⁵⁾

2.3.5.1.1.4. Preparación de las diluciones

Se procedió a esterilizar los tubos, las placas y todo el material utilizado y además se preparó una solución estéril de caldo BHI.

Para la dilución seriada en tubo se trabajó con una batería de 9 tubos por microorganismo; En el primer tubo se agregó 1 mL de emulsión madre, a partir del segundo tubo hasta el octavo tubo se depositó 1 mL de caldo BHI estéril, luego se procedió a añadir 1 mL de emulsión madre al segundo tubo, se homogenizó la mezcla y se le extrajo 1 mL de la misma que seguidamente se depositó en el tercer tubo realizándose el mismo mecanismo hasta el octavo tubo, aclarando que en el octavo tubo 1 mL fue desechado, obteniendo hasta el momento un volumen de 1 mL para los 8 tubos.

Posteriormente se adicionó a las nuevas concentraciones 1 mL de inóculo con el microorganismo seleccionado obteniendo finalmente para todos los tubos un volumen de 2 mL como se detalla en la **TABLA N° 2**.

Para el blanco se utilizó 1 mL de caldo BHI con Tween-80 y se le adicionó 1 mL de inóculo, obteniendo un volumen final de 2 mL, este procedimiento se realizó con la finalidad de determinar si el caldo con el Tween-80 poseen actividad inhibitoria en presencia de crecimiento microbiano.

Realizada la dilución se taparon los tubos y se llevaron a incubar a 37°C, para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* por un periodo de 24 horas y para *Cándida albicans* por 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación para cada microorganismo se observó la turbidez de los tubos a distintas concentraciones y estableciendo el punto de ruptura o CMI.⁽⁵⁵⁾

Tabla N° 2: Diluciones seriadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etéreo

Descripción	1	2	3	4	5	6	7	8	B
Emulsión madre (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	
BHI (mL)		1	1	1	1	1	1	1	1
V. Inicial (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cc. Inicial (mg/mL)	600	300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	
Inoculo (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cc. Final (mg/mL)	300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.3417	

Fuente: Registro de datos propios

2.3.5.1.2 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

La concentración bactericida mínima es definida como la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de destruir el 99.9% de una muestra inoculada.

Para la determinación de la concentración bactericida mínima se trabajó con la misma tabla de concentraciones anterior, ya que se trató de establecer si en los tubos con inhibición existen microorganismos con viabilidad de desarrollo, para ello se prepararon medios de cultivo en placas que permitieran el desarrollo de cada cepa,

por lo tanto para las bacterias se preparó agar Mueller Hinton y para las levaduras agar Sabouraud en cantidades suficiente. ⁽⁵⁵⁾

Luego las placas petri estériles fueron divididas con un lápiz marcador en 4 porciones iguales. Se procedió a rotular cada placa petri con el microorganismo correspondiente. Se añadió agar estéril en cada placa en proporción adecuada, dejando que esta solidifique.

Transcurrido el tiempo de incubación de los microorganismos en los tubos descritos anteriormente, sumergimos el asa de col en cada tubo respectivo y sembramos de manera uniforme en las placas con agar, debidamente rotuladas.

Se sellaron las placas para evitar la contaminación y se dejaron incubando durante 24 horas las bacterias y 48 horas las levaduras a una temperatura de 37 °C. Pasado el tiempo establecido se retiraron las placas para su respectivo análisis. ⁽⁵⁵⁾

2.3.5.2 Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial.

2.3.5.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

2.3.5.2.1.1. Preparación de la emulsión madre

Lo primero que se realizó fue emulsificar el aceite esencial, para que pueda ser evaluado en medios de cultivo de naturaleza acuosa. Ello se logró gracias al agente emulsificante Polisorbato 80 o TWEEN-80. Se tomó una cantidad de aceite esencial de 1200 µL que se emulsificó con 0.3 mL de tween 80 y se le adicionó caldo BHI hasta completar 15 mL, de este modo se obtuvo una emulsión homogénea cuya concentración fué de 80 µL/mL. ⁽⁵⁵⁾

2.3.5.2.1.2. Preparación del inóculo

Se seleccionó aproximadamente de 4 a 5 colonias de la superficie de cada colonia de los microorganismos en estudio con un asa de siembra, se seleccionó aproximadamente de 4 a 5 colonias, luego se depositaron en 5 tubos (un tubo por muestra) que contenían 5 mL de caldo BHI estéril. La turbidez del tubo correspondió a la del tubo N° 5 de la escala de Mac Farland que representó a 10⁸ UFC/mL. ⁽⁵⁵⁾

Posteriormente se procedió a realizar una dilución tomando 0.1 mL de inóculo que representó 10^8 UFC/mL y se agregó enseguida 9.9 mL de caldo BHI, se agitó cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea que representó a 10^6 UFC/mL, este procedimiento se realizó con todas las bacterias en estudio. Se trabajó con 25 baterías de tubos en total teniendo en cuenta que cada cepa microbiana es diferente. ⁽⁵⁵⁾

2.3.5.2.1.3. Preparación de las diluciones.

Se preparó una solución estéril de caldo BHI. Utilizamos una placa esteril de 96 pozos y procedimos con la microdilucion seriada en celda.

A la primera celda se le añadió 100 μ L de la emulsión madre la cual tiene una concentración de 80 μ L/mL de aceite esencial, se agregó 100 μ L de inóculo con el microorganismo en estudio dando un volumen final de 200 μ L, disminuyendo así la concentración inicial a la mitad, obteniendo 40 μ L/mL de concentración final; A la segunda celda se agregó 100 μ L de la emulsión madre a la que se le adicionó 12.5 μ L de caldo BHI obteniendo un volumen inicial de 100 μ L a una concentración 70 μ L/mL, se agregó 100 μ L de inóculo dando un volumen final de 200 μ L, disminuyendo así la concentración inicial de esta segunda celda a la mitad, obteniendo 35 μ L/mL de concentración final; para la tercera celda hasta la octava celda se realizó el mismo procedimiento , en las concentraciones que se detallan en la **Tabla N° 3**.

Para el blanco se utilizó 100 μ L de caldo BHI con Tween-80 y se le adicionó 100 μ L de inóculo, obteniendo un volumen final de 200 μ L, este procedimiento se realizó con la finalidad de determinar si el caldo BHI con el Tween-80 posee actividad inhibitoria en presencia de crecimiento microbiano.

Realizadas las diluciones se cubrieron las celdas con mucho cuidado y se llevaron a la incubadora a 37°C durante 24 horas a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y 48 horas a *Cándida albicans*. Transcurrido este periodo se observó la turbidez de las celdas. ⁽⁵⁵⁾

Tabla N° 3: Diluciones seriadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial

Descripción	1	2	3	4	5	6	7	8	B
Emulsión madre (µL)	100	87.5	75	62.5	50	37.5	25	12.5	
BHI (µL)	0.0	12.5	25	37.5	50	62.5	75	87.5	100
Volumen inicial (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	
Cc. inicial (µL/mL)	80	70	60	50	40	30	20	10	
Inoculo(µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V.final	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Cc final (µL/mL)	40	35	30	25	20	15	10	5	

Fuente: Registro de datos propios

2.3.5.2.2 Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

Para la determinación de la concentración bactericida mínima se trabajó con la misma tabla de concentraciones anterior, ya que se trató de establecer si en las celdas con inhibición existieron microorganismos con viabilidad de desarrollo. Para ello en primer lugar se preparó para las bacterias agar Mueller Hinton y para levaduras Agar Sabouraud estéril en cantidades suficiente. ⁽⁵⁵⁾

Luego las placas petri estériles fueron divididas con un lápiz marcador en 4 porciones iguales. Se procedió a dividir y rotular cada placa petri con el microorganismo correspondiente. Se añadió agar estéril en cada placa en proporción adecuada, dejando que esta solidifique.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación de los microorganismos en las celdas descritas anteriormente, sumergimos el asa de col en cada celda respectiva y sembramos uniformemente en las placas con agar. ⁽⁵⁵⁾

Se sellaron las placas petri para evitar la contaminación y se dejó incubando durante 24 horas las bacterias y 48 horas las levaduras a una temperatura de 37 °C, pasado este tiempo se retiraron las placas para su respectivo análisis. ⁽⁵⁵⁾

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el capítulo N° III exponemos los resultados obtenidos durante nuestro estudio que determinaron el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etéreo y del aceite esencial de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

3.1. Recolección y selección de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico”

Para la obtención del extracto etéreo previamente se recolectaron hojas de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” de la ciudad de la Joya perteneciente al departamento de Arequipa, esta recolección se realizó en horas de la mañana, recolectando así una cantidad aproximada de 15 kg de ramas tanto para la obtención del extracto como para la obtención del aceite esencial. Posteriormente fueron envueltas las ramas en papel Kraft y trasladadas a la ciudad de Arequipa, una vez en el laboratorio la planta se realizó la selección de hojas frescas.



Figura N° 6. Ramas de *Chenopodium ambrosioides* L. (Paico)



Figura N° 7. Hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. (Paico)

Adicionalmente se utilizó una determinada cantidad de ramas de Paico para el reconocimiento e identificación taxonómica siendo llevadas al HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA) en la facultad de Biología de la Universidad de San Agustín. (anexo 4)

3.2. EXTRACTO ETÉREO

3.2.1. Estabilización, desecación y trituración del material biológico vegetal

Posterior a la selección se llevaron las hojas frescas de Paico a la estufa y se estabilizaron a 105°C durante 2 min, una vez estabilizadas nuestras hojas se procedió a desecarlas a una temperatura de 40°C por 5 horas obteniendo hojas completamente secas las cuales se transfirieron a un mortero de porcelana para triturarlas quedando un polvo moderadamente fino, facilitando así el proceso de obtención del extracto.

3.2.2. Proceso de obtención y concentración del extracto etéreo.

El proceso de extracción de nuestro extracto etéreo de Paico se realizó por el método de extracción con Soxhlet descrito en la metodología del capítulo anterior, se utilizó como disolvente éter de petróleo ya que el extracto obtenido con este disolvente mostró mayor efecto luego de una evaluación previa en donde se evaluó junto al extracto etanólico; siendo el extracto etéreo el que favoreció la

extracción de sustancias apolares como los aceites esenciales, luego de la extracción se procedió a concentrar el extracto utilizando el método de concentración al vacío mediante un equipo de rotavapor obteniendo al final un extracto blando de color verde.



Figura N° 8. Destilación por método de Soxhlet.



Figura N° 9. Concentración del extracto etéreo en equipo rotavapor.

3.2.3. Rendimiento del extracto etéreo.

A fin de determinar el rendimiento del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. se realizaron tres extracciones y a cada una de ellas se determinó su porcentaje de rendimiento como se detalla en la **Tabla N° 4** obteniendo un rendimiento promedio de $15.67 \% \pm 1.12$.

**Tabla N° 4: Rendimiento del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L.
por el método de extracción Soxhlet**

Descripción	1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción
Gramos de hojas de Paico (g)	14.02	13.96	14.55
mL de disolvente (éter de petróleo)	150	150	150
Gramos de extracto (g)	2.05	2.17	2.45
Porcentaje de rendimiento (%)	14.62	15.54	16.84

Fuente: Registro de datos propios

Chavez y Sucari en el estudio realizado a *Mithostachys mollis* (Muña) utiliza el Hexano en uno de sus extractos obteniendo un rendimiento de 18.50%; porcentaje cercano al obtenido por nuestra planta extraída con éter de petróleo como disolvente cuyo porcentaje promedio fué de 15.67%. Esta cercanía entre ambos porcentajes de rendimiento obtenidas por extracción con Soxhlet podrían deberse a que ambas plantas aromáticas presentan una composición que si bien es cierto no es la misma en cuanto a la identidad química si se parecen en afinidad por el disolvente.⁽²⁸⁾

3.2.4. Determinación organoléptica del extracto etéreo

Mediante la observación, el olfato y el tacto se determinó las características organolépticas del extracto etéreo detalladas en la **Tabla N° 5**.

Tabla N° 5: Descripción organoléptica del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L.

Característica organoléptica	Descripción
Olor	Característico a la droga, intenso.
Color	Verde profundo
Aspecto	Blando y liso

Fuente: Registro de datos propios

3.3. ACEITE ESENCIAL

3.3.1. Obtención del aceite esencial.

Luego de realizada la recolección y selección de las hojas frescas se procedió a realizar la obtención de nuestro aceite esencial por el método de arrastre con vapor saturado de agua, según la metodología antes descrita, se realizaron tres extracciones debido al límite de la capacidad del destilador que impedía procesar los 10 kg de hojas de una sola vez, sin embargo, estas extracciones sirvieron para calcular el rendimiento del aceite esencial.



Figura N° 10. Equipo artesanal de destilación por arrastre de vapor

Se seleccionó la destilación por arrastre de vapor saturado como el método más viable al ser el método más utilizado según la bibliografía desde el punto de vista técnico y económico, fácil de implementar y no requerir de tecnologías sofisticadas, además de que en este método según Gonzales Villa (2004) es mayor la difusión del vapor a través de las membranas vegetales y es menor la desnaturalización del producto por hidrólisis.⁽⁴⁵⁾

3.3.2. Rendimiento del aceite esencial.

Para determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial se realizaron tres extracciones por el método de arrastre de vapor saturado dando como resultado los valores que detalla la **Tabla N° 6**, obteniendo tras estos resultados un

rendimiento promedio de $0.10\% \pm 0.015$, resultado que expresa el porcentaje de aceite esencial que se encuentra en las hojas de Paico.

Tabla N° 6: Rendimiento del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. utilizando el método de extracción por arrastre de vapor de agua.

Descripción	1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción
Kg de hojas de Paico	3.15	3.65	3.21
L aprox. de agua destilada	5	5	5
mL de aceite esencial	3.6	3.1	3.8
Porcentaje de rendimiento	0.10	0.08	0.11

Fuente: Registro de datos propios

El porcentaje de rendimiento obtenido del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. fué de 0.10%, porcentaje similar al 0.14% encontrado por Ibarra y Paredes (2013) en su estudio realizado a la misma planta; este bajo porcentaje de rendimiento del aceite esencial de Paico en ambos estudios pudo deberse a que el contenido de aceite esencial en la mayoría de plantas aromáticas según la bibliografía descrita por Villar del Fresno(2004)⁽¹²⁶⁾ no supera mayormente el 1%.⁽⁵¹⁾

3.3.3. Determinación organoléptica del aceite esencial

Mediante la observación, el tacto y el olfato se determinaron las características organolépticas propias del aceite esencial descritas en la **Tabla N° 7**.

Tabla N° 7: Descripción organoléptica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.

Característica organoléptica	Descripción
Olor	Característico a la droga, intenso.
Color	Ligeramente amarillo
Aspecto	Líquido oleoso, límpido.

Fuente: Registro de datos propios



Figura N° 11. Aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.

3.3.4. Evaluación físico química del aceite esencial

❖ Prueba de solubilidad

La **Tabla N° 8** muestra los resultados obtenidos de la prueba de solubilidad, estos resultados guardan relación con las características generales de los aceites esenciales descritas en la bibliografía, así el aceite esencial de Paico se determinó es insoluble en agua, y es soluble en alcohol.

Tabla N° 8: Prueba de solubilidad del aceite esencial.

Muestra	Solvente	Solubilidad
1 mL aceite esencial de Paico	0.5 mL de agua destilada	Insoluble
1 mL aceite esencial de Paico	1 mL de agua destilada	Insoluble
1 mL aceite esencial de Paico	3 mL de agua destilada	Insoluble
1 mL aceite esencial de Paico	0.5 mL etanol 96°	Insoluble
1 mL aceite esencial de Paico	1 mL etanol 96°	Soluble
1 mL aceite esencial de Paico	3 mL etanol 96°	Soluble

Fuente: Registro de datos propios

Dado que los aceites esenciales se componen de terpenos fundamentalmente y derivados poco solubles en agua, la mezcla como tal no es totalmente soluble y forma una fase orgánica, que al tener menor densidad del agua flota sobre esta como es el caso del *Chenopodium ambrosioides* L. que posee una densidad por debajo de uno a comparación del agua.⁽⁸⁶⁾

❖ Parametros físico químicos

La **Tabla N° 9**, describe los parámetros fisicoquímicos para el aceite esencial de Paico evaluado.

Tabla N° 9: Evaluación fisicoquímica del aceite esencial

Parámetro	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
Densidad (g/mL)	0.89958	0.89951	0.89954	0.89954
Índice de acidez (mg KOH)	2.81	2.82	2.81	2.81
Índice de refracción	1.4789			

Fuente: Registro de datos propios

La densidad determinada para el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides L.* en nuestra evaluación fué de 0.89954, densidad que guarda relación a la encontrada por Torres y Ricciardi (2003) ⁽¹¹⁹⁾, quienes obtuvieron una densidad de 0.8965 en una evaluación realizada a esta misma planta, esto se debería según Kuklinsky(2000) ⁽⁶¹⁾ a que la mayoría de aceites esenciales presentan una densidad inferior a la del agua, por ende inferior a la unidad.

El índice de refracción de nuestro aceite esencial de Paico fué de 1.4789, según León Romaní (2009) ⁽⁶⁴⁾ en el estudio que realizó al aceite esencial de esta misma planta, obtuvo a la misma temperatura un índice de refracción de 1.476; obteniendo ambos resultados una mínima diferencia entre sus valores.

El índice de acidez del aceite esencial en nuestra evaluación tuvo un promedio de 2.81 mg de KOH/g de aceite esencial, valor similar el encontrado por Santos Benavides (2013) quién indicó un promedio de 1.67 mg de KOH/g de aceite esencial de *Mentha piperita L* en su investigación. Este valor encontrado indica en ambos estudios la presencia de ácidos libres. ⁽¹⁰⁷⁾

3.4. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

La preparación de la cromatografía en capa fina realizada al extracto etéreo y al aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. tuvo como finalidad determinar la presencia de familias de metabolitos secundarios presentes en ambos productos.

Se debe tomar en cuenta que la cromatografía en capa fina realizada no cuenta con patrones de identificación de metabolitos específicos y los Rf obtenidos solo son de referencia, observándose únicamente la corrida cromatografica realizada.

3.4.1. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo.

❖ Identificación general

Se realizó la siembra por duplicado como indicó la muestra N° 1 y N° 2 de la figura N° 12.

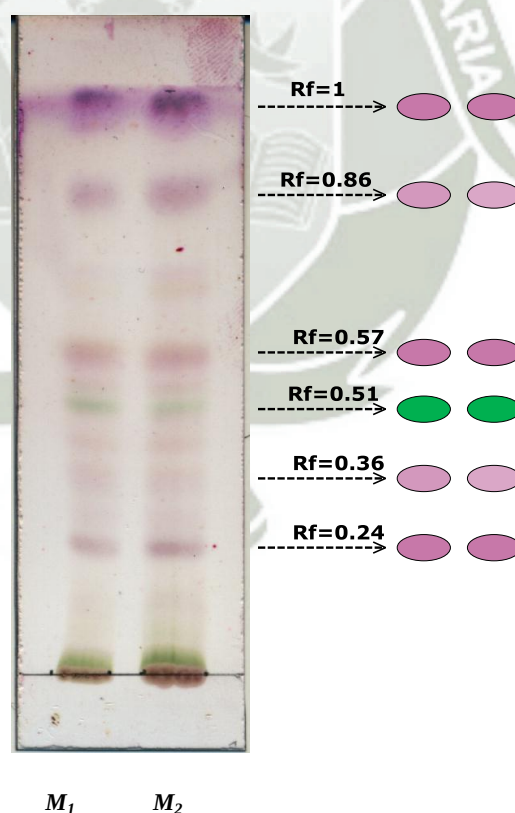


FIGURA N° 12. IDENTIFICACIÓN GENERAL DEL EXTRACTO ETÉREO DE PAICO: CCF

Fase Móvil: tolueno acetato de etilo 70:30

Revelador: Vainillina (1%) Ácido Sulfúrico (5%)

Fuente: Registro de datos propios

La cromatografía del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. mediante el método de cromatografía en capa fina, utilizó como revelador para la identificación general, la solución de vainillina en ácido sulfúrico, la cual evidenció la presencia de terpenos, debido a la aparición de manchas púrpura y también evidenció taninos tras la aparición de manchas rosa ligero como explica Villar del fresno (2000).⁽¹²⁶⁾

❖ Identificación de terpenos

Se realizó la siembra por duplicado como indicó la muestra N° 1 y N° 2 de la figura N° 13.



M1

M2

**Figura N°13. IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS TERPÉNICAS PARA EL
EXTRACTO ETÉREO DE PAICO: CCF**

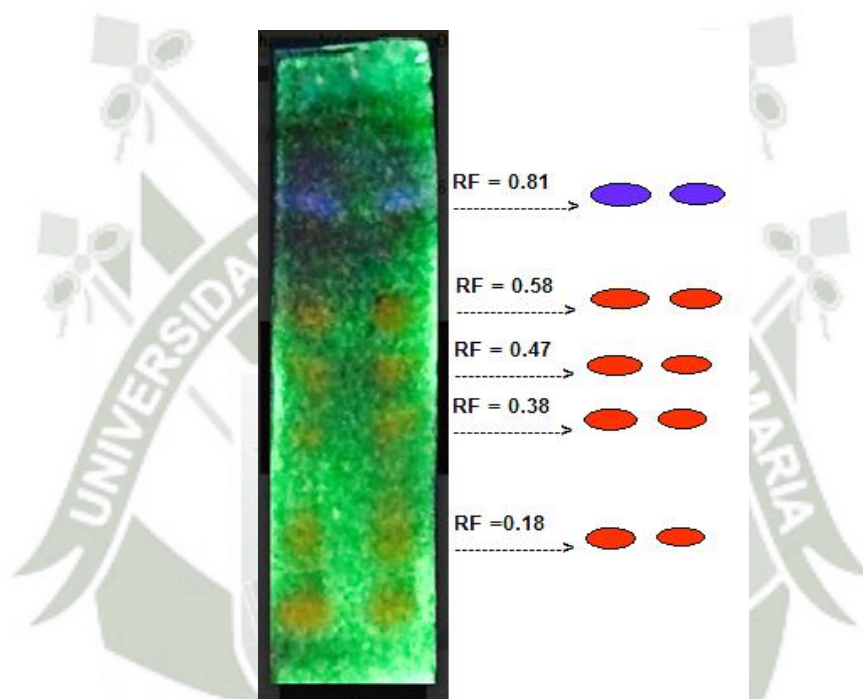
Fase Móvil: Dinitrofenilhidrazina, éter de petróleo (50:50)

Revelador: Liebermann Borchard

Fuente: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

La cromatografía del extracto etéreo de Paico, mediante el método de cromatografía en capa fina realizada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, utilizó como revelador Liebermann Burchard, el cual indica reveló la presencia de sustancias terpenicas luego de la aparición de manchas rojas, coloración que explica Carvajal(2009)⁽²³⁾ como característico de sustancias terpenicas.

Se realizó la siembra por duplicado como indicó la muestra N° 1 y N° 2 de la figura N° 14.



**Figura N° 14. IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS TERPÉNICAS PARA EL
EXTRACTO ETÉREO DE PAICO: CCF
Fase Móvil: Hexano, acetato de etilo (70:30)
Revelador: Liebermann Burchard
Fuente: registro de datos propios**

La cromatografía del extracto etéreo de Paico, mediante el método de cromatografía en capa fina, utilizó como revelador Liebermann Burchard, mostrando la presencia de sustancias terpénicas para el extracto, tras la aparición de manchas rojas y saponinas esteroídicas por la aparición de manchas azules, colores que explica como característicos de estos metabolitos Kuklinski (2000).⁽⁶¹⁾ La coloración dada pudo deberse a la acilación del anillo cromógeno por parte del ácido acético y anhídrido acético presentes en el revelador dando lugar a la formación de las coloraciones ya antes mencionadas según refiere Caminada (1998)⁽¹⁸⁾.

❖ Identificación de taninos

Se realizó la siembra por duplicado como indica la muestra N° 1 y N° 2 de la figura N° 15.

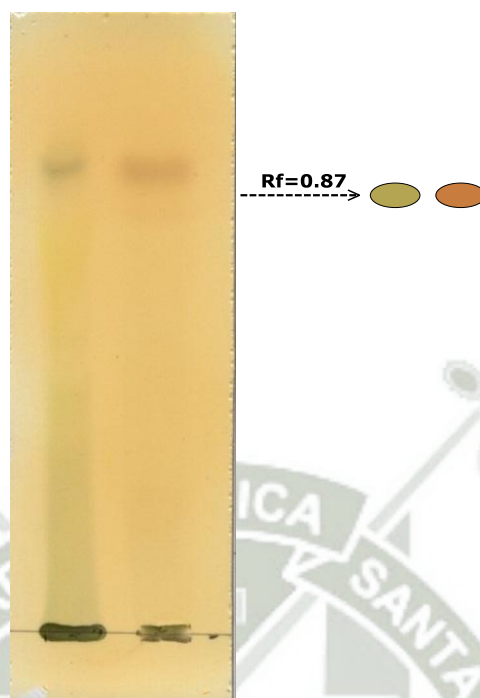


Figura N° 15. IDENTIFICACIÓN DE TANINOS PARA EL EXTRACTO ETereo DE PAICO: CCF
Fase Móvil: metanol, agua 75:25
Revelador: Cloruro férrico (1%)
Fuente: Registro de datos propios

La cromatografía del extracto etéreo de Paico, mediante el método de cromatografía en capa fina, utilizó como revelador Cloruro Férrico en solución etanólica al 1%, ello con el objetivo de revelar la presencia de taninos los cuales quedaron evidenciados luego de la aparición de manchas verdes y marrones según indica como colores característicos de estos metabolitos Villar del fresno (2000) ⁽¹²⁶⁾ y Kuklinski (2000). ⁽⁶¹⁾

Para el extracto etéreo de Paico también se realizaron conforme en el capítulo de metodologías, corridas cromatográficas a fin de detectar la presencia de flavonoides y alcaloides, para el primer caso se utilizó el reactivo revelador cloruro de aluminio y para el segundo el reactivo de Dragendorff, pese a que se realizaron repeticiones no se reveló la presencia de ambas familias de metabolitos secundarios.

3.4.2. Cromatografía en capa fina del aceite esencial

❖ Identificación general

Se realizó la siembra como indica la muestra de la figura N° 16.

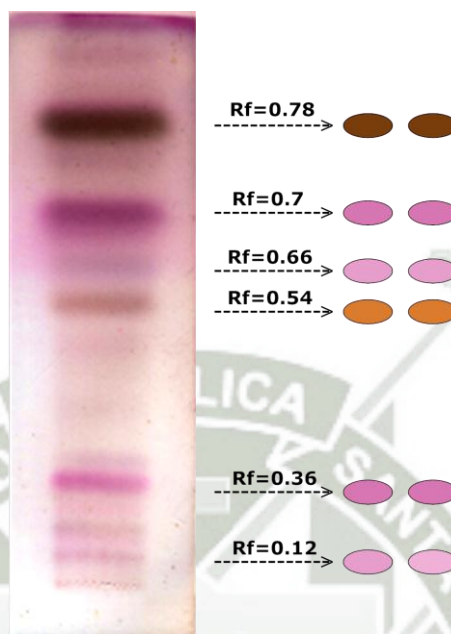


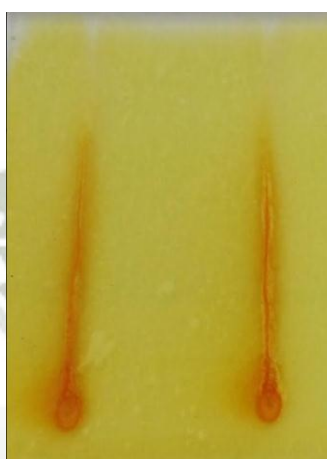
Figura N° 16. IDENTIFICACIÓN GENERAL PARA EL ACEITE ESENCIAL DE PAICO: CCF

Fase Móvil: tolueno acetato de etilo 70:30
Revelador: Vainillina (1%) Ácido Sulfúrico (5%)
Fuente: Registro de datos propios

Para la cromatografía general en capa fina del aceite esencial de Paico, se utilizó como revelador la solución de vainillina en ácido sulfúrico, revelando así la presencia de sustancias terpenicas, debido a la aparición de manchas de color púrpura, coloración que refiere como características de esos metabolitos Villar del fresno (2000).⁽¹²⁶⁾

❖ Identificación de terpenos

Se realizó la siembra por duplicado como indica la muestra N° 1 y N° 2 de la figura N° 17.



M1

M2

**Figura N° 17. IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS TERPENICAS PARA EL
ACEITE ESENCIAL DE PAICO: CCF
Fase Móvil: Dinitrofenilhidrazina, éter de petróleo (50:50)
Revelador: Liebermann Burchard
Fuente: Universidad nacional de Mayor de San Marcos**

La cromatografía del aceite esencial de Paico, mediante el método de cromatografía en capa fina realizada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, utilizó como revelador Liebermann Burchard el cual reveló la presencia de sustancias terpénicas debido a la presencia de manchas rojas expresa Carvajal(2009)⁽²³⁾.

Se realizó la siembra por duplicado como indica la muestra 1 y 2 de la figura N° 18.

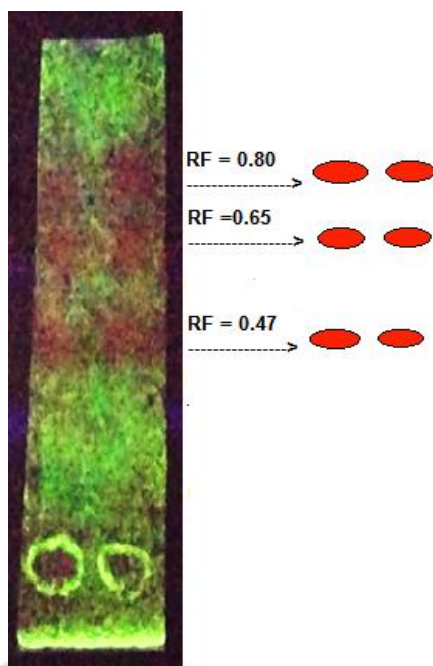


Figura N° 18. IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS TERPÉNICAS PARA EL ACEITE ESENCIAL DE PAICO: CCF
Fase Móvil: Hexano, acetato de etilo (70:30)
Revelador: Liebermann Burchard
Fuente: registro de datos propios

La cromatografía del aceite esencial de Paico, mediante el método de cromatografía en capa fina, utilizando como revelador Liebermann Burchard, reveló la aparición de manchas rojas debido a la presencia de sustancias terpenicas que indica como características de esta familia de metabolitos Carvajal(2009)⁽²³⁾.

3.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETÉREO.

Para la evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. (Paico) se utilizaron 25 muestras microbiológicas obtenidas de diferentes laboratorios de hospitales de la ciudad de Arequipa; 20 cepas bacterianas estuvieron conformadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y 5 cepas fúngicas por *Cándida albicans*, todas las cepas fueron identificadas por duplicado tanto en el laboratorio donde fueron obtenidas como en el presente estudio.^(anexo 1)

3.5.1. **Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. para las distintas cepas microbianas**

Posterior a la identificación de los microorganismos, la preparación de la emulsión madre y la preparación del inóculo, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria CMI del extracto etéreo mediante el método de dilución en tubo descrito en el capítulo anterior.

Se trabajó con las concentraciones de 300mg/mL hasta la concentración 2.341 mg/mL observándose un halo de turbidez apartir de la concentración de 75 mg/mL tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Staphylococcus epidermidis* y apartir de la concentración de 37.5 mg/mL para *Cándida albicans*. Para el caso de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* se observó halos de turbidez en todos los tubos por lo que no se pudo identificar el punto de ruptura para determinar su CMI en ambas bacterias.

Para el blanco se observó halos de crecimiento por lo que concluimos que tanto el caldo BHI y el emulgente TWEEN 80 no poseen efecto inhibitorio sobre ninguno de los microorganismos en mención.

3.5.2. **Determinación de la concentración bactericida mínima CBM del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. para las distintas cepas microbianas**

Determinada la concentración mínima inhibitoria del extracto etéreo mediante la identificación del punto de ruptura entre el crecimiento y la inhibición de la actividad microbiana en los tubos, se realizó un subcultivo de todos los tubos utilizando el método de siembra en placa con agar Muller Hinton para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y agar Saboraud para *Cándida albicans*.

Luego del periodo de incubación determinado para cada microorganismo, se procedió a realizar la determinación de la concentración

bactericida mínima del extracto etéreo con la finalidad de observar efecto bactericida o fúngica en las placas sembradas obteniéndose como resultado actividad bactericida para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* a partir de una concentración de 150 mg/mL y para *Cándida albicans* a partir de 75mg/mL mientras que para *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* no se observó ningún efecto del extracto etéreo ya que al igual que su actividad inhibitoria se observó crecimiento en todas las placas.

Para el subcultivo del blanco se observó crecimiento en la placas por lo que se llegó a la conclusión que tanto el caldo BHI y el emulgente TWEEN 80 no poseen efecto bactericida sobre ninguno de los microorganismos en mención.

3.5.3.Frente a *Staphylococcus aureus*

La **Tabla No 10** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de 5 diferentes muestras de distintos hospitales.

Tabla N° 10: CMI y CMB del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext (mg/mL)		300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.341	0
CMI	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	+	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano.

Se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) coincide con la concentración bactericida mínima (CBM) a una concentración de 150mg/mL, cabe notar que existió un caso de inhibición en la muestra N°3 a una concentración de 75 mg/mL, sin embargo este no presentaría mayor relevancia, ya que se trata de una sola muestra.

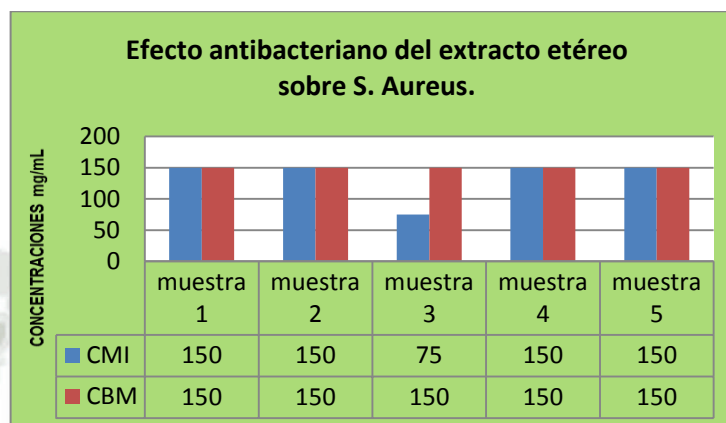


FIGURA N°19: Efecto antibacteriano de extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L.* sobre *S. Aureus*.

Fuente: Registro de datos propios.

3.5.4.Frente a *Staphylococcus epidermidis*

La **Tabla N° 11** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L* “Paico” frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de 5 diferentes muestras de hospitales.

Tabla N° 11: CMI y CBM del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L* frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus epidermidis*.

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext (mg/mL)		300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.341	0
CMI	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	+	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano.

Se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) coincide con la concentración bactericida mínima (CBM) a una concentración de 150mg/mL, cabe notar que no existió actividad bactericida en la muestra N°4 a una concentración de 150 mg/mL, sin embargo este no presentaría mayor relevancia, ya que se trata de una sola muestra.

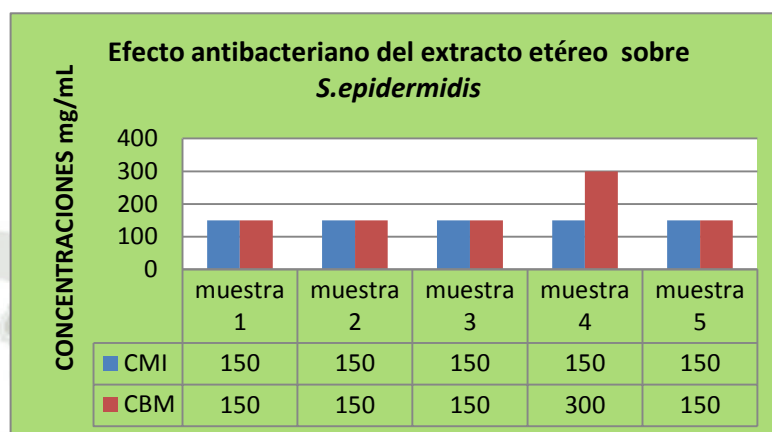


Figura N° 20. Efecto antibacteriano de extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L.* sobre *S. Epidermidis*.

Fuente: Registro de datos propios.

3.5.5.Frente a *Pseudomona aeruginosa*

La **Tabla N°12** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L.* “Paico” frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 12: CMI y CMB del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides L* frente a cepas hospitalarias de *Pseudomona aeruginosa*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext (mg/mL)		300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.341	0
CMI	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

Se observó que tanto para la concentración mínima inhibitoria (CMI) como para la concentración bactericida mínima (CBM) no hubo actividad bacteriostática ni bactericida de este extracto para ninguna de las muestras.

3.5.6.Frente a *Escherichia coli*

La **Tabla N°13** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a cepas de *Escherichia coli* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 13: CMI y CMB del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. frente a cepas de *Escherichia coli*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext (mg/mL)		300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.341	0
CMI	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

Se observó que tanto para la concentración mínima inhibitoria (CMI) como para la concentración bactericida mínima (CBM) no hubo actividad bacteriostática ni bactericida de este extracto para ninguna de las muestras.

3.5.7.Frente a *Cándida albicans*

La **Tabla N°14** expone los resultados de la actividad antifúngica del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a cepas de *Cándida albicans* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 14: CMI y CMB del extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas de *Cándida albicans*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext (mg/mL)		300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.341	0
CMI	Muestra 1	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento fúngico / (+) con crecimiento fúngico

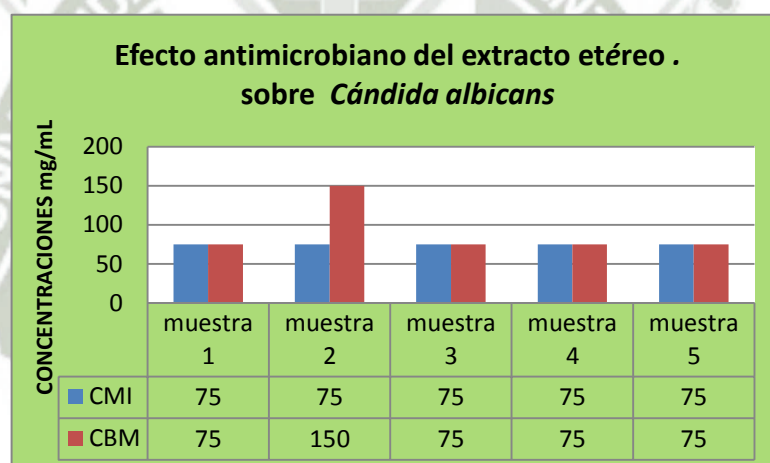


Figura N°21. Efecto antimicrobiano de extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *C. albicans*.

Fuente: Registro de datos propios.

Se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de este extracto coincide con la concentración fungicida mínima (CFM) a una concentración de 75 mg/mL, cabe notar que no existió actividad fungicida en la muestra N°2 a una concentración de 75 mg/mL, sin embargo este no presenta ría mayor relevancia, ya que se trata de una sola muestra.

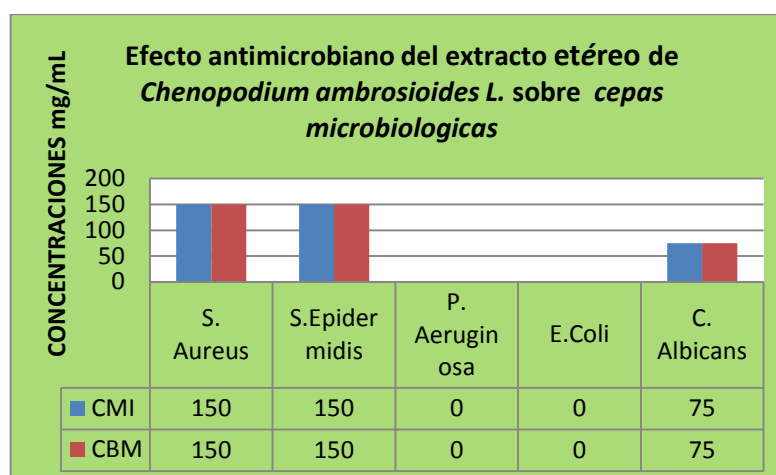


Figura N°22. Efecto antimicrobiano de extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cepas microbiológicas.

Los extractos etéreos de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. utilizaron para su obtención el método de extracción con Soxhlet no mostrando actividad representativa sobre bacterias Gramnegativas como es el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli* que según Tórtora (2007)⁽¹²⁰⁾ la resistencia que presentan se debería a la membrana externa de estas que actúa como barrera para muchas sustancias, incluidos los antibióticos. Sin embargo el extracto etéreo de nuestra planta causó efecto sobre la mayoría de las bacterias Grampositivas como *S. aureus* y *S. epidermidis* a concentraciones de 150 mg/mL siendo la misma concentración tanto para la CMI y la CBM; Daud Thoene (2008)⁽¹¹⁶⁾ frente a la actividad bacteriana de *Polylepis australis bitter* como bactericida, explica que el comportamiento de las bacterias Grampositivas frente al extracto podría deberse a la alteración de la superficie celular de estas bacterias, que desencadenaría finalmente en la muerte celular de las mismas.

En el caso de *C. albicans* la concentración mínima inhibitoria y fungicida fue de 75 mg/mL para ambas teniendo la mayor sensibilidad frente al comportamiento de las bacterias Grampositivas como lo explica Martínez M. (2000)⁽⁷⁴⁾ en la evaluación antimicrobiana del extracto de *Schinus terebinthifolius raddi* donde *Candida albicans* presenta mayor sensibilidad al extracto que demás las Grampositivas.

Por otro lado los estudios fitoquímicos realizados en el extracto etéreo de hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. demostraron la presencia de terpenos y taninos los cuales podrían contribuir a la acción antimicrobiana y antifúngica de la planta sobre las bacterias ya mencionadas según Villar del Fresno (2000) ⁽¹²⁶⁾ así también Ruiz (2013) ⁽¹⁰⁴⁾ en su investigación de extractos de plantas del nor-oriental peruano le atribuye una posible actividad bacteriana a la presencia de taninos en los extractos de *Cassia reticulata*, *Piper lineatum*, *Ilex guayusa* y *Terminalia catappa* frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* y *C. albicans*.

3.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL

Para la evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. se utilizaron 25 muestras microbiológicas obtenidas de diferentes laboratorios de hospitales de la ciudad de Arequipa, 20 cepas bacterianas estuvieron conformadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y 5 cepas fúngicas por *Cándida albicans* todas ellas fueron identificadas por duplicado tanto en el laboratorio donde fueron obtenidas como en el presente estudio realizado. ^(anexo 1)

3.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. para las distintas cepas microbiológicas.

Posterior a la identificación de los microorganismos, la preparación de la emulsión madre y la preparación del inóculo se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria CMI del aceite esencial. Para ello se utilizó el método de microdilución en microplacas con celdas o pocillos en “U”, como se describió en el capítulo II, se trabajó con una concentración inicial para la primera celda de 40 uL/mL hasta llegar a una concentración de 5 uL/mL para la octava celda, observándose ausencia del halo de turbidez para *Staphylococcus aureus* a partir de la concentración de 25 uL/mL, para *Staphylococcus epidermidis* a partir de la concentración de 20 uL/mL, para *Escherichia coli* a partir de la concentración de 35 uL/mL y para *Cándida albicans* a partir de la concentración de 30 uL/mL, para el caso de *Pseudomona aeruginosa* se observó halos de turbidez en todas las celdas

por lo que no se identificó el punto de ruptura para determinar su CMI en esta bacteria.

3.6.2. **Determinación de la concentración bactericida mínima CBM del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L para las distintas cepas microbiológicas.**

Determinada la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial mediante la identificación del punto de ruptura entre el crecimiento y la inhibición de la actividad de los microorganismos en las celdas, se realizó un subcultivo de todas las celdas utilizando el método de siembra en placa con agar Muller Hinton para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* y agar Sabouraud para *Cándida albicans*, luego del periodo de incubación determinado para cada microorganismo, se procedió a realizar la determinación de la concentración bactericida mínima del aceite esencial con la finalidad de observar efecto bactericida o efecto fungicida en las placas sembradas, obteniéndose como resultado actividad bactericida para *Staphylococcus aureus* a partir de la concentración de 25 uL/mL, para *Staphylococcus epidermidis* a partir de la concentración de 20 uL/mL, para *Escherichia coli* a partir de la concentración de 35 uL/mL y actividad fungicida para *Candida Albicans* a partir de la concentración de 30 uL/mL, para el caso de *Pseudomona aeruginosa* no se observó actividad bactericida ya que al igual que su actividad inhibitoria se observó crecimiento en todas las placas.

Para el blanco se observó crecimiento en todas las placas por lo que concluimos que tanto el caldo BHI y el emulgente TWEEN 80 no poseen efecto bactericida sobre ninguno de los microorganismos en mención.

3.6.3. **Frente a *Staphylococcus aureus***

La **Tabla N°15** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de 5 diferentes muestras de distintos hospitales.

Tabla N° 15: CMI y CMB del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext. (µL/mL)		40	35	30	25	20	15	10	5	0
CMI	Muestra 1	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	—	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	—	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-)sin crecimiento bacteriano / (+)con crecimiento bacteriano

Se observó que el aceite esencial presentó efecto antimicrobiano contra este microorganismo a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 25µL/mL, y que la concentración bactericida mínima (CBM) fué de 25µL/mL, pese a que existió efecto bacteriostático y bactericida a una concentración de 20 µL/mL en la muestra N°1, este no presenta mayor relevancia, ya que se trata solo de una muestra.

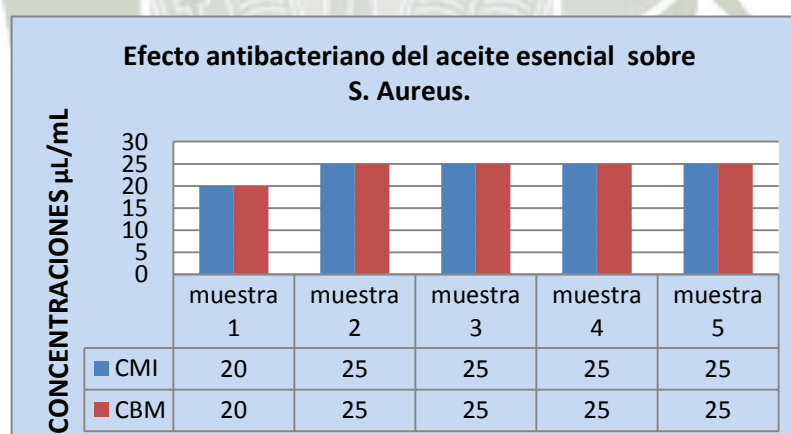


Figura N° 23. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *S. aureus*.

Fuente: Registro de datos propios

3.6.4.Frente a *Staphylococcus epidermidis*

La **Tabla N°16** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a cepas de

Staphylococcus epidermidis provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 16: CMI y CMB del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas hospitalarias de *Staphylococcus epidermidis*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext. (µL/mL)		40	35	30	25	20	15	10	5	0
CMI	Muestra 1	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	—	—	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	—	—	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

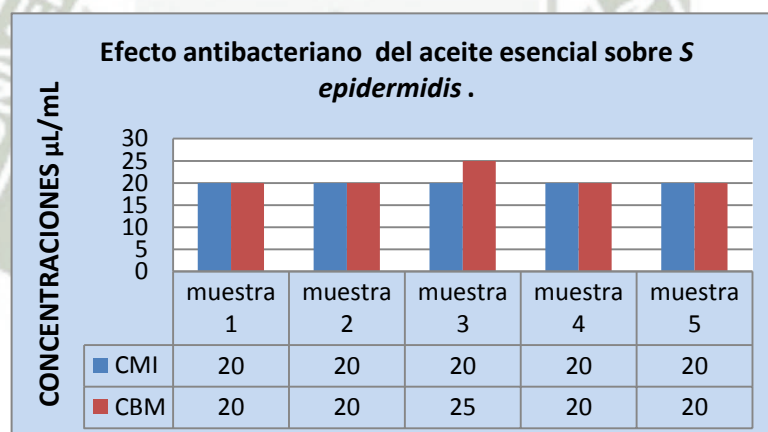


Figura N°24. Efecto antibacteriano del aceite de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *S. Epidermidis*.

Se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) fué de 20µL/mL, y que para la concentración bactericida mínima (CBM), tuvo el mismo valor, salvo en la muestra N° 3 donde no hubo efecto bactericida a esta concentración, sin embargo no tendría relevancia ya que solo se trata de una sola muestra.

3.6.5.Frente a *Pseudomona aeruginosa*

La **Tabla N°17** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 17: CMI y CMB del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas hospitalarias de *Pseudomona aeruginosa*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext. (µL/mL)		40	35	30	25	20	15	10	5	0
CMI	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

Se observó que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” no presentó acción bacteriostática o concentración mínima inhibitoria (CMI) y que tampoco tuvo efecto bactericida o concentración bactericida mínima (CBM) contra esta bacteria.

3.6.6.Frente a *Escherichia coli*

La **Tabla N°18** expone los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” frente a cepas de *Escherichia coli* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N°18: CMI y CMB del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L frente a cepas hospitalarias de *Escherichia coli*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext. (μL/mL)		40	35	30	25	20	15	10	5	0
CMI	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+
CBM	Muestra 1	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	+	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

Se observó que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. presentó efecto antimicrobiano contra este microorganismo a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 35μL/mL, y que para la concentración bactericida mínima (CBM) fué de 35μL/mL, pese a que la muestra N° 5 hubo efecto bacteriostático y bactericida a la concentración de 30 μL/mL, este no presentó mayor relevancia, ya que se trató de una sola muestra.

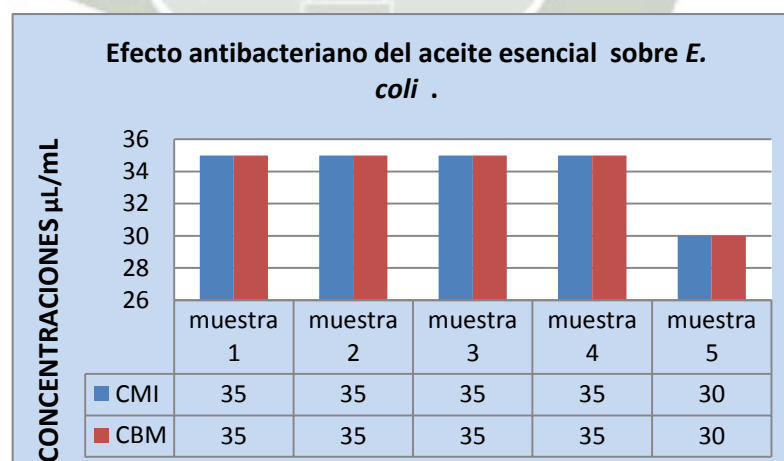


Figura N°25. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *E.coli*.

Fuente: Registro de datos propios

3.6.7. Frente a *Cándida albicans*

La **Tabla N°19** expone los resultados de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” frente a cepas de *Cándida albicans* provenientes de 5 diferentes muestras de diversos hospitales.

Tabla N° 19: CMI y CFM del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. frente a cepas hospitalarias de *Cándida albicans*

Descripción		1	2	3	4	5	6	7	8	B
Cc final Ext. (µL/mL)		40	35	30	25	20	15	10	5	0
CMI	Muestra 1	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+
CFM	Muestra 1	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Muestra 2	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 4	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Muestra 5	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Fuente: Registro de datos propios

(-) sin crecimiento bacteriano / (+) con crecimiento bacteriano

Se observó que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. presentó efecto antimicrobiano a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 30µL/mL, y que para la concentración bactericida mínima (CBM) fué de 30µL/mL, pese a que en la muestra N°1 hubo efecto fungistático y fúngida a una concentración de 25 µL/mL, este no presentó mayor relevancia, ya que se trató solo de una muestra.

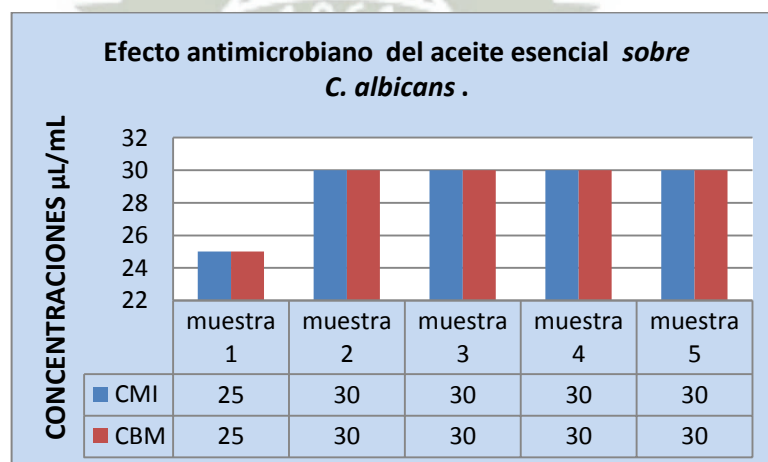


Figura N°26. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *C. albicans*.

Fuente: Registro de datos propios

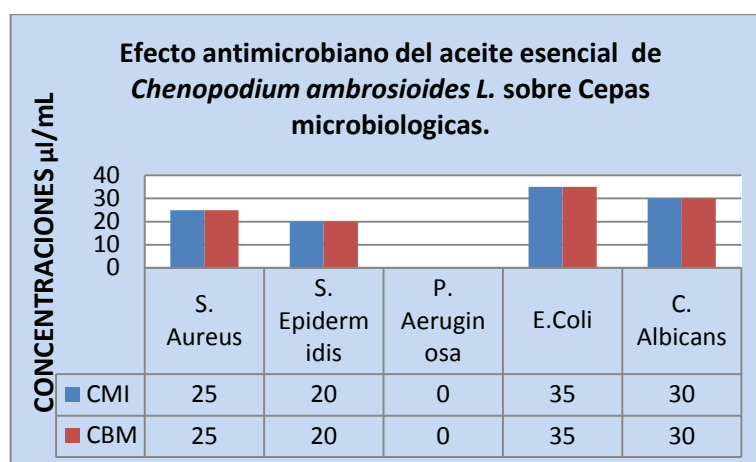


Figura N°27: CMI y CMB del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” para los distintos microorganismos evaluados.

Fuente: Registro de datos propios

Los resultados de la actividad bacteriana y antimicótica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. no mostraron actividad sobre *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones, mientras que para *E. Coli* tuvo actividad inhibitoria y bactericida a la concentración de 35 µg/mL, en el caso de las bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. epidermidis*, el aceite tuvo mayor actividad y presentaron valores de la CMI y la CBM entre 20 y 25 µg/mL, resultados que comparados con el estudio realizado por Pino Alea (1996)⁽⁹⁵⁾ al aceite de *Lippia alba*, tuvieron un comportamiento similar, donde es probable que las bacterias Gram negativas presentaron menor actividad que las Gram positivas y no tuvo ningún efecto antibacteriano sobre *P. aeruginosa* al igual que nuestro estudio, esto podría deberse a las diferencias estructurales entre gram positivas y negativas.

La pared celular en las Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las Gram positivas está formada sólo por un tipo de molécula indicó Murray (2009)⁽⁸³⁾; por otro lado en su investigación Jaramillo (2012)⁽⁵³⁾, indicó que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. presentó marcada actividad fumigante y antifúngica, cuya actividad pudo deberse a la presencia de isoprenos (terpenos) presentes en esta planta y *C. albicans* presentó actividad antifúngica tanto en la CMI como en la CBM a una concentración de 30 µL/mL.

CONCLUSIONES

Primera

Se determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etéreo y el Aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Cándida albicans*.

Segunda

Se obtuvo de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” un extracto etéreo blando y aceite esencial; mediante los cuales se evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, y *Cándida albicans*.

Tercera

Mediante el método de extracción con Soxhlet se logró obtener un extracto de aspecto blando con un rendimiento promedio de 15.67% con ± 1.12 , por otra parte, mediante el método de extracción por corriente de vapor de agua, se logró obtener el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” con un rendimiento promedio de 0.1%.

Cuarta

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” presentó solubilidad en alcohol etílico, tuvo una densidad de 0.89954 g/mL, un índice de refracción de 1.4789, índice de acidez de 2.8 mg de KOH/g de aceite esencial.

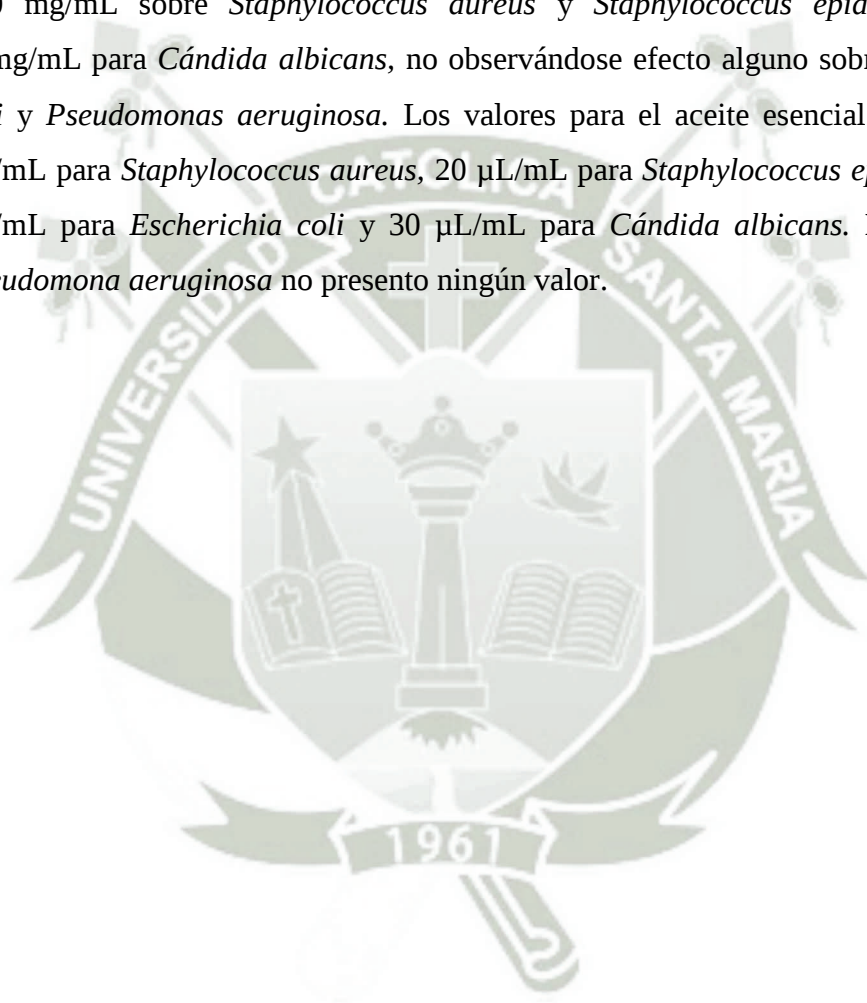
Quinta

Mediante el procedimiento de cromatografía en capa fina (CCF) se detectó en el extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” la presencia de sustancias terpenicas y taninos, siendo negativo para flavonoides y alcaloides.

Por su parte mediante el mismo método de análisis en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” se observó la presencia de sustancias terpenicas.

Sexta

Se determinó que hay actividad bacteriana tanto en el extracto etéreo como en el aceite esencial siendo los resultados finales de la CMI y CBM para el extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” frente a las diferentes cepas bacterianas de 150 mg/mL sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y de 75mg/mL para *Cándida albicans*, no observándose efecto alguno sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los valores para el aceite esencial fueron de 25 μ L/mL para *Staphylococcus aureus*, 20 μ L/mL para *Staphylococcus epidermidis*, 35 μ L/mL para *Escherichia coli* y 30 μ L/mL para *Cándida albicans*. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* no presento ningún valor.



SUGERENCIAS

Primera

Mediante un estudio de línea toxicológica evaluar la seguridad tanto del extracto etéreo como del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” en animales de experimentación.

Segunda

Realizar un estudio preclínico *in vivo* para evaluar la eficacia antimicrobiana tanto del extracto etéreo como del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. “Paico” en animales de experimentación.



BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca Fernández D., Gonzales Alcos V., Efectividad del “*Chenopodium ambrosioides*” y “*Cucurbita máxima Duch*” para el tratamiento de parasitosis en escolares de primaria, ciudad de Puno-Perú. Revista de investigación (Esc. Post-Grado) 2009; V. 5 No 3.
2. Ali G Al-kaf, Rebecca A Crouch, Annika Denkert, et al. Chemical composition and biological activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* from Yemen. American Journal of Essential Oils and Natural Products. 2016, Pág. 20-22.
3. Alonso Jorge, Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas. 1ª Edición. Editorial ISIS. 2004. Argentina.
4. Aguilar M., Tovar D., Sáenz A., Evaluación antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* en cepas del tracto digestivo. México.
5. Arenas Camac Y., Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de la resina de *Copaifera paupera* (Copaiba) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida Albicans* Arequipa 2013.UCSM.
6. Álvarez C., Rodríguez P., Carvajal E., Efecto del extracto (*Chenopodium ambrosioides*), en parásitos gastrointestinales de gallos de pelea (*Gallus domesticus*), JDC Cultura científica, 2011.
7. Barba L., Larios A., Hernández R., Jerónimo B., Pruebas generales para lípidos, Practica No 16, Instituto tecnológico de estudios superiores de Monterrey, 2013, México.
8. Biasoli M., Candidiasis, CEREMIC, Centro de referencia de Micología.
9. Bonkanka Tabares C., Evolución farmacológica de Terpenos y flavonoides de origen vegetal, Ciencias y tecnologías, Curso 2006.
10. Bravo Díaz Luis: Farmacognosia. 1ª Edición. 2003. Editorial El Sevier. Madrid, España.
11. Bruneton J., Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Edición. 2001. Editorial Acribia S.A.

12. Caceres A., et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections .Evaluation of antifungal activity of seven American plants .J Ethnopharmacol 1993; 40(3):207-13.
13. Caceres A., Figueroa L., Taracena A., Samayoa E., Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases ,2: Evaluation of 16 plants against Gram positive bacteria. J Ethnopharmacol 1993; 39:77-82.
14. Caceres A., Lopez BR, Giron MA., Logermann H., Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections .Screening for antimycotic activity of 44 plants extract. J Ethnopharmacol 1991; 31(3):267-76.
15. Cabello Navas, Belloso Morales Genette, Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad bacteriana de los extractos acuoso, etanólico y cloroformico de *Piper nigrum* L. Revista científica UDO Agrícola Universidad de Oriente Press ISSN: 1317-9152 Vol. 9 No 3, 2009, 705-710.
16. Cahui Valencia L., “Efecto del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Miller (Marco) sobre bacterias “in vitro” *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *proteus mirabilis*”, UCSM. Arequipa, 2005.
17. Calderón Gómez E., Estudio de aceites esenciales Colombianos III, Aceites esenciales de Eucaliptus I. Revista colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas; pág. 95-104.
18. Caminada Bonett A., Análisis Fitoquímico y evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de hojas de *Stachytarpetta cayennensis* “Yanahuacta” en animales de experimentación Arequipa 1997-1998, Universidad Católica de Santa María.
19. Cano Pérez C., Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2007.
20. Cantón R., Cercenado E., Métodos de Identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica, 2010.
21. Carhuapoma M., López S., Roque M., Velapatiño B., Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys Mollis griseb* “Ruyac muña” .Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2009; 12(2):83-89.
22. Carrión Jara A., García Gómez C., Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de Metódica”, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de la Cuenca, 2010, Ecuador.

23. Carvajal L., Hata y., *et al.* Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*strych nos schultesiana* krukoff).Revista Colombia forestal (2009).
24. Castañeda Briones María T., Microbiología aplicada, Manual de laboratorio, División de ciencias básicas e ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana.
25. Castelblanco L., Sanabria O., Cruz A., Rodríguez C., Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas *Boophilus microplus*. Revista Cubana de plantas medicinales Vol.18 No1 Ciudad de la Habana, 2013.
26. Castro Zurita V., Marcilla Truyenque S.: efecto bactericida y fungicida in vitro del aceite esencial de la *matricaria recutita* (manzanilla) frente a microorganismos aislados de lesiones bucofaríngeas. Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2004.
27. Chávez Giráldez R., Loo Kuoc M., Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos del *Desmodium molliculum* (H.B.K) DC. Arequipa – 1997. Universidad Católica de Santa María.
28. Chavez Soto J.; Sucari Morales F.: Estudio del efecto espasmolítico in vitro de los extractos de *minthostachys mollis* (muña) y *senecio mutans* (chachacoma) en ileon aislado de rattus. Universidad Católica de Santa María. Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2007.
29. Chevalier A., La enciclopedia de plantas medicinales. Dorling, Kindersley, 1996, Londres.
30. CODEX, Normas del Codex para aceite de Oliva y aceite de Orujo de Oliva. Secretaria del programa de conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias FAO.
31. Collins C., Lyne P., Métodos Microbiológicos. 5ª Edición, 1989. Editorial Acribia, SA. España.
32. Córdova Callo L., Determinación de la actividad antimicrobiana de las semillas de *Carica papaya* L “papaya” *in vitro* frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Universidad Católica de Santa María. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2013.
33. Corzo A.G., Bravo E. Serrano F., Vattuone M., Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba,Griseb*, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas .Quebracho Vol. 17 (1,2) (106-114), 2009.

34. Cuba V., Saavedra M.: Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *Larrea divaricata* cav “jarilla” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Universidad Católica de Santa María. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Arequipa 2012.
35. Daud Thoene A., Habib Intersimone N., Sánchez Riera A., Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis Bitter* (queñoa), Universidad Nacional de Tucumán (UNT) , Revista Cubana de Plantas Medicinales ,2007,12(4).Tucumán, Argentina.
36. Erazo Proaño E., “Separación y caracterización de los metabolitos secundarios de la hiedra (*hedera helix*) de Ecuador con fines de aporte a una técnica de identificación”. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, 2013.
37. Flores Gutiérrez M., Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso, Universidad de Chile, 2010, Santiago de Chile.
38. Flores Quisbert E., Metabolitos secundarios de bioactivos de especies del género *Piper* de la flora Boliviana. Ciencias y tecnologías, Curso 2006.
39. Gadano A., Gurni A., Lopez P., Ferraro G., Carballo M., In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium Ambrosioides* L. J Ethnopharmacol ,81(1):11-16.2002.
40. García Apac C., Pardo Valdespino J., Seas Ramos C., Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso, Rev. Med. Hered. 14(4), 2003 221.
41. García R., Herrera F., Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium* cepa estudio preliminar in vitro. Facultad de ciencias Básicas Universidad de Pamplona .2007.
42. Gómez Castellanos J.R., Epazote (*Chenopodium ambrosioides*) Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica y biogénesis de su principal principio activo *ascaridol*. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromaticas ,2008.7:3-9. México.
43. González S. Huaiquinao L., Gonzales A., Van Baren C., et al; Uso popular del paico y composición química de su aceite esencial en la zona de Esquel (Chubut, Argentina).

44. González Olaechea y Franco M., Whisper To Me, Tano4595, CEM-bot, Miguel Chong, Rei-bot; Distrito de la Joya.2015.
45. González Villa A., Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas, Universidad nacional de Colombia sede Manizales departamento de Ingeniería Química, 2004 Bogotá, Colombia.
46. Granados Pérez R., Villaverde Peris M.: Microbiología Tomo 1. 1ª Edición, 2003. Editorial Thomson Paraninfo. Madrid, España.
47. Guerra Corado A.; Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería Escuela de Ingeniería Química. Guatemala, Julio de 2005.
48. H. A. Peredo Luna, E. Palou García y A. López Malo, Aceites esenciales: Métodos de extracción .Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 3-I 2009.:24-32. Puebla México.
49. Hilario I., Juan A., Laguna F., Larios G., Cromatografía en capa fina, Instituto politécnico Nacional, 2013.
50. Huaricallo Quispe L., Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de los extractos de *Lipidium chichicara* “JHANUCARA” sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* Arequipa 2014”, Universidad Católica de Santa Maria.
51. Ibarra Martínez M., Paredes Paredes E., Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (*Ambosia arborecens* Mill) y Paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética. Universidad Politécnica Salesiana, 2013, Quito, Ecuador.
52. James Robbers, Varro Tyler, Las Hierbas Medicinales de Tyler. 1ª Edición. Editorial Acribia. 2003.
53. Jaramillo Beatriz E., Duarte R. Edison, Delgado Wilman. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides* Colombiano .Revista Cubana de Plantas Medicinales 2012;17(1) 54-64.Bogota ,Colombia
54. Jave Márquez M., Microbiología Farmacéutica I, Facultad de Farmacia y Bioquímica UCSM, Arequipa ,2010.
55. Jave Márquez M., Microbiología Farmacéutica II, Facultad de Farmacia y Bioquímica UCSM, Arequipa ,2011.

56. Jorge A. Pino Alea, Ariel G. Ortega Luis, Arístides Rosado Pérez, Mayra Rodríguez Jorge y Ricardo Baluja, Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.)n.e. Brown ,Instituto de Investigaciones para la industria Alimenticia .1995. Cuba.
57. Joseph M., Torres -Rodríguez, Neus Madrenys, Teresa Jiménez, Pere Saballs. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco anti fúngicos utilizando un micro método de dilución estandarizado y el E-test .Rev. Iberoam. 1997; 14:115-118.Barcelona, España.
58. Julio Ruiz Q., Mirtha Roque A., Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente Peruano. Ciencia e investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2009,12(1):41-47.
59. Kalembea., Actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela”, 2003.
60. Kayser Fritz y col: Medical Microbiology. 10ª Edition. 2005. Editorial Thieme.
61. Kuklinski C., Farmacognosia, Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas De Origen Natural, 1ª Edición, 2000. Ediciones Omega S.A. España
62. Lamarque A., Fundamentos Teórico Prácticos de Química Orgánica. 1ª Edición. Editorial Brujas, 2008.
63. Leal E., López A., Sosa M., Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semillas de cilantro (*Coriandrum sativum*); Universidad de las Américas Puebla; Temas selectos de la Ingeniería de Alimentos 7-1(2013):97-103.
64. León Romaní Ciria Z., Estudio de la extracción y determinación de la composición química del aceite esencial de Paico (*Chenopodium ambrosioides* L.), Universidad Nacional del Callao.
65. Lizcano Ramón A., Vergara González J., Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceite esencial de las especies vegetales “*Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *pasiflora manicata*” frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos, Pontificia Universidad Javeriana, 2008, Bogotá, Colombia.
66. López Luengo M., Los aceites esenciales Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. Ámbito farmacéutico Fitoterapia. Vol. 23 No 7; 2004.

67. Lock de Ugaz O., Investigación fitoquímica métodos en el estudio de productos naturales. 1ª Edición. 1988. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
68. Mamani Nina V., Huallpa Olguin J., Actividad antifúngica y antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo de olor) frente a *C. albicans*, *E. coli* , *Pseudomona aeruginosa* , *S. aureus* y *S. pyogenes* Arequipa 2012.UCSM, Arequipa
69. Manzano Hernández Y., Inocencio Velásquez A., Martínez G., Determinación de extracto etéreo, practica N° 2 ,2008. Morelia, Mich.
70. Marca Cuello M., Actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538 ,2012,Tacna
71. Martínez A., Aceites esenciales .Universidad de Antioquia 2003, Medellín Colombia.
72. Martínez A., Valencia G., Jiménez N., Galeano E., Manual de Practicas de Laboratorio de Farmacognosia y Fotoquímica 2008, Medellín, Colombia.
73. Martínez María J., López de Barreiro M., Morejón Rodríguez Z., Rubalcaba Y., Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal); Revista Cubana de plantas medicinales .2000.La Habana, Cuba.
74. Martínez María J., Molina N., Boucourt E., Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium Guajava* L (Guayaba).1997.Cuba
75. Martinez Maria J., Betancourt J., Gonzales N., Jauregui A., Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity.
76. Medina Bernal M., Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de extracto de *Equisetum giganteum* L. (Cola de caballo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* y *Cándida albicans* Arequipa 2015. Universidad Catolica de Santa Maria.
77. Mejía nova F., Extracción de aceites esenciales de Romero (*Rosmarius officinalis*), Tecnología de aceites y grasas, Universidad Nacional de San Agustín.
78. Montero María M., “*Pseudomona aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos”, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina, 2012.

79. Monzote Fidalgo L., Potencial terapéutico del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* y algunos de sus componentes frente a *Leishmania*
80. Moran J., Determinación de la actividad antimicótica in vitro de aceite esencial de *Schimus molle linneo* frente a *Cándida albicans* .Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2009.Tacna
81. Moreno González M., Ruiz Galindo E., *Staphylococcus epidermidis* formador de Biofilm en Blefaroconjuntivitis, Revista médica del hospital general de México.
82. Mostacero J., Mejía F., Gamarra O., Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. 1ª Edición. Editorial Normas Legales S.A.C, 2002, Perú.
83. Murray P., Rosenthal k., Faller P.; Microbiología Medica. 6ª Edición. Editorial Gea. El Sevier España; 2009.
84. NMX-F-089-S-1978, Determinación de extracto etéreo (Método Soxhlet) en aliemntos, Determination of ether extract (Soxhlet), Normas mexicanas, Dirección general de Normas
85. NMX-K-129-1976., Determinación del índice de refracción en aceites esenciales y productos aromáticos. Method of test for refractive index of essential oils and aromatic substances, Normas mexicanas, Dirección general de Normas.
86. Ortuño Sánchez M., Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes, Ediciones Ayana, 2006 pág. 107.
87. Orué Béjar C., Rebaza Peñafiel F., Evaluación de la actividad bacteriana in vitro del extracto etanólico de frutos y hojas de *Psidium guajava* L. “Guyaba” frente a *Staphylococcus aereus* ATCC 25923, *Escherichia Coli* ATCC 25922, *Pseudomona Aeruginosa* ATCCç 27853, UCSM, Arequipa ,2013.
88. Osorio Durango E., Aspectos Básicos De Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica.2004
89. Ossa G., Boehme C., Infecciones estafilocócicas, Universidad de la frontera, Temuco, Chile.
90. Padilla G., Gil Archilla E., Actividad antibacteriana de extractos y fracciones de hojas de *Siparuna sessiliflora* Kunt A. DC. (limoncillo); Pontificia Universidad Javeriana; Revista Cubana de plantas medicinales; 17(1) 65-72. 2012. Bogotá, Colombia.

91. Palacio Siguaire L., Paredes Paredes G., Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de la *MENTHA PIPERITA* L. (MENTA) frente al *Trichophyton Rubrum*. Arequipa 2004, Universidad Católica de Santa María.
92. Paredes Pacheco K., Ramírez Flores S., Formulación de un jarabe antibacteriano en base al aceite esencial de *Minthostachys Mollis* “Muña” obtenido por el método de hidrodestilación y demostración de su actividad in vitro frente a las cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* .UCSM, Arequipa 2012.
93. Paredes Punina D., Quinatoa Chicaiza F., Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales, Facultad de Mecánica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2010, Ecuador.
94. Paucar Menacho L., Guía de práctica de tecnología de aceites y grasas, Ciclo VIII, 2013.
95. Pino Alea J., Ortega L., Rosado A., Rodríguez M., Baluja R., Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown. Rev. Cubana Farm. 1996; 30; 29-35.
96. Piñol M., Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas, Fundamentos de Biología vegetal. Introducción al metabolismo secundario S.I. Mc Graw Hill Interamericana, 2001, NY .USA, 261-262.
97. Plazas Gonzales E., Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción, Centro de investigación y desarrollo científico, Jardín botánico de Bogotá, 2011, Colombia.
98. Ramírez Orellana Juan, Practica de Bromatología I, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Católica de Santa María, 2012.
99. Rivero Quijada C., Sánchez M., Silva R., Evaluación de extractos acuosos de diferentes especies vegetales para el control *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis pv. maniotis*. Revista Científica UDO Agrícola 13 (1):66-70;20013; Monagas ,Venezuela .
100. Rocío Lara M., practica Nª 2 Determinación de extracto etéreo, Facultad de Químico Farmacobiología 2008. Morelia, México.
101. Rodríguez M., Alcaraz L., Real S., Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas, Proyecto Sagarpa CONACYT 126183, México.
102. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba, Ciencia y Técnica. La Habana: Editorial científico –Técnica ,1988:485-7; 298-9.

103. Romero Márquez Mónica: Plantas Aromáticas, Tratado de Aromaterapia Científica. 1ª Edición, 2004. Editorial Kier. Argentina.
104. Ruiz Quiroz J., Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales, Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post-Grado, UNMSM, Lima 2013.
105. Ryan Kenneth , Ray George. Microbiología Médica Sherris 5ª Edición, 2011. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
106. Saavedra Lozano J., Santos Sebastián M., González F., Hernández Sampelayo Matos T., Navarro Gómez M., Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos, Sección de Enfermedades Infecciosas Pediátricas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.
107. Santos Benavides Jose M., Evaluacion del contenido de 1-MENTOL, 1-MENTONA Y 1-ACETATO DE MENTILO en el aceite esencial de *Mentha piperita* L. Universidad Catolica de Santa Maria ,2013.
108. Segovia Barrientos I., Suarez de la Cruz L., composición química del aceite esencial de Tagetes elliptica Smith “Chincho” y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima 2010.
109. Seija V., Etiopatogenia Microbiológica, Cap. 16 Genero *Staphylococcus*.
110. Sena, Aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas, Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas, Sistema de Bibliotecas SENA.
111. Shiva Ramayoni C., Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento, Universidad Autónomo de Barcelona, 2007.
112. Stuart Walker: Microbiología. 1ª Edición, 1999. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.
113. Tangerife Verónica C., Identificación de especies de Cándida, Escuela de Microbiologia, Universidad de Antioquia, 2011.
114. Tapia Montesinos M., Actividad antifúngica del extracto etanólico de hojas de *Myrcianthes ferreyrae* “Arrayan” y de sus hongos endofíticos frente a *Candida albicans* ATCC 18804.UCSM, Arequipa, 2013.

115. Tarek Ahmed Fahmi Eissa, Tarek A., estudio de la actividad sobre el sistema nervioso central de especies vegetales procedentes de la flora egipcia, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
116. Thoene A, Habib N, Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza “Quinoa” de *Polylepis australis bitter* como bactericida (2008)
117. Toledo E .Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre distintas cepas aisladas de alimentos. Universidad Nacional del Callao; Lima; 2006.
118. Torres M., Ricciardi G., Agrelo de Nassiff A., Ricciardi A., Bandoni A., Examen del contenido en *Ascaridol* el aceite esencial de *Chenopodium Ambrosioides L* (Paico). Facultad de Ciencias exactas y naturales y Agrimensura-UNNE, FACENA .2003; 19:27-32. Buenos Aires, Argentina.
119. Torres M., Ricciardi G., Agrelo de Nassiff A., Ricciardi Armando I., Ada E., Aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides L.* (Paico macho).Facultad de Ciencias exactas y naturales y Agrimensura-UNNE. Buenos Aires, Argentina.
120. Tortora, Funke, Case, Introducción a la Microbiología, 9^{na} Edición. 2007. Editorial Médica Panamericana.
121. Trease Evans, Farmacognosia 13^{va} Edición Editorial Interamericana. Mc Graw Hill 1991.
122. Túnez I., Muñoz M., Cromatografía de capa fina en lípidos, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Argentina.
123. Valdivia Ugarte J., Evaluación de la actividad antipirética de los extractos secos de las hojas de *Perezia Multiflora* (ESCORZONERA) en animales de experimentación. Arequipa-2013”
124. Vásquez J., Díaz D., Efecto antimicótico in vitro del aceite de Molle (*Schinus molle Linneo*) sobre *Trichophyton mentagrophytes*.
125. Vásquez Ribeiro O., Extracción y caracterización del aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*).Facultad de Ingeniería de Industria Alimentaria UNAP .Iquitos; Revista Amazónica de investigación alimentaria p38-42; 2001
126. Villar del Fresno A. (Editor): Farmacognosia General. 1^a Edición 2000. Editorial Síntesis S.A.

Referencias de Internet.

- Preparación de medios de cultivo. Disponible en:
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.html>.
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/sangreagarbase.html>
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/sabouraudgluagar.htm>
<http://provincia.jampar.com.pe/reactivos/187-caldo-cerebro-corazon-x-500-gr.html>
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.html>
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tsiagar.html>
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/cetagarbase.html>
<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/aguapep.html>
- Normas de Vancouver: guía breve, Biblioteca universitaria, Universidad de Málaga. Disponible en:
<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/normas-vancouver-buma-2013-guia-breve.pdf>
- PRACTICA N 13 Análisis De Grasas Y Aceites: Índice De Refracción. Disponible en:
<http://docplayer.es/336360-Practica-n-13-analisis-de-grasas-y-aceites-indice-de-refraccion-yodo-saponificacion-y-peroxido.html>
- Proyecto Sagarpa CONACYT , Disponible en:
<http://www.cibnor.mx>.
- Revista Cubana de Plantas Medicinales. Disponible en: <http://scielo.sld.cu>.

ANEXO N°1

IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

❖ Identificación *Staphylococcus Aureus*

Tinción Gram

Procedimiento

- ✓ Sobre un porta objeto limpio se colocó una gota de suero fisiológico, posteriormente colocar suavemente sobre este con un asa de kolle una colonia de la bacteria que se desea identificar.
- ✓ Se secó a temperatura ambiente y luego fijarla con la llama tenue del mechero para así evitar sea arrastrada la tinción durante el proceso.
- ✓ Se colocó las láminas sobre un soporte y proceder a agregar una solución de cristal violeta, dejar secar por un minuto y luego lavar con agua.
- ✓ Luego del lavado agregar la solución de Yodo de Gram y se volvió a realizar el proceso anterior.
- ✓ Una vez lavada la lámina se agregó solución decolorante de alcohol cetona
- ✓ Pasado un minuto cubrir la lámina con safranina, esperar otro minuto y lavar nuevamente con agua de caño, posterior a esto dejar secar a temperatura ambiente
- ✓ Observó al microscopio a 40x y luego aumentar a 100x.

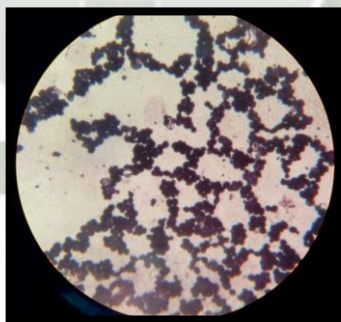


Figura N° 29. Observación al microscopio de cocos Gram (+) de *S. Aureus*

Interpretación

Se observó células esféricas Gram positivas, coloración morada, inmóviles, no formadoras de esporas que se disponen en racimos irregulares, comparados con un racimo de uvas.

Prueba de la catalasa

Procedimiento

- ✓ Colocó sobre una lámina porta objeto con un asa de kolle en el centro de esta una colonia de bacteria.
- ✓ Agregó de 1 a 2 gotas de peróxido de Hidrogeno H_2O_2 al 3%.
- ✓ Incluyó el porta objeto de lado a lado y observar.



Figura N° 30 Prueba de la catalasa en *S. Aureus*

Interpretación

- ✓ Resultado positivo, La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

Prueba de la coagulasa

Este es un factor de agregación. Este constituye un factor de virulencia del estafilococo dorado. Esta actúa uniéndose al fibrinógeno y lo convierte en fibrina insoluble. La fibrina insoluble permite que los estafilococos se agreguen y formen grupos. La identificación de esta proteína se considera la prueba de identificación principal de *Staphylococcus aureus*

Procedimiento

- ✓ Colocó en un porta lamina estéril colocar una gota de plasma, luego con un asa de kolle agregar una colonia de *S. Aureus* y mezclar lentamente.
- ✓ Llevó a la incubadora por 4 horas a $37^{\circ}C$

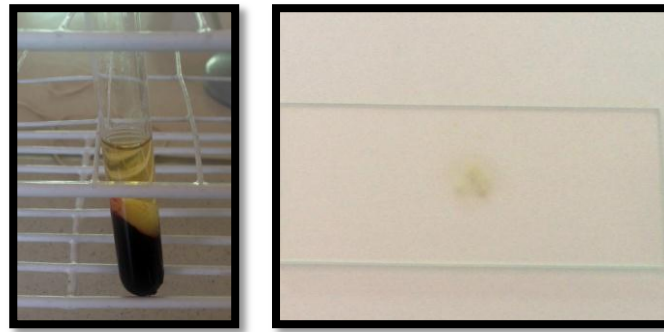


Figura N° 31. Prueba de la coagulasa para *S. aureus*

Interpretación

Coagulasa positiva. La enzima coagulasa tras el contacto con el fibrinógeno presente en el plasma produce la formación de aglutinación o coágulos.

Agar Manitol Salado

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar manitol salado se esteriliza en autoclave y luego de se deja solidificar el medio en placas Petri.
- ✓ Se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.



Figura N°32. Medio manitol salado con colonias de *S. aureus*

Interpretación

Resultado manitol positivo, crecimiento de colonias con el cambio de color del medio de rojo a amarillo por la producción de ácido. Los estafilococos fermentan carbohidratos y producen ácido láctico sin embargo no producen gas.

Agar Sangre

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar sangre y se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 121° C, luego se adiciona de 5 a 10 % sangre desfibrinada estéril se deja enfriar y se homogeniza, se agregó el medio preparado a las placas Petri aproximadamente 20 mL y se deja solidificar el medio.
- ✓ Posterior a esto se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar en el medio sólido.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.



Figura N° 33. Medio agar sangre tras siembra de *S. aureus*

Interpretación

Resultado positivo crecimiento con presencia de colonias grandes, cremosas, convexas y de bordes lisos. La mayoría de las cepas de *S. aureus* producen β hemólisis dentro de las 24-36 horas de incubación en medios de Agar sangre.

❖ Identificación *Staphylococcus epidermidis*

Tinción Gram

Se realizó el mismo procedimiento que para la identificación de *S. aureus*.

Interpretación

Celulas esféricas en forma de cocos.

Agar Manitol Salado

Se realizó el mismo procedimiento que para la identificación de *S. aureus*.

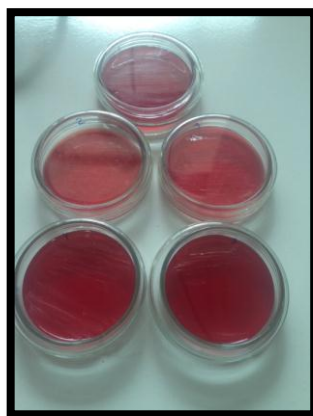


Figura N° 34. Medio manitol salado tras siembra de *S. epidermidis*

Interpretación

Resultado negativo de fermentador. Medio color rojo con colonias de color rosado

Prueba de la Catalasa

Se realizó el mismo procedimiento que para la identificación de *S. aureus*.

Interpretación

Resultado Prueba positiva con aparición de burbuja de gas.

Prueba de la Coagulasa

Procedimiento

Se realizó el mismo procedimiento que para la identificación de *S. aureus*

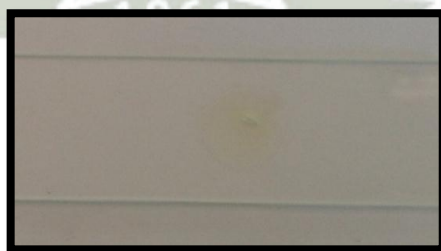


Figura N° 35. Prueba de la coagulasa para *S. epidermidis*

Interpretación

Resultado negativo sin aglutinación ni grumos.

❖ Identificación de *Pseudomona aeruginosa*

Tinción Gram

Se realizó el mismo procedimiento que para la identificación de las bacterias Gram (+).

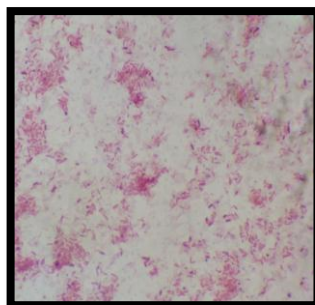


Figura N° 35. Tinción Gram para *P. aeruginosa*

Interpretación

Se observó bacilos rectos o ligeramente curvados, aislados, agrupados en parejas o cadenas cortas.

Prueba de la oxidasa

Procedimiento

- ✓ Sobre un trozo de papel filtro limpio se agregó con un asa de kolle una colonia de *P. epidermidis*
- ✓ Posteriormente se colocó una gota de reactivo oxidasa sobre el papel filtro con la colonia a analizar y se frota.

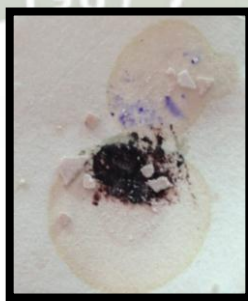


Figura N° 36. Prueba de la oxidasa para *P. aeruginosa*

Interpretación

Resultado positivo cambio a color púrpura tras la reacción de la oxidasa con la colonia de *P. aeruginosa*.

Agar sangre

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar sangre y se esterilizó en autoclave, luego se adiciona de 5 a 10 % sangre desfibrinada estéril se deja enfriar y se homogeniza, se agrega el medio preparado a las placas Petri aproximado 20 mL y se deja solidificar el medio.
- ✓ Posterior a esto se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar en el medio sólido.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.

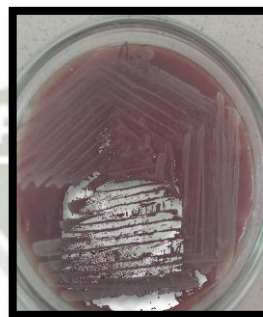


Figura N° 37. Medio agar sangre para cepas de *P. aeruginosa*

Interpretación

Resultado positivo, Colonias verdosas con olor a frutas.

Agar Mac Conkey

Preparación

- ✓ Se preparó agar Mac Conkey se esterilizó en autoclave y luego de se dejó solidificar el medio en placas Petri estériles.
- ✓ Se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.

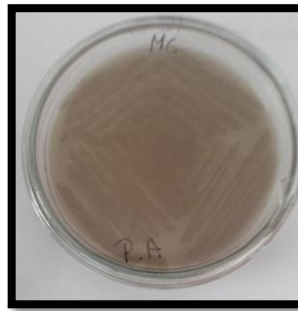


Figura N° 38. Medio agar Mac Conkey con cepas de *P. aeruginosa*

Interpretación

Resultado negativo No fermentadora de glucosa.

❖ Identificación *Escherichia coli*

Agar Mac Conkey

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar Mac Conkey se esterilizó en autoclave por 20 min a 121° C y luego de se dejó solidificar el medio en placas Petri.
- ✓ Se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.

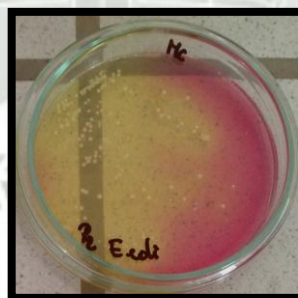


Figura N° 40. Medio Mac Conkey con colonias de *E. coli*

Interpretación

Resultado Positivo colonias de blanco en medio amarillo que indican que la bacteria fermenta lactosa y produce ácido causando el viraje de rojo neutro a amarillo.

Agar EMB

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar EMB se esteriliza en autoclave y luego se dejó solidificar el medio en placas Petri.
- ✓ Se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la bacteria a identificar.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.

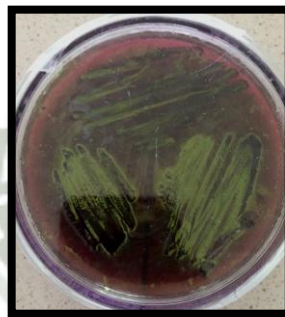


Figura N° 41. Medio agar Emb con colonias de *E.coli*

Interpretación

Resultado positivo colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico

Triple Azúcar Hierro (TSI)

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar TSI se esteriliza en autoclave y luego se dejó solidificar el medio en tubos estériles inclinados (pico-fondo) para realizar la siembra picadura y estría.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.



Figura N° 42 Siembra en agar TSI de cepas de *E. coli*

Interpretación

Resultado positivo presentan degradación del hidrato de carbono produciendo ácido, lo que ocasionó el cambio de color del medio de naranja a amarillo.

➤ Agar Lisina Hierro (LIA)

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar LIA se esteriliza en autoclave y luego se dejó solidificar el medio en tubos estériles inclinados (pico-fondo) para realizar la siembra picadura y estría.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.



Figura N° 43. Siembra del medio Agar LIA con cepas de *E. coli*

Interpretación

Resultado Lisina positivo, tras la producción de la Calaverina por producción de la descarboxilación de la lisina hay un viraje de color de púrpura de Bromocresol a púrpura medio (K/K).

Caldo Peptonado (INDOL)

Procedimiento

- ✓ Se preparó el caldo peptonado y se lleva al autoclave para su esterilización, se deja enfriar en ambiente limpio y se agrega tubos previamente estériles.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.
- ✓ Con un asa de kolle se extrae colonias de *E. coli* y se inoculó en el caldo antes preparado.
- ✓ Posterior a la incubación se le agregó una gota del reactivo de KOVACS.

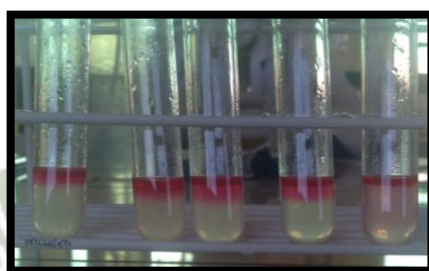


Figura N° 44. Anillo de color rojo resultado positivo para prueba de Indol

Interpretación

Resultado positivo tras la formación de un anillo color grosella lo que indica que *E. coli* posee la enzima triptófano.

Agar Citrato de Simmons

Procedimiento

- ✓ Se preparó agar citrato de Simomms se esterilizó en autoclave y luego se deja solidificar el medio en tubos estériles inclinados (pico-fondo) para realizar la siembra picadura y estría.
- ✓ Se llevó a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.



*Figura N° 45. Prueba citrato de Simmons con colonias de *E. coli*.*

Interpretación

Resultado negativo, coloración verde del medio que indica que no hay consumo de citrato como fuente de carbono

Prueba de rojo de Metilo –Voges Proskauer (RM-VP)

Procedimiento

- ✓ Se preparó el caldo RM-VP y se llevó al autoclave para su esterilización, se dejó enfriar en ambiente limpio y se agrega tubos previamente estériles.
- ✓ Con un asa de kolle se extrajo colonias de *E. coli* y se inoculó en el caldo antes preparado.
- ✓ Se lleva a estufa por 24 horas a una temperatura de 37° C.
- ✓ Posterior a la incubación se extrajo 1 mL de caldo para la prueba de VP.
- ✓ Para la prueba de rojo de metilo se agregó de 4 a 8 gotas del indicador de rojo de metilo.
- ✓ Para la prueba de Vogues Proskauer se agregó al tubo 10 gotas de alfa naftol al 5% y una gota de KOH al 5% agitar y se dejó reposa x 10 min



Figura N° 46. Prueba Rojo de Metilo para *E. coli*

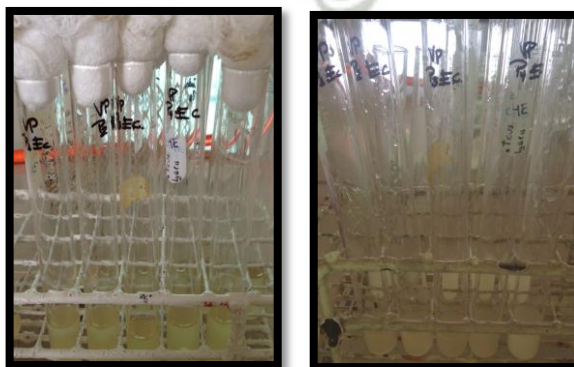


Figura N° 47. Prueba Vogues Proskauer para *E. coli*

Interpretación

Resultado Positivo para rojo de metilo por el viraje del indicador de color amarillo por el color rojo permanente dado por la producción de ácido indicando que hay fermentación de glucosa por la vía ácidos mixtos.

Negativo para Vogues Proskauer ya que no apareció el color rojo fuxia lo que indicaba la presencia de diacetilo, por el contrario se mantuvo con el color amarillo inicial.

Identificación *Cándida albicans*

Tinción Gram

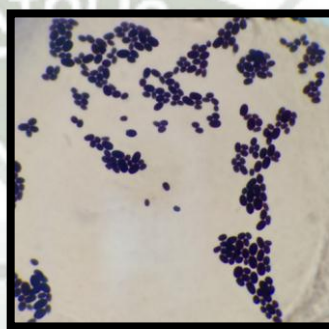


Figura N°48. Examen directo para *C. albicans*

Interpretación

Resultado positivo, se observan levaduras Gram (+) evidenciadas por el color violeta.

Examen Directo

Procedimiento

- ✓ Se colocó una asa de colonia y se colocó en el medio de una lámina porta objetos
- ✓ Se le adicionó aproximadamente 2 gotas de KOH al 10 %, luego se le colocó una lámina cubreobjetos.
- ✓ Se observó al microscopio primero del 10x al 40x.

Formación de tubos germinados

Procedimiento

- ✓ En un tubo que contiene 0,5mL de suero, se le inoculó la cepa en estudio y se incubó a 37 °C. Luego de 2-4 horas de incubación a 37 °C,
- ✓ Con ayuda de una pipeta Pasteur o de un asa en forma de aro, se tomó una porción del contenido del tubo, se colocó en una lámina, se cubre con laminilla y se observó al microscopio con objetivos de 10 y 40X.

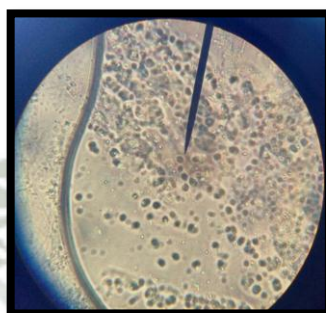


Figura N° 49. Observación al microscopio de *C. albicans*

Interpretación

Resultado *Cándida albicans* forma una pequeña prolongación filamentosas proveniente de la célula levaduriforme, sin constricción en el punto de origen, cuyo espesor puede medir alrededor de la mitad del diámetro de la levadura, y tener una longitud tres a cuatro veces mayor de dicho diámetro.

Agar Saboraud

Procedimiento

- ✓ Se preparó Saboraud se esteriliza en autoclave por 20 min a 121° C y luego se dejó solidificar el medio en placas Petri.
- ✓ Se sembró mediante estría con un asa de kolle la muestra de la levadura a identificar.
- ✓ Se llevó a estufa por 48 horas a una temperatura de 37° C.

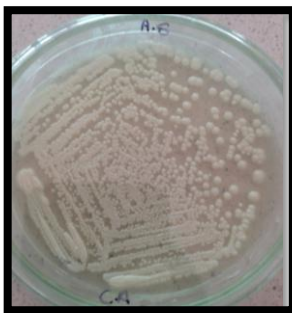


Figura N° 50. Medio agar Saboraud para colonias de *Cándida albicans*

ANEXO N° 2

MEDIOS DE CULTIVO.

➤ **Manitol Salado Agar.**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos.

Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria.

Fundamento

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura.

Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Siembra

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	1.0	Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7.4 ± 0.2		

Incubación

De rutina: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.
3 días a 32 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Excelente	Amarilla
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bueno	Roja
<i>Escherichia coli</i>	Inhibido	Inhibido
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inhibido	Inhibido

➤ Agar Sangre.

Medio para propósitos generales, para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos.

Con la adición de sangre, el medio es útil tanto para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes a partir de una gran variedad de muestras, como para la observación de reacciones de hemólisis. También, este medio de cultivo, puede utilizarse como medio base para preparar agar chocolate.

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.

El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5-10 %, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano, y permite detectar hemólisis.

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de músculo de corazón	375.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

Instrucciones

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 desfibrinada al 5%. Homogeneizar y distribuir en placas.

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

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio, sobre la superficie del medio de cultivo.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento	Hemólisis
E. coli	Abundante	--
S. aureus	Abundante	Beta
S. pyogenes	Abundante	Beta
S. pneumoniae	Abundante	Alfa
S. pneumoniae	Abundante	Alfa

➤ Sabouraud Glucosado Agar

Medio utilizado para aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc.).

En el medio de cultivo, la pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias.

Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C.
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Siembra

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa. Consultar referencias.

Incubación

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bueno
<i>Aspergillus niger</i>	Bueno
<i>Cándida albicans</i>	Bueno

➤ Simmons Citrato Agar

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

Fundamento

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Fórmula (en gramos por litro)		1.1 Instrucciones
Citrato de sodio	2.0	Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.
Cloruro de sodio	5.0	
Fosfato dipotásico	1.0	
Fosfato monoamónico	1.0	
Sulfato de magnesio	0.2	
Azul de bromotimol	0.08	
Agar	15.0	
pH final: 6.9 ± 0.2		

Siembra

A partir de un cultivo puro de 18-24 horas, sembrar en superficie un inóculo ligero.

Incubación

A 35-37 °C, durante 24-48 horas, en aerobiosis.
Algunos microorganismos pueden requerir hasta 4 días de incubación.

Resultados

-**Positivo:** crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad.

-**Negativo:** el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color.

Microorganismo	Citrato permeasa	Color del medio
Klebsiella pneumoniae	Positivo	Azul
S. typhimurium	Positivo	Azul
E. coli	Negativo	Verde
S. flexneri	Negativo	Verde

➤ TSI Agar

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro.

El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Fórmula (en gramos por litro)		1.2 Instrucciones
Extracto de carne	3.0	Suspender 62,5 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.
Pluripeptona	20.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Lactosa	10.0	
Sacarosa	10.0	
Glucosa	1.0	
Sulfato de hierro y amonio	0.2	
Tiosulfato de sodio	0.2	
Rojo de fenol	0.025	
Agar	13.0	
pH final: 7.3 ± 0.2		

Siembra

Sembrar en TSI, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio.

Incubación

A 35-37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

Resultados

1-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

2-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.

3-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.

4-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

Microorganismo	Pico/Fondo	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico
E. coli	A/A	+	-
K. pneumoniae	A/A	+	-
P. mirabilis	K/A	+	+
S. typhimurium	K/A	-	+
S. enteritidis	K/A	+	+
S. flexneri	K/A	-	-
P. aeruginosa	K/K	-	-

A:ácido

K: alcalino

➤ **Mueller Hinton Agar**

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fundamento

Se recomienda su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: 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 crece satisfactoriamente .

Fórmula (en gramos por litro)		1.3 Instrucciones
Infusión de carne	300.0	Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri
Peptona ácida de caseína	17.5	
Almidón	1.5	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.1		

Para el control de precisión y exactitud del agar de Mueller Hinton se usan las siguientes cepas control:

S. aureus

E. coli

P. aeruginosa

E. faecalis

Para evaluar el desempeño de inhibidores de beta lactamasa, se utiliza la cepa control:

E. coli

➤ **Caldo Cerebro Corazón**

Infusión de Cerebro Corazón (BHI) es un medio líquido de uso general utilizado en el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluyendo bacterias aeróbicas y anaeróbicas, a partir de una variedad de materiales clínicos y no clínicos.

Características:

Apariencia Deshidratada en polvo fino: homogéneo, libre de material extraño. Solución: 3,7%, soluble en agua purificada en ebullición. La solución es ligero y mediano, amarillo para broncear, claro a Ligeramente turbio. Apariencia de Preparación: Luz a medio, de color amarillo para broncear, claro a ligeramente turbio. pH: $7,4 \pm 0,2$

Instrucciones de Preparación

Suspenda 37 g del polvo en 1 L de agua purificada. Mezcla bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.

Autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Composición

Infusión de Cerebro y corazón, a partir de sólidos.....	6,0 g
Tejido animal digerido por enzimas pépticas.....	6,0 g
Cloruro de Sodio.....	5,0 g
Dextrosa.....	3,0 g
Gelatina digerida por enzimas pancreáticas.....	14,5 g
Fosfato disódico.....	2,5 g

➤ Caldo Peptonado.

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.

Fundamento

Medio de enriquecimiento no selectivo, recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de Enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos, a los que ha sido sometido el alimento. Si es utilizado como medio base para la fermentación de hidratos de carbono, se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión.

Fórmula (en gramos por litro)		1.4 Instrucciones
Peptona de carne	10.0	Suspender 15 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Cloruro de sodio	5.0	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio.

Incubación

Aeróbica, a 35-37°C durante 18-24 horas.

Resultados

Microorganismos	1.4.1 Crecimiento
Escherichia coli	Bueno
Staphylococcus aureus	Bueno
Pseudomonas aeruginosa	Bueno
Control Negativo	1.4.2 Resultado
Medio sin inocular	

ANEXO N° 3

GALERIA DE FOTOS

- ❖ **Concentraci3n minima inhibitoria CMI extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L.**

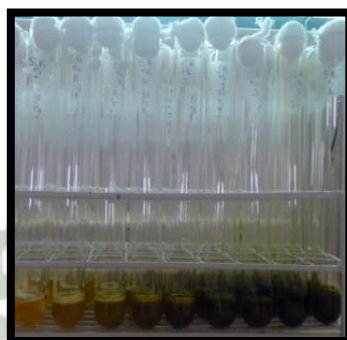


Figura N° 51: Tubos correspondientes a la CMI del extracto etéreo de *S. aureus*.

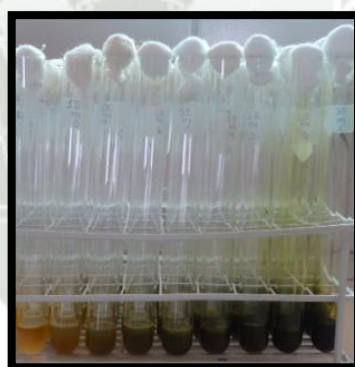


Figura N° 52: Tubos correspondientes a la CMI del extracto etéreo de *S. epidermidis*.



Figura N° 53: Tubos correspondientes a la CMI del extracto etéreo de *E. coli*.



Figura N° 54: Tubos correspondientes a la CMI del extracto etéreo de *P. aeruginosa*.

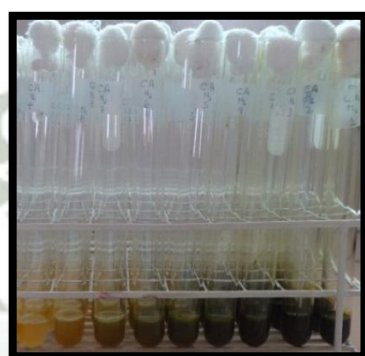


Figura N° 55: Tubos correspondientes a la CMI del extracto etéreo de *P. Cándida albicans*.

❖ **Concentración bactericida mínima CMB extracto etéreo de *Chenopodium ambrosioides* L.**

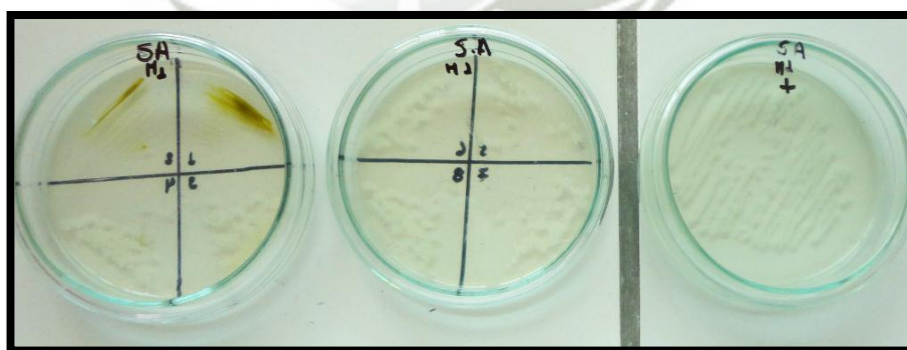


Figura N° 56: Placas Petri correspondientes a la CBM del extracto etéreo de la Muestra No 1 de *S. aureus*.

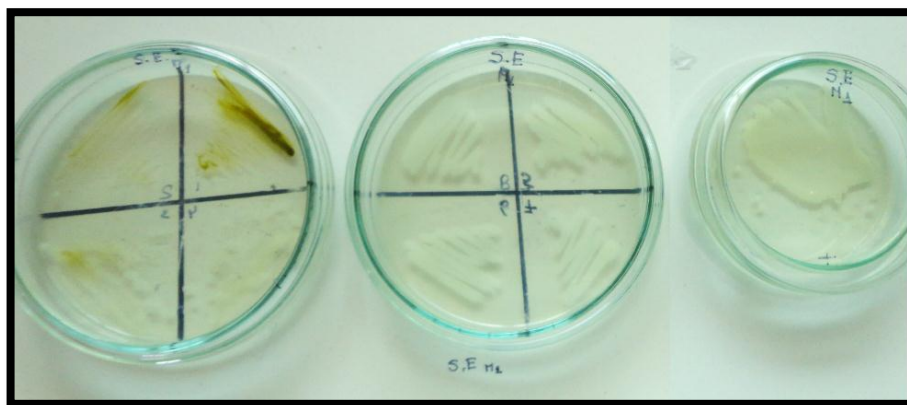


Figura N° 57. Placas Petri correspondientes a la CBM de extracto etéreo de la Muestra No 1 de *S. Epidermidis*.

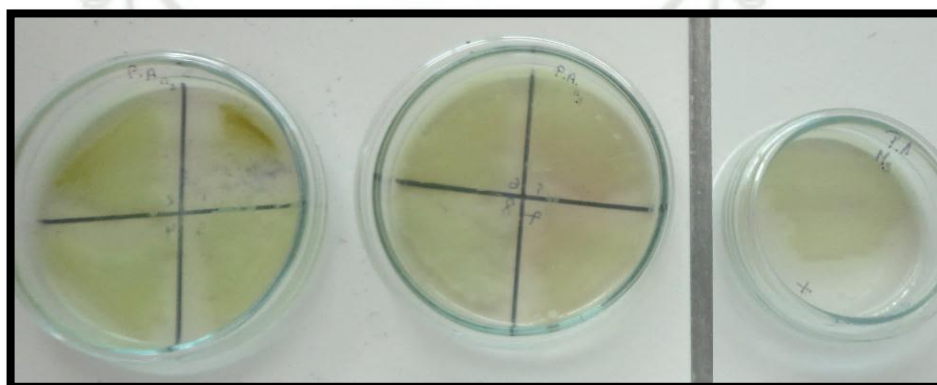


Figura N° 58. Placas Petri correspondientes a la CBM de extracto etéreo de la Muestra No 2 de *P. aeruginosa*.

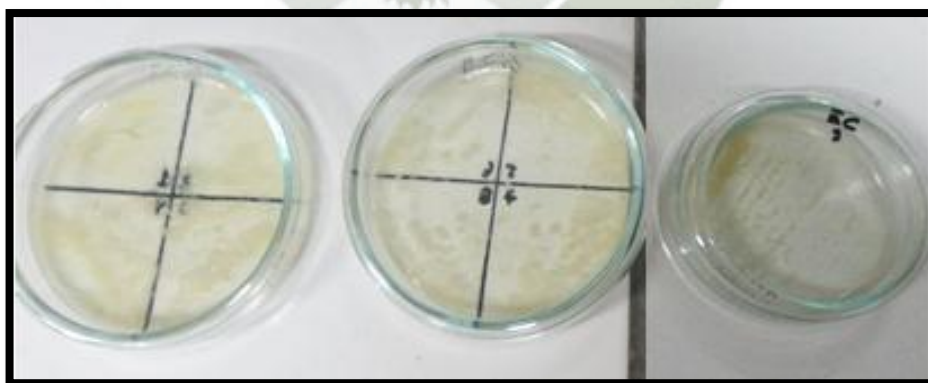


Figura N° 59. Placas Petri correspondientes a la CBM del extracto etéreo de la Muestra No 3 de *E. coli*.

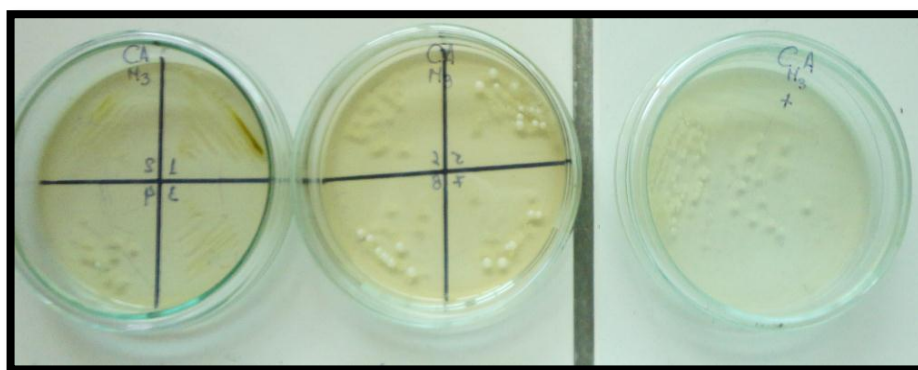


Figura N° 60. Placas Petri correspondientes a la CBM del extracto etéreo en la muestra No 3 de *C. albicans*.

❖ **Concentración mínima inhibitoria CMI del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.**

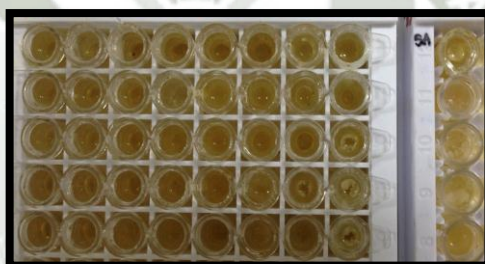


Figura N° 61: Celdas correspondientes a la CMI del aceite esencial frente a *S. aureus*.

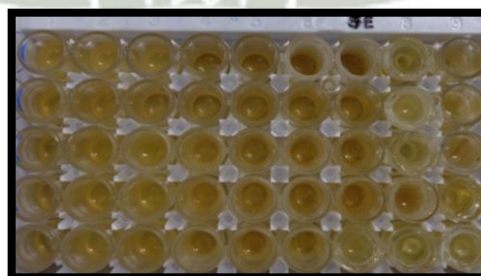


Figura N° 62: Celdas correspondientes a la CMI del aceite esencial frente a *S. epidermidis*.

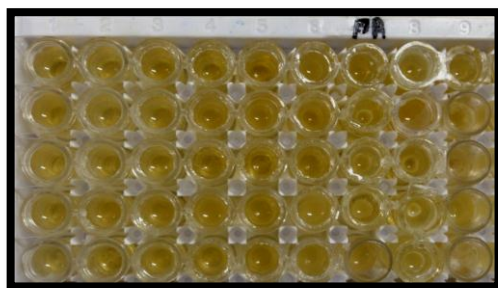


Figura N° 63: Celdas correspondientes a la CMI del aceite esencial frente a *P. eruginosa*.

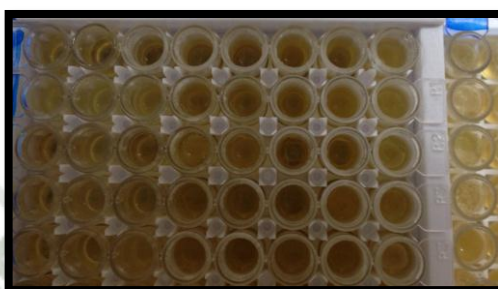


Figura N° 64: Celdas correspondientes a la CMI del aceite esencial frente a *E. coli*.

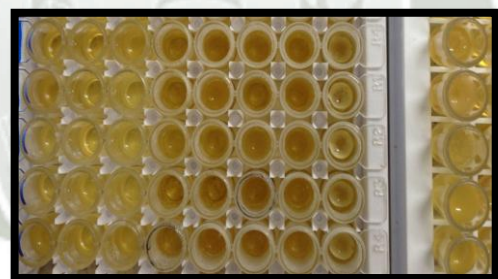


Figura N° 65: Celdas correspondientes a la CMI del aceite esencial frente a *C. albicans*.

❖ Concentración bactericida mínima CBM del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L.

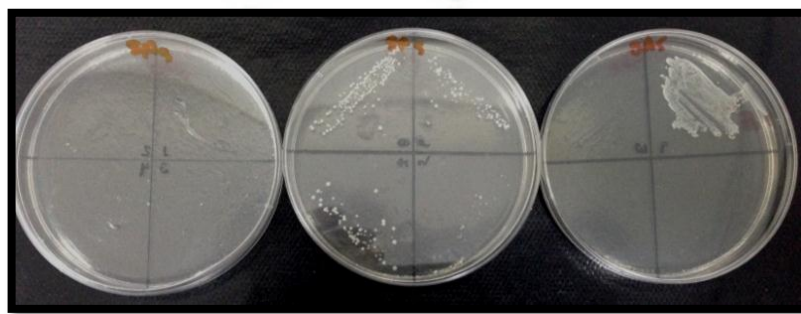


Figura N° 66. Placas Petri correspondientes a la CBM del aceite esencial en muestra No 5 de *S. aureus*.

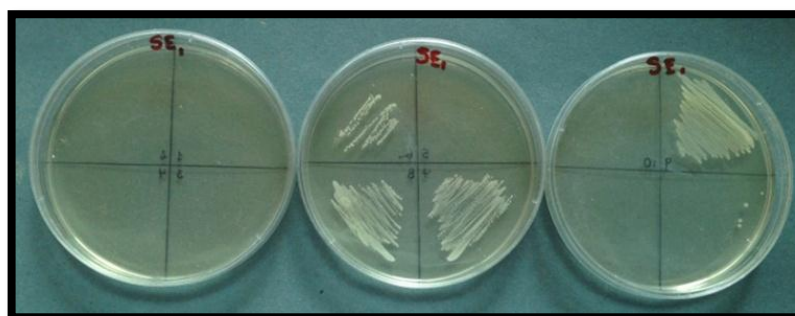


Figura N° 67. Placas Petri correspondientes a la CBM del aceite esencial en Muestra No 1 de *S. epidermidis*.

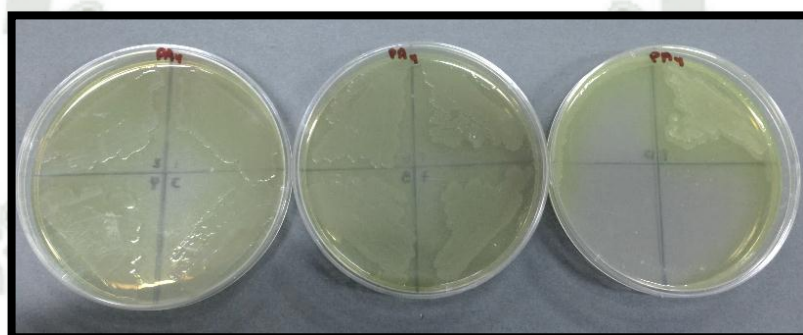


Figura N° 68. Placas Petri correspondientes a la CBM del aceite esencial en Muestra No 4 de *P. aeruginosa*.



Figura N° 69. Placas Petri correspondientes a la CBM del aceite esencial en Muestra No 1 de *E. coli*.

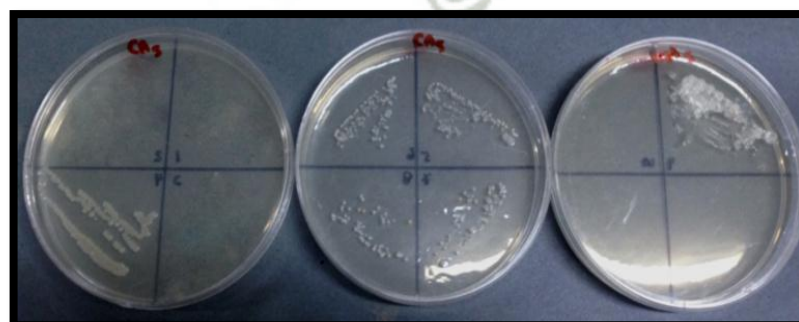


Figura N° 70. Placas Petri correspondientes a la CFM del extracto etéreo en Muestra No 2 de *C. albicans*.

ANEXO N° 4



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



"AÑO DE LA CONSOLIDACION DEL MAR DE GRAU"

CONSTANCIA N° 22-2015-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra de planta fresca presentada por la Bachiller Denysel Lizet Chambi Quispe y Karen Paola Pacheco Málaga Egresadas de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, para la realización de su trabajo de investigación "Evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos y el aceite esencial de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* (paicco) en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida albicans*. Arequipa 2015". Las muestras fueron traídas al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie:

Division Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Caryophyllidae

Orden Caryophyllales

Familia Amaranthaceae

Genero Chenopodium

Especie *Chenopodium ambrosioides* L

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

Arequipa 14 de octubre del 2015.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

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

ANEXO N° 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO

N° DE REPORTE: 16513-16

INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO

NOMBRE DEL CLIENTE	: KAREN PAOLA PACHECO MALAGA
DIRECCIÓN	: AREQUIPA
ASUNTO	: ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	: ACEITE ESENCIAL DE PAICO
CANTIDAD DE MUESTRAS	: 01
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	: AREQUIPA, 2016-05-31
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES	: BOLSA DE PLASTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	: AREQUIPA, 2016-06-01
REFERENCIA	: MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	: LA JOYA
OBRA	
CODIGO DE REGISTRO DE MUESTRA	: 21719

- LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
- ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO SERVILAB

Dr. Juan Pablo Lora
Jefe de Laboratorio

Dr. Francisco Sánchez
Químico Responsable

PAGINA 1 DE 2

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono:(054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

ANEXO N° 7



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO

N° DE REPORTE: 16513-16

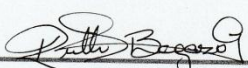
DETERMINACIÓN DE :				
Índice de Refracción.	1,4789			
OBSERVACIONES:				

METODO DE ENSAYO

DETERMINACIÓN	METODO DE ENSAYO APLICADO
	NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
Índice de Refracción.	Método de Refractómetro de Inmersión de Abbe...

Emitido en Arequipa (Perú), el 01 de Junio del 2016

AGINA 2 DE 2



Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348





Lc. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono: (054) 220360 a mail: servilab@hotamail.com

ANEXO N°8



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00053-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS	: 004361/2017
SOLICITADO POR	: DENYSEL CHAMBI QUISPE KAREN PACHECO MÁLAGA
MUESTRA	: ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO DE <i>CHENOPODIUM AMBROSIOIDES</i> (PAICO)
Nº DE LOTE	: -----
CANTIDAD	: 02 frascos de plástico ámbar
FECHA DE RECEPCIÓN	: 15 de Febrero del 2017
FECHA DE FABRICACION	: -----
FECHA DE VENCIMIENTO	: -----

PRUEBA	MÉTODO	RESULTADOS
IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS :		
EN ACEITE DE PAICO	Cromatografía en Capa Fina	Positivo
EN EXTRACTO ETÉREO DE PAICO	Cromatografía en Capa Fina	Positivo

Lima, 17 de Febrero del 2017



Q.F. Nelson Bautista Cruz
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>