

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Actividad Antimicrobiana *in vitro* de aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum*, y *Citrus medica* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACÉUTICO

Presentado Por las Bachilleres:

Zoila Ofelia Tello Dávila
Sandra Juliana Saavedra Cárdenas

Asesora:

Ing. Maritza Grandes Ruiz. Dra.

Co Asesor:

Q.F. Robert Dávila del Castillo.

IQUITOS – PERÚ

2013



"Año de la Inversión para el Desarrollo rural y la Seguridad Alimentaria"

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 31 días del mes de Julio del dos mil trece, siendo las 12:30 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 046-FFB-UNAP-2012, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ, Mgr. PRESIDENTE
- BLGA. TERESA DE JESÚS MORI DEL AGUILA, Mgr. MIEMBRO
- Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG MIEMBRO



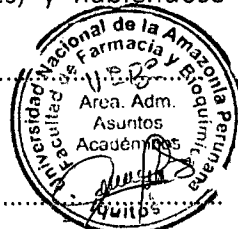
Se constituyeron en las instalaciones del Colegio Químico Farmacéutico Departamental de Loreto, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *Aniba roseodora*, *Piper aduncum*, y *Citrus medica* frente a cepas silvestres *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*", presentado por las Bachilleres SANDRA JULIANA SAAVEDRA CÁRDENAS Y ZOILA OFELIA TELLO DÁVILA; para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de las sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

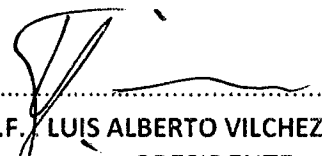
X DE CUADAMENTE

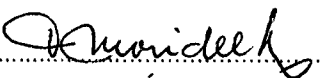
Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido APROBADO POR UNANIMIDAD
- 2.- Observaciones NINGUNA



Siendo las 13:30 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a las sustentantes por su ACERTADA DISERTACION


Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ, Mgr.
PRESIDENTE


BLGA. TERESA DE JESÚS MORI DEL AGUILA, Mgr.
MIEMBRO


Q. F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
MIEMBRO

DEDICATORIA

Este Proyecto de Tesis está dedicado a:

“A Dios, por guiarnos en cada paso de nuestras vidas, demostrándonos sus manos obradoras en nosotras y por bendecirnos siempre”

*Con mucho amor y admiración a mis padres,
JOHNNY TELLO GRÁNDEZ y GLORIA OFELIA
DÁVILA de TELLO, por ser ejemplo de superación
y de lucha constante, por ser cómplice de mis
sueños y anhelos, por brindarme fortaleza en mis
flaquezas para levantarme y continuar adelante en
todas mis metas trazadas.*

*A mi familia, en especial a mi hermano
Robert Dávila, por brindarme su apoyo
incondicional; por el apoyo moral y
espiritual de cada día.*

Zoila Ofelia Tello Dávila

*Con gran cariño y mucho amor a mis padres
LUIS SAAVEDRA VÁSQUEZ y MARGARITA
CÁRDENAS VÁSQUEZ, por ser el motor en mi
vida para salir adelante y en especial a la luz
que hoy ilumina mi vida, mi hija Luciana
Ximena Lequerica Saavedra.*

Sandra Juliana Saavedra Cárdenas

RECONOCIMIENTO

Durante estos seis años hemos aprendido muchas cosas que nos han ayudado a crecer como personas y como profesionales. Este apartado está dedicado a todas aquellas personas que han compartido con nosotros todo este tiempo y que han sido partícipes de esta tesis.

- Al Q.F. Ernesto Nina Chora por todas las facilidades y apoyo brindado para la realización de la parte farmacognóstica del presente trabajo.
- Al Q.F. Robert Dávila del Castillo, por sus valiosos consejos y por su constante interés mostrado durante todo el trabajo de la tesis.
- Al Blgo. Freddy Espinoza, por su tiempo brindado, paciencia, dedicación y su valiosa asesoría.
- Al Ing. Daniel Carrasco, por las facilidades y el tiempo brindado para la realización de la extracción de los aceites esenciales.
- Al Dr. Alenger Alva por su inestimable colaboración, dedicando una importante parte de su tiempo en compartir sus conocimientos.

A nuestra asesora Dra. Maritza Grandes Ruiz por su incondicional ayuda y apoyo durante todo este tiempo.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.

Muchas gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	14
1.1.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	14
1.1.1.- Descripción del Problema	14
1.1.2.- Formulación del Problema	15
1.2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	16
1.3.- OBJETIVOS	17
1.3.1.- General	17
1. 3.2.- Específicos	17
1.4.- HIPÓTESIS	18
1.5.- DETERMINACIÓN DE VARIABLES	18
1.5.1.- Variables Independiente	18
1.5.2.- Variables Dependiente	18
1.6.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	19

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	21
2.1.- ANTECEDENTES	21
2.2.- BASES TEÓRICAS	22
2.2.1.- Aceites Esenciales	22
2.2.1.1.- Aspectos Generales	22
2.2.1.2.- Concepto	22
2.2.1.3.- Clasificación	23
2.2.1.4.- Características	25
2.2.1.5.- Propiedades Físico-Químicas	25
2.2.1.6.- Propiedades Químicas	26
2.2.1.7.- Obtención	26
2.2.1.8.- Mecanismo de Acción de los Aceites Esenciales	27
2.2.2.- <i>Aniba rosaeodora</i> “PALO DE ROSA”	29
2.2.2.1.- Clasificación Taxonómica	29
2.2.2.2.- Descripción Botánica	29
2.2.2.3.- Composición Fitoquímica	30
2.2.2.4.- Uso Tradicional	30
2.2.2.5.- Distribución Geográfica	31
2.2.3.- <i>Piper aduncum</i> “CORDONCILLO”	31
2.2.3.1.- Clasificación Taxonómica	32
2.2.3.2.- Descripción Botánica	32
2.2.3.3.- Composición Fitoquímica	33
2.2.3.4.- Estudios Farmaco-Toxicológicos	33
2.2.3.5.- Uso Tradicional	34
2.2.3.6.- Distribución Geográfica	35

2.2.4.- <i>Citrus medica</i> “CIDRA”	35
2.2.4.1.- Clasificación Taxonómica	35
2.2.4.2.- Descripción Botánica	36
2.2.4.3.- Composición Fitoquímica	36
2.2.4.4.- Uso Tradicional	37
2.2.4.5.- Distribución Geográfica	37
2.2.5.- Método de Susceptibilidad por Disco de Difusión Kirby – Bauer	38
2.2.5.1.- Aspectos Generales	38
2.2.5.2.- Principio del Método	39
2.2.5.3.- Macrodilución en Caldo	40
2.2.5.4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	41
2.2.5.5.- Lectura e Interpretación de la CMI	42
2.2.5.6.- Característica de las cepas en estudio	43
2.2.5.6.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.2.5.6.2.- <i>Pseudomona aeruginosa</i>	44
2.2.5.6.3.- <i>Bacillus cereus</i>	45
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODO	47
3.1.- METODOLOGÍA	47
3.1.1.- Lugar de Estudio	47
3.1.2.- Tipo de Investigación	47
3.1.3.- Diseño de la Investigación	48
3.1.4.- Flujograma de Estudio	49
3.1.4.1.- Diagrama de Flujo para Extracción de los Aceites Esenciales	50
3.1.4.2.- Diagrama de Flujo del Procedimiento General para la prueba de Susceptibilidad	50

3.1.5.- Procedimiento Experimental	51
3.1.5.1.- Recolección y Procesamiento de las Muestras	51
3.1.5.2.- Identificación Taxonómica de la Muestra Vegetal	51
3.1.5.3.- Preparación de Materia Prima	51
3.1.5.3.1.- Limpieza	52
3.1.5.3.2.- Lavado	52
3.1.5.3.3.- Cortado	52
3.1.5.3.4.- Secado	52
3.1.5.3.5.- Molienda	52
3.1.5.4.- Estudio Farmacognóstico	53
3.1.5.5.- Proceso de Extracción	53
3.1.5.5.1.- Condensado	53
3.1.5.5.2.- Decantado	53
3.1.5.5.3.- Purificación del Aceite	53
3.1.5.5.4.- Envasado y Almacenamiento	53
3.1.5.6.- Determinación de Rendimiento	54
3.1.6.- Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	54
1.6.1.- Preparación del Inóculo	54
1.6.2.- Preparación de los Discos de Sensibilidad	55
1.6.3.- Aplicación de los Discos	55
1.6.4.- Porcentaje de Inhibición Relativa	55
1.6.5.- Lectura	56
3.1.7.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	56
3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	58
3.2.1.- Población en Estudio	58
3.2.2.- Muestra en Estudio	58
3.2.3.- Selección de las Muestras Botánicas	58
3.2.4.- Lugar de Muestreo	59

3.3.- INSTRUMENTOS	60
3.3.1.- Material Vegetal	60
3.3.2.- Material Biológico en Estudio	60
3.3.3.- Medios de Cultivos	60
3.3.4.- Materiales de Vidrio	60
3.3.5.- Materiales de Plástico	60
3.3.6.- Material de Metal	61
3.3.7.- Otros Materiales	61
3.3.8.- Equipos	61
3.3.9.- Reactivos	61
3.4.- ANÁLISIS DE DATOS	62
3.5.- PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS	62
3.6.- CUESTIONES ÉTICAS EN LA EXPERIMENTACIÓN	62
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	63
4.1.- RESULTADOS	63
4.1.1.- Determinación de las Características Organolépticas	66
4.1.2.- Resultados de los Diámetros de Halos de Inhibición	67
4.1.3.- Determinación de la Concentración de los Aceites Esenciales	68
4.1.4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	69
4.2.- DISCUSIÓN	88
4.3.- CONCLUSIONES	93
4.4.- RECOMENDACIONES	94
4.5.- BIBLIOGRAFÍA	95
4.5.1.- Referencias Bibliográficas	95
4.5.2.- URL's	112
ANEXOS	113

Actividad Antimicrobiana de aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* frente a cepas *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*

Bach. Zoila Ofelia Tello Dávila & Sandra Juliana Saavedra Cárdenas

RESUMEN:

El propósito del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer). La muestra fue recolectada en la comunidad de "TAMSHIYACU", ubicado en las coordenadas geográficas aproximadamente de 3° 59' 54" de latitud sur 73° 09' 43" de longitud oeste, altitud de 108 m.s.n.m. distrito de Fernando Lores, departamento de Loreto). La muestra se identificó taxonómicamente en el Herbarium Amazonense (AMAZ) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y fue procesado en el laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET). La muestra fue secada por 72±2 horas en una cámara provista con deshumidificador a 40±2°C; Luego de la molienda se procedió a destilación por arrastre con vapor. Luego se procedió a la determinación de las características farmacognósticas de la muestra en estudio. El rendimiento de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* fueron 6.38 %, 7.31 %, 6.26 %, respectivamente. La mayor inhibición obtenida con el método de Kirby-Bauer se obtuvo con el aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579 con un halo de inhibición de 18 mm a una concentración de 15 mL por disco de papel filtro del extracto del aceite esencial. El porcentaje de Inhibición Relativa fue mayor (94.73 %) para *Citrus medica* (cidra) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579, sin embargo en la CMI no fue significativo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración máxima bactericida (CBM) no se calcularon ya que la sensibilidad de las cepas a los aceites esenciales fue reducida. Se concluye que la cepa *Bacillus cereus* ATCC 14579 presenta mayor sensibilidad frente al aceite esencial de *Citrus medica*.

Palabras clave: *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum*, *Citrus medica*, aceite esencial, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579, halo de inhibición, Concentración Mínima Inhibitoria

Determination of the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* and *Citrus medica* against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*

Bach. Zoila Ofelia Tello Dávila & Sandra Juliana Saavedra Cárdenas

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils of rosewood leaves, *Piper aduncum* and *Citrus medica* using the disk diffusion method (Kirby Bauer). The sample was collected in the community of "TAMSHIYACU" located at the geographical coordinates approximately 3 ° 59 '54 "South latitude 73 ° 09' 43" west longitude, altitude of 108 m District of Fernando Lores, department of Loreto). The sample was identified taxonomically in the Amazonian Herbarium (AMAZ), Faculty of Biological Sciences, National University of the Peruvian Amazon (UNAP) and was processed in the laboratory of Phytochemistry the Institute of Traditional Medicine (IMET). The sample was dried for 72 ± 2 hours in a chamber provided with dehumidifier at 40 ± 2 ° C. After grinding proceeded to steam stripping distillation. Then he proceeded to the determination of the characteristics farmacognósticas of the study sample. The yield of the essential oils of rosewood, *Piper aduncum* and *Citrus medica* were 6.38%, 7.31%, 6.26%, respectively. The greatest inhibition obtained with the Kirby-Bauer method were obtained with the essential oil of *Citrus medica* (citron) against *Bacillus cereus* ATCC 14579 with an inhibition of 18 mm at a concentration of 15 ml per filter paper disc extract essential oil. Relative Inhibition percentage was higher (94.73%) for *Citrus medica* (citron) against *Bacillus cereus* ATCC 14579, the CMI however was not significant. The minimum inhibitory concentration (MIC) and maximum bactericidal concentration (MBC) were not calculated because the sensitivity of the strains to essential oils was reduced. It is concluded that the *Bacillus cereus* ATCC 14579 has greater sensitivity compared to the essential oil of *Citrus medica*.

Keywords: *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum*, *Citrus medica*, aceite esencial, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 14579, halo de inhibición, Minimum Inhibitory Concentration.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, como parte del legado de la Medicina Tradicional Peruana, herencia de tiempos precolombinos, sigue siendo la primera instancia de consulta y tratamiento en nuestro país. Presenta una flora variada calculada aproximadamente en 80, 000 especies, ya que contamos con 28 climas de los 32 existentes en el planeta, y 84 de las 103 zonas de vida reconocidas en la tierra ²⁵.

En el Perú, en 1989 se logró por Resolución Ministerial aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usado en los centros asistenciales del antes Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS), hoy Seguro Social de Salud (EsSALUD), sin embargo no logró el impacto necesario en los profesionales de la salud para su utilización debido, entre muchas causas, al desconocimiento de la acción terapéutica acompañada de una experiencia clínica confiable con un soporte de control toxicológico de las plantas medicinales mencionadas que generó mucha desconfianza entre los galenos ¹⁰².

El uso de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que reconoce su importancia en los sistemas de salud en muchos países en vías de desarrollo, instando a los estados y miembros a hacer estudios de las plantas medicinales utilizadas por los curanderos tradicionales y la población para determinar aquellos que tengan un efecto satisfactorio, de manera de incluirlas en la Farmacopea Nacional ^{41, 114}.

La medicina tradicional tiene importancia por sus grandes aportes a la medicina moderna, los pobladores dan solución a muchos de los problemas de subsistencia y conservación de la salud física y mental, aplicando conocimientos adquiridos de sus antepasados acerca de las plantas con actividad terapéutica ^{37, 47}. La abundancia y gran diversidad de estas plantas en forma silvestre y su fácil comercialización por los bajos costos que tienen, posibilitan su adquisición por las personas más necesitadas y para sustituir a los medicamentos de síntesis de altos costos.

Actualmente es material básico para la formulación de nuevas drogas o para formular modelos de compuestos farmacológicamente activos ⁴⁵. Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido grandemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica ⁶² y a la producción de fitofármacos siendo muy peculiar su uso en forma de droga seca, extracto acuoso o decocción. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países.

Reportes de la OMS indican que el 80 % de la población mundial conoce de las ventajas y uso de la utilización de medicamentos sobre plantas medicinales en la atención primaria de salud, pero también indican que los estudios existentes sobre dichas plantas son insuficientes para aceptar su uso de forma masiva, por lo cual ha orientado protocolos científicos para el desarrollo de fitofármacos, de manera que los ensayos farmacodinámicos y toxicológicos siempre antecedan a la experimentación clínica ⁶⁷.

144

Las especies botánicas en estudio presentan una extensa aplicación etnobotánica en América Latina. Estudios previos han mostrado que dichas especies poseen una gran diversidad química ¹³⁹. Los aceites esenciales presentan diferentes tipos de moléculas como sesquiterpenos, monoterpenos, arilpropanoides, motivo por el cual su estudio se convierte en una actividad promisoriosa y de interés.

Para esta investigación se seleccionaron tres especies de este género de uso común, que no cuentan con mucha validación científica de sus propiedades atribuidas, siendo objeto de la presente investigación: *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra), cuya finalidad en la presente investigación es conocer y demostrar científicamente el efecto antimicrobiano *in vitro* de los aceites esenciales de las plantas mencionadas frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC 14579, contribuyendo a que se tenga referencia para proyectos en el campo farmacéutico para el uso adecuado de plantas medicinales.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.1.- Descripción del Problema

En la actualidad existe una gran gama de antibióticos de primera, segunda y hasta tercera generación que ofrecen una amplia variedad de opciones para el tratamiento de padecimientos causados por bacterias ^{10, 21}. Estos antibióticos están perdiendo eficacia por el aumento progresivo de la resistencia microbiana, lo que constituye un problema de primera línea para la salud pública global ^{41, 86, 152}. Esto se debe, principalmente al tratamiento farmacológico incompleto de los pacientes, debido a la automedicación, y abandono de los tratamientos respectivos. A esto se suma, el uso irracional de antibióticos que contribuyen a la aparición de cepas microbianas multidrogorresistentes. Este problema, se agudiza cada vez por el elevado costo de los fármacos, lo cual resulta inaccesible para la población de bajo recursos económicos ^{43, 92, 108}.

El conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana se debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces, políticas, estrategias, programas y metodologías que proporcionen una adecuada vigilancia en la elaboración y uso racional de antibióticos ^{23, 55, 108, 130, 141}.

El Perú, posee una gran biodiversidad en cuanto a flora, siendo alrededor de 300 mil especies vegetales consideradas de uso medicinal y muchas de ellas han sido empleadas por nuestros ancestros en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos ^{22, 23, 24, 26, 27} pero, en cuanto a estudios farmacológicos y principios activos de las plantas medicinales en la Amazonía peruana son escasos, por lo que existe poca información científica que determine la sensibilidad o resistencia a muchos microorganismos ⁸.

La importancia de este trabajo de investigación se sustenta en la posibilidad de establecer las bases experimentales que validen la utilización de plantas medicinales en la aromaterapia con probada capacidad antibiótica y/o antimicrobiana ¹¹. El desarrollo, la aplicación, el conocimiento científico de los aceites esenciales extraídos de hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus médica* (Cidra) nos permitirá dar opciones de uso médico para el tratamiento alternativo de enfermedades causadas por microorganismos tales como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.

1.1.2.- Formulación del Problema

¿Los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra) tendrán actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC 14579?

1.2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad se está dando una expansión muy grande de las plantas medicinales por diferentes razones o factores, como el alto coste de los medicamentos sintéticos o la falta de acceso a los agentes quimioterapéuticos para una gran parte de la población. Es por ello que los consumidores prefieren consumir cada vez más productos de origen natural, principalmente por la falta de indicaciones de los efectos colaterales que pueden producir los medicamentos sintéticos⁹⁵.

A nivel mundial cerca del 80% aún depende de la medicina herbolaria para atenuar sus dolencias y enfermedades. El Perú no es ajeno a esto, ya que cuenta con una gran diversidad en su flora, donde habría alrededor de 80 mil especies vegetales de las cuales 2,000 se vienen empleando con fines curativos. Siendo necesario evaluar las propiedades medicinales de estas plantas¹⁴⁵. Las enfermedades producidas por diversos agentes patógenos y la inadecuada calidad de vida del hombre está creando la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento con una tendencia de volver a las costumbres ancestrales del uso de plantas medicinales, para la cura de sus enfermedades. La aparición de cepas resistentes a los antibióticos tradicionales como: penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, etc., ha dado origen a una corriente competitiva por la fabricación de nuevos fitofármacos que sean eficaces en el tratamiento de numerosas enfermedades que aquejan a la población mundial. El Hospital Apoyo Iquitos y el Hospital Regional de Loreto reportaron (2010) una prevalencia de uso de antimicrobianos de 61%; en este informe se observó la resistencia del *Stafilococcus aureus* a oxacilina en 77%, *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia a antimicrobiano de primera línea como amikacina (55%), ceftazidima (51%) y ciprofloxacina (69%), así como a imipenem (46%); y *Bacillus spp.* tiene alta resistencia a ciprofloxacina de 40%^{98, 106}. Ante esta elevada prevalencia de resistencia antimicrobiana, los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora* (Palo de Rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra), constituye en una de las especies vegetales útiles por el poblador amazónico; pero debido al desconocimiento de la población sobre los beneficios de esta planta medicinal es necesario investigar este recurso, para apreciar su utilización con fines terapéuticos para beneficio de nuestra población^{URL-1}.

1.3.- OBJETIVOS

1.3.1.- General

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus médica* (Cidra), frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC 14579 mediante el método de disco difusión (Kirby - Bauer).

1.3.2.- Específicos

- Recolección de muestras como las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*.
- Identificación taxonómica de las muestras de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*.
- Obtención de los aceites esenciales mediante destilación de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* recolectadas en la comunidad de Tamshiyacu.
- Determinar las características farmacognósticas de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*.
- Medir los diámetros de los halos de inhibición de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC 14579.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus médica*.

1.4.- HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), y *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra), presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC.

1.5.- DETERMINACIÓN DE VARIABLES

1.5.1.- Variables Independiente

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de:

- *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa)
- *Piper aduncum* (Cordoncillo)
- *Citrus medica* (Cidra)

1.5.2.- Variables Dependiente

Bacterias patógenas:

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Cepa de *Bacillus cereus* ATCC 14579

1.6.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable Independiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Escala y tipo de variable
<p>Aceites esenciales de tres especies recolectadas en Tamshiyacu:</p> <p>1. <i>Aniba rosaeodora</i> (Palo de rosa)</p> <p>2. <i>Piper aduncum</i> (Cordoncillo)</p> <p>3. <i>Citrus medica</i> (Cidra)</p>	<p>Material vegetal, que mediante un proceso de destilación por arrastre a vapor y posterior refinación se obtiene un producto de alta pureza.</p>	<p>Las concentraciones de los aceites esenciales de las hojas de <i>Aniba rosaeodora</i>, <i>Piper aduncum</i> y <i>Citrus medica</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 mg/ml ▪ 25 mg/ml ▪ 12.5 mg/ml ▪ 6.25 mg/ml ▪ 3.125 mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Especie recolectada ▪ Cantidad usada ▪ Hora de la colecta ▪ Parte utilizada ▪ Solvente utilizado 	<p>La especie vegetal limpia y pesada puesto en el destilador para la extracción de los aceites esenciales.</p>	<p>Escala nominal</p> <p>Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

Variable Dependiente	Definición conceptual	Indicador	Índices	Definición operacional	Escala y tipo de variable
<p>Grado de sensibilidad de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 y <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579</p>	<p>Actividad que inhibe el crecimiento de microorganismos causado por los metabolitos presentes en los aceites esenciales</p>	<p>Diámetro de halo de inhibición medido en mm.</p> <p>Crecimiento bacteriano de la cepa mediante la turbidez del tubo de ensayo</p>	<p>Presencia o ausencia de halo de inhibición:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resistente • Intermedio • Sensible 	<p>La inhibición del crecimiento del microorganismo.</p>	<p>Escala nominal.</p> <p>Tipo de variable cualitativa y/o cuantitativa</p>

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- ANTECEDENTES

Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de la salud en múltiples culturas del mundo transmitidas a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que busca los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo ⁸⁷.

La fitoterapia es el nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas. A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales ^{97, URL5}.

En diversas investigaciones a nivel mundial se han establecido que muchas plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e inclusive con efectos insecticidas sobre ciertos mosquitos ^{56, 122}.

En la actualidad, es enorme la difusión y popularidad de las terapias vegetales en el mundo. Se aconsejan ya no como alternativas en los servicios de salud, sino como primera intención para diversas afecciones, antes de pasar a otros medicamentos más agresivos ⁷¹. *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus médica* (Cidra), han sido utilizadas desde hace muchos años por nuestros ancestros y población en general. A raíz de esta situación se han realizado diferentes estudios en diversas partes del mundo para comprobar sus actividades medicinales en una amplia variedad de indicaciones terapéuticas ⁸⁹.

2.2.- BASES TEÓRICAS

2.2.1.- Aceites Esenciales

2.2.1.1.- Aspectos Generales

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos tiende a enfocarse hacia agentes con nuevos mecanismos de acción que sean capaces de evadir los mecanismos de resistencia bacteriana actuales^{49, 54, 58}. De la misma forma, el surgimiento y transmisión de cepas con resistencia a los glucopéptidos, hace urgente la prioridad en el desarrollo de estrategias de tratamiento y la creación de nuevos fármacos para el control en la diseminación del *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA por sus siglas en inglés)^{46, 31, 80}.

En un esfuerzo por detener esta diseminación y el incremento en la incidencia de la resistencia a los antibióticos, la industria farmacéutica ha invertido importantes recursos en la búsqueda de nuevos compuestos inhibitorios de origen microbiano vegetal y animal^{28, 75, 151}. Entre las alternativas de grandes alcances para controlar o inhibir la actividad de microorganismos en general y patógenos en particular, se encuentran los extractos y aceites esenciales provenientes de diferentes plantas u órganos de éstas.

2.2.1.2.- Concepto

Los aceites esenciales (constituyentes odoríferos o esencias de una planta) son compuestos complejos volátiles, naturales^{9, 62, 79}, caracterizados por un olor penetrante y que son formados por las plantas como metabolitos secundarios. Los aceites esenciales son líquidos, lípidos y raramente pigmentados, liposolubles o solubles a compuestos orgánicos, con densidad generalmente más baja que el agua. Pueden ser sintetizados en muchos órganos vegetales, tales como brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutas, raíces, madera o corteza, y son almacenadas en células excretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares⁷.

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que contienen alrededor de 20-60 componentes a muy diferentes concentraciones (20-70%). Generalmente, estos componentes determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales ^{18, 21, 50}.

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de varias sustancias ^{9, 59, 76}, generadas por diversas rutas biosintéticas ^{92, 142, 146}, así como también son el producto final del metabolismo secundario de las plantas ⁴; y tienen gran aplicación en la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y de alimentos ⁷. Dado que las moléculas aromáticas de una planta existen en forma líquida inmiscible, en agua, estos son clasificados como aceites esenciales, para diferenciarlos de los aceites grasos obtenidos por lo general de las especies clasificadas como oleaginosas ²⁶. Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas ¹¹⁵.

2.2.1.3.- Clasificación

Químicamente, los volátiles presentes en aceites esenciales son mezclas de lípidos de bajo peso molecular y se agrupan en:

- Terpenos o hidrocarburos de fórmula general $(C_5H_8)_n$ como el limoneno;
- Derivados oxigenados de estos hidrocarburos como el citral;
- Compuestos aromáticos que tienen una estructura benzoica tal como el eugenol y;
- Compuestos que contienen nitrógeno y/o azufre como la tiazolidina

Los terpenos forman clases diferentes en cuanto a su estructura y funcionalidad. Están conformados por combinaciones de varias cadenas de cinco carbonos llamadas isoprenos. La biosíntesis de los terpenos consiste en la síntesis del precursor isopentenil difosfato (IPP).

Los principales terpenos son los monoterpenos (C₁₀) y sesquiterpenos (C₁₅), pero los hemiterpenos (C₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) y tetraterpenos (C₄₀) también existen. Un terpeno que contenga oxígeno es llamado terpenoide⁷.

Los monoterpenos están formados de un par de unidades de isopropeno (C₁₀). Estas son las moléculas más representativas, pues constituyen casi el 90% de los aceites esenciales y permiten una gran variedad de estructuras. Los sesquiterpenos están formados por un ensamble de tres unidades de isoterpenos (C₁₅). La extensión de las cadenas permite por tanto una gran cantidad de combinaciones y por lo mismo de estructuras⁷.

Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano y ocurren en menor frecuencia que los terpenos. Las rutas biosintéticas concernientes a los terpenos y a los derivados fenilpropano, generalmente se separan en plantas, pero pudieran coexistir en algunas especies con una ruta biosintética dominando⁷.

Los componentes nitrogenados y azufrados como los glucosinolatos o los derivados del isotiocianato también son metabolitos secundarios característicos de diversas plantas pero también se pueden generar por calentamiento de algunos alimentos (rostizados, parrilla entre otros)⁷.

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones). Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua²⁶.

2.2.1.4.- Características

Las características que definen a los aceites esenciales son:

- Una gran intensidad aromática
- La mayoría presenta insolubilidad en el agua
- De igual manera, la mayoría presenta solubilidad en alcohol, éter, grasas y aceites vegetales y animales
- Son volátiles
- Poca densidad

2.2.1.5.- Propiedades Físico-Químicas

Propiedades Físicas:

- Son líquidos a temperatura ambiente
- Raramente presentan color
- Densidad es inferior a la del agua
- Usualmente están dotadas de poder rotatorio
- Tienen un índice de refracción elevado
- Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales
- Son liposolubles
- Son muy poco solubles en agua
- El vapor de agua los arrastra con facilidad (vaporizaciones)

2.2.1.6.- Propiedades Químicas

A diferencia de las propiedades físicas, las propiedades químicas son muy diversas, ya que las esencias pueden englobar sustancias muy heterogéneas. Puede la planta poseer una sola característica (como la glauterina y la canela) o poseer más de 30 compuestos (como en el caso del jazmín o la manzanilla). Pero aun así, los aceites esenciales comparten una estructura química similar llamada isopreno.

2.2.1.7.- Obtención

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales, se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos. Todavía se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal pero se sugieren varias hipótesis: puede ser para atraer los insectos para la polinización; para repeler a los insectos nocivos o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio.

Dada la composición química de los aceites, estos son por lo general muy inestables: son demasiado volátiles, frágiles y alterables con la luz. Así que los procesos de obtención deben de ser muy diversos y especializados.

Los aceites esenciales se obtienen por uno de los métodos siguientes:

- Destilación en corriente de vapor (o por arrastre al vapor)
- Extracción con disolventes volátiles,
- Expresión a mano o a máquina. Esta es una técnica fría
- Enfleurage, proceso en el cual se utiliza grasa como disolvente.
- A causa de la gran demanda de estos productos, la manera más habitual de obtenerlos es por síntesis artificial.
- Hoy los aceites esenciales sintéticos u obtenidos de fuentes naturales se purifican normalmente por destilación al vacío.

2.2.1.8.- Mecanismo de Acción de los Aceites Esenciales

El modo de acción antimicrobiano de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales no se debe a uno solo, sino a un gran número de grupos químicos diferentes presentes en éstos. Por lo tanto, su actividad antimicrobiana no es atribuida a un mecanismo específico sino a varios sitios blanco dentro y fuera de la célula ^{32, 133}. Además no todos los sitios blancos se afectan de forma separada, sino que algunos son consecuencia de la alteración previa de un mecanismo metabólico. Una característica importante de los aceites esenciales es que sus componentes tienen hidrofobicidad, lo que permite su reparto entre los lípidos de las membranas celulares, incluyendo las mitocondriales en el caso de eucariotes ^{47, 81, 131}.

Debido entonces a su lipofilia, su paso a través de la membrana y pared celular es libre, causando alteraciones en las diferentes capas de lipopolisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos permeabilizándolos. En las bacterias, la permeabilización de la membrana está asociada con la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la fuga del “pool” de ATP ^{52, 77, 29, 81, 131, 1, 144}. Algunas enzimas como las ATPasas se encuentran embebidas en la membrana celular y componentes como los grupos hidrocarburos cíclicos actúan sobre ellas, distorsionando la relación proteolipídica debido a la acumulación de éstos en la bicapa. Alternativamente se puede presentar, una interacción directa entre los componentes lipofílicos de los aceites esenciales con los componentes hidrofóbicos de las proteínas de las membranas ^{80, 131}.

Se ha encontrado que los componentes de los aceites esenciales también coagulan proteínas del citoplasma y producen daño en la pared celular conduciendo a una pérdida de macromoléculas y posteriormente la lisis y la muerte ^{45, 73, 80, 88, 110}.

Con base en investigaciones con levaduras, se ha reportado que la mitocondria es un sitio blanco importante para los componentes de los aceites esenciales¹²⁹. La permeabilización de la membrana interna y externa de la mitocondria, lleva a la muerte celular por apoptosis y necrosis; el análisis de los perfiles lipídicos por cromatografía de gases muestra una gran disminución en ácidos grasos insaturados al mismo tiempo que un incremento por igual de grasas saturadas⁵².

Así mismo, los aceites esenciales dañan al DNA mitocondrial causando deficiencias en el mecanismo respiratorio⁷. En general, la actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe mayormente a la presencia de fenoles tales como el carvacrol, eugenol (2-metoxi-4-(2-propenilfenol) y timol^{44, 53, 58, 31, 88, 136}. Así como aldehídos y alcoholes^{27, 123}.

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales implica el uso de múltiples compuestos a la vez, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra^{13, 74, 93, 130}, por lo que entonces es posible que los extractos vegetales y aceites esenciales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes a agentes antimicrobianos de uso común.

Los reportes sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no se pueden comparar directamente debido a diferencias metodológicas tales como la planta elegida, organismo a probar y método para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana^{57, 75}, esto evidentemente produce una variabilidad en los datos reportados sobre la actividad antimicrobiana, limitando la comparación entre estudios y pudiendo devenir en la duplicación de trabajos.

Aunque los aceites esenciales tienen un amplio espectro de actividad, no todos son capaces de inhibir a la mayoría de las bacterias¹⁵. Algunos estudios se han concentrado exclusivamente en un aceite o en un microorganismo.

2.2.2.- *Aniba rosaeodora* “PALO DE ROSA”

2.2.2.1.- Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
ORDEN	:	Lurales
FAMILIA	:	Luraceae
GÉNERO	:	<i>Aniba</i>
ESPECIE	:	<i>Aniba rosaeodora</i> Ducke
NOMBRE VULGAR	:	Palo de rosa, Pau-rosa ¹¹⁶ .

2.2.2.2.- Descripción Botánica

Árbol de hasta 40 m de alto y su diámetro llega a medir 2 metros ¹⁰¹. Ramitas tomentosas, hojas alternas, distribuidas en las ramitas, estrechamente elípticas a lanceoladas de 30 x 10 cm, haz glabro, envés diminutamente papiloso, margen generalmente revoluto. Inflorescencias multifloras, tomentosas, pedicelo conspicuamente diferenciado de la flor. Flores pequeñas con un tubo largo y los pétalos reducidos. Frutos de 3.5 x 2.4 cm, cúpula 1/4 del largo del fruto. Árboles hasta 20m, ramitas tomentosas.

Hojas distribuidas en las ramitas, estrechamente elípticas a lanceoladas, hasta 30x10 cm, haz glabra, envés diminutamente papiloso, margen generalmente resoluto; venas secundarias de 8-14 pares, pecíolos crasos. Inflorescencias tomentosas, multifloras, pedicelos conspicuamente diferenciados de la flor; pétalos iguales. Frutos 3.5x2.4 cm, cúpula ¼ del largo del fruto (ver anexo 2)

36, 148

2.2.2.3.- Composición Fitoquímica

El palo rosa presenta esencia de linalol en toda la planta ⁵, El linalol es el principal compuesto encontrado mediante la cromatografía a gases-masa (CG-MS), coincidiendo con los estudios realizados por Watson (1985) ¹⁵⁰, Estrella (1958), Centro de Comercio Internacional (1986) ³⁴, Guenther (1950) ⁶⁶ y Pabón (1982) ¹¹¹, con variación en las concentraciones de este alcohol terpénico ligeramente mayor en las hojas (1,5%) que en las ramas finas (1,3%) y en la corteza (1,0%) ³⁵.

Chacón *et al.* (2006) realizaron un análisis de cromatografía gaseosa (GC-MS) del palo de rosa en el laboratorio del Área de Transformación Química y en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina, el cual menciona compuestos aromáticos como ácido hexadecanóico (16.86%), α -terpinoleno (11.53%), β -costol (10.16%), óxido (-)-cariofileno (6.41%), ácido heptadecanóico (4.97%), γ -epoxi-elemeno (4.78%), 1 - deoxicepsidol (4.22%), endecano 3,4 dimetil ftalato (3.29%), colesté 4,6 - dien 3 ol (2.41%), aromandrene 2 (1.03%), aromandrene (0.99%), ácido tetradecanóico (0.98%) y dibutil del ácido decanedioico (0.98%) ³⁶.

2.2.2.4.- Uso Tradicional

Su principal utilización es como fuente de aceite esencial, cuyo componente principal es el Linalol, muy utilizado en la industria de perfumería ¹³⁸. Es empleado para tratar el acné, como afrodisíaco, antidepresivo, antimalárico, antimicótico, antiparasitario, antipirético, para suavizar las arrugas, como bactericida, en el cáncer, para las cicatrices, contra la cirrosis, en el colesterol alto (utilizada en dietas), para el cuidado general de la piel, contra la dermatitis, en el dolor de cabeza, en dolores musculares, como estimulante celular, del sistema inmunológico y de la circulación, para el estrés, en la frigidez sexual, contra la hepatitis, en infecciones, para las náuseas, como reconstituyente, regulador celular, en el resfrío, para la tensión nerviosa y en la tos ¹²¹.

Es transformado en derivados para diferentes tipos de industrias, principalmente en la producción de fragancias, actividad muy rentable en países Europeos como Francia; además es utilizado en la fabricación de jabones, fijador de esencias en los perfumes, disolvente de colorantes y resinas; y los esterres del linalol como saborizantes^{63, 114, 111}.

2.2.2.5.- Distribución Geográfica

Es una especie de selva tropical no estacional, de tierras bajas a sub montaña. Se presenta en suelos arcillosos, desarrollándose bien en claros de selva. La especie también se registra en áreas de sabana montañosa hasta los 1.280 msnm. También se encuentra distribuida en Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela (FAO, citada por la Global Tree Campaign, 2002)^{138, 36}.

Según Kubitzki & Renner (1982), se distribuye en Guianas, Amazonía Central (Región de Manaus-Brasil)⁸³.

2.2.3.- *Piper aduncum* “CORDONCILLO”

La familia *Piperaceae* comprende 10 géneros y aproximadamente 1,400 a 2,000 especies, distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta⁶². El género *Piper* pertenece a la familia *Piperaceae*, se distribuye en todo el mundo con aproximadamente 2300 especies.

Este género tiene una gran importancia comercial y económica, para la industria de condimentos, farmacéutica, insecticida y se ha reportado un amplio uso tradicional en la alimentación y en el tratamiento de diversas enfermedades³.

2.2.3.1.- Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
ORDEN	:	Piperales
FAMILIA	:	Piperaceae
GÉNERO	:	<i>Piper</i>
ESPECIE	:	<i>Piper aduncum</i> Linnaeus
NOMBRE VULGAR	:	Cordoncillo, pimenta de macaco ¹³⁹ , Matico ⁹⁴ .

2.2.3.2.- Descripción Botánica

Arbustos o arbolitos hasta 7m, pubérrulos-escabrosos. Hojas verdosas cuando están secas, ovadas a ovado-elípticas, 12-24 x 4-8 (10) cm, ápice estrechamente atenuado acuspidado o acuminado, base asimétrica, lobado- cordada, hazescabrosa, envés hispido- velloso; venas secundarias 5-8 pares, arqueadas hacia el ápice, recorriendo la lámina más que $\frac{2}{3}$ de su largo, pecíolos 3-12mm de largo, paginados en la base.

Espigas curvadas, brácteas triangulares a redondeadas a sub-peltadas, fimbriadas, flores con anteras dehiscentes por aberturas individuales, estigmas sésiles. Infrutescencias 80-150 x 3-4 mm, curvadas pedúnculo 10-12 mm, de largo, drupas glabras o ligeramente papilosas^{62, 148}.

Arbolillo delgado, erecto de 4 m de alto. Tallos verdes, glabros, nudos hinchados. Hojas con peciolo corto; lámina ovada, de 15 x 9 cm, oblicuamente atenuada en la base, largamente atenuada en el ápice; superficie escabrosa, nervadura secundaria mayor levantada desde la mitad inferior de la vena media. Inflorescencia erecta, 4 mm de grosor, 12 cm de largo, curvado, blanco
37, 149, 62, 109, 125, 129, 137

2.2.3.3.- Composición Fitoquímica

Químicamente los constituyentes más comunes de este género son ácidos benzoicos prenilados, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, kawalactonas, epóxidos y alcaloides como la isobutilamina, piperidina y pirrolidina entre otros ^{86, 113}. Una característica de las plantas del género *Piper* es la presencia de aceites esenciales, que podrían ser característicos de cada especie ^{113, 126}.

Composición mayoritaria obtenida en el análisis cromatográfico de los aceites de *Piper aduncum* se encuentra el dilapiol ^{99, 117, 134} además de cineol y α -pineno ²⁰.

Sus hojas y ramas contienen aceites esenciales, ácido artánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides triterpenoides ¹¹², aduncamina ¹⁰⁹, borneol ⁷⁰ y pinostrobin ²⁸, dilapiol ^{1, 33, 48, 62, 99, 109}.

2.2.3.4.- Estudios Farmaco-Toxicológicos

La presencia de sus aceites esenciales del género *Piper* confirma su carácter aromático, por lo que se les puede atribuir las propiedades analgésicas, antihelmínticas, antirreumáticas ¹⁰, antiulcerosas, bactericidas, carminativas ³⁸, dermatológicas, digestivas, diuréticas e insecticidas ^{16, 39, 50, 98}.

Los aceites esenciales de *P. aduncum* presentaron alta actividad larvicida contra *Aedes aegypti*, siendo la Concentración Letal 50 = 0.0057% ⁹⁹. En estudios realizados en Cuba ², se comprobó la acción insecticida de *P. aduncum* en *Blatella germanica*. Arroyo *et al* (2012) realizaron un estudio en el Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marco, el cual demostraron el efecto antihipertensivo al administrar por vía oral el extracto etanólico de *Piper aduncum* 'matico' en ratones con inducción de hipertensión por L-NAME ⁶.

Para esta especie se encuentran reportes de usos en la medicina tradicional como antifúngicos, antibacterial y antiespasmódico, entre las cuales se encuentra la actividad antiplasmodial de un ácido benzoico prenilado denominado ácido 3-[(2E, 6E, 10E) - 11 - carboxi - 3, 7, 15 - trimetil - 2, 6, 10, 14 - hexadecatetraenil) - 4, 5 - dihidroxibenzoico con una actividad sobre la cepa sensible a la cloroquina F32 de *Plasmodium falciparum* con una IC50 = 32,2 µg/mL^{61, 145}. Posiblemente a este compuesto se le atribuya la actividad presentada en el extracto de etanólico de las hojas. También se confirmó su actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* a una concentración menor de 0.1 mg/mL¹⁴⁹. *P. aduncum* presentan actividad hasta el cuarto estadio contra *An. albimanus* y hasta el tercer estadio contra *St. aegypti* a una concentración menor de 0.5 mg/mL⁴⁹. El dilapiol de *P. aduncum* presenta una buena actividad insecticida¹³², este éter fenil que ha sido probado con éxito como fungicida, molusquicida, acaricida, bactericida y larvicida, el cual ha demostrado actividad contra larvas de *Aedes aegypti* en concentraciones de 500 µg/mL¹¹⁸.

2.2.3.5.- Uso Tradicional

Las plantas del género *Piper* se le atribuyen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, carminativas, estimulantes, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antidiarreicos, antihelmínticas, antiflogísticas y bactericidas^{37, 109, 125}. El aceite esencial de esta especie posee propiedades antibacterial y actividad contra insectos y moluscos. La infusión preparada con las hojas y decocción de la raíz se utiliza para tratamiento de diarrea, disentería, vómitos, úlceras, así como para controlar hemorragias^{URL2}. Este género es utilizado localmente como antídoto contra mordeduras de serpientes y así mismo como remedio eficaz en el tratamiento de cálculos renales y afecciones bronquiales¹²⁵. De esta planta se ha informado las hojas empleadas en infusión, decocción, y tintura para el tratamiento de úlceras simples del estómago, también se utiliza para el tratamiento de problemas estomacales, la apatía intestinal y cólicos ventosos²⁸.

Para el tratamiento de heridas externas y hemorragias externas se usa una solución de tintura en la zona afectada y luego se aplica encima hojas secas pulverizadas^{68, 71, 102, 121}. En Brasil lo usan como tónico y antiespasmódico^{127, 139}.

2.2.3.6.- Distribución Geográfica

Las especies del género *Piper* (Piperaceae) se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, muchas de las cuales se consideran plantas medicinales en Latinoamérica y la región de las Indias Occidentales²⁰.

Se distribuye ampliamente en Cuba⁹⁹. En nuestro país se distribuye en Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín, Ucayali¹²¹.

2.2.4.- *Citrus medica* “CIDRA”

2.2.4.1.- Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica es la siguiente:

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
ORDEN	:	Sapindales
FAMILIA	:	Rutaceae
GÉNERO	:	<i>Citrus</i>
ESPECIE	:	<i>Citrus medica</i>
NOMBRE VULGAR	:	Cidra

2.2.4.2.- Descripción Botánica

El *Citrus medica* es un árbol pequeño o arbusto perennifolio, de 2,5 a 5 m de altura, con el fuste retorcido y ramaje denso y rígido, con espinas en las axilas foliares. Las hojas son simples, alternas, elípticas a lanceoladas, de hasta 18 cm de largo, de superficie coriácea y color verde oscuro por el haz, con una distintiva fragancia de limón, ubicadas al cabo de pecíolos cortos. Produce flores hermafroditas, fragantes, de buen tamaño, blancas o purpúreas, formando racimos pequeños. Tienen de 4 a 5 pétalos, con 30 a 60 estambres.

El fruto es un hesperidio oblongo o globoso, raramente piriforme, de hasta 30 cm de diámetro, variando mucho entre ejemplares y aún en el mismo ejemplar, con el estilo bien marcado.

Está recubierto de una cáscara gruesa, carnosa, pegada al endocarpo, de color amarillo o verdoso, con glándulas oleosas pequeñas y frecuentemente rugosas. Tiene 10 a 15 carpelos, firmes, poco jugosos, dulces o ácidos según la variedad. Normalmente las semillas son pequeñas, monoembríonicas, lisas, blancas por dentro y abundantes.

La corteza de los frutos es muy gruesa en relación con el radio de la pulpa. Los frutos son voluminosos, oblongos, verrugosos, con poco jugo.

2.2.4.3.- Composición Fitoquímica

Contiene flavonoides como hesperidósido, limocitrina en el pericarpo de los limones españoles; presenta ácido ascórbico (Vitamina C), ácido cítrico; ácido caféico (fruto). También presenta aceites esenciales como isopulegol, α -bergamoteno, α -pineno, α -terpineno, α -tujeno, β -bisolobeno, β -bergamoteno, β -felandreno, citral, limoneno y sabineno, (en el fruto); cafeína (en hojas), pectina y minerales (potasio y calcio)

2.2.4.4.- Uso Tradicional

Se considera un excelente antiescorbútico, que ya se empleaba empíricamente mucho antes de que se descubrieran las vitaminas. La esencia es antiséptica, carminativa y diurética, actividades que se ven reforzadas por la presencia de flavonoides que además ejercen una acción venotónica y vasoprotectora, controlando la permeabilidad de los vasos sanguíneos capilares y aumentando su resistencia a la rotura.

La pectina, por su parte, tiene un efecto hemostático y protector de la mucosa gastrointestinal. Externamente actúa como antiséptico, cicatrizante, hidratante y demulcente. No obstante, hay que advertir que la esencia debe administrarse con precaución, sobre todo en niños, por la posibilidad de que aparezcan reacciones alérgicas ¹²¹.

2.2.4.5.- Distribución Geográfica

Llegó a América a través de España; los conquistadores lo introdujeron en Florida, Puerto Rico y finalmente Perú; aunque se desarrollaron plantaciones comerciales, eventualmente la dificultad de su crecimiento llevó a su abandono. En Centroamérica, Brasil y Colombia se ha naturalizado, y existen plantaciones de alguna extensión, sobre todo para exportación

2.2.5.- Método de Susceptibilidad por Disco de Difusión Kirby – Bauer

2.2.5.1.- Aspectos Generales

Se han desarrollado muchos métodos específicamente para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales^{32, 96, 120, 135}. El beneficio de basar los nuevos métodos en los ya existentes como los ensayos convencionales del “National Committee for Clinical and Laboratory Standards” (NCCLS), es que los nuevos ensayos tenderán a ser más fácilmente aceptados por cuerpos regulatorios^{32, 135}. El NCCLS es un subcomité desarrollado por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), un centro de colaboración de la Organización Mundial de la Salud (OMS ó WHO por sus siglas en inglés) cuya función es estandarizar y acreditar las pruebas clínicas y que fue creado en 1967^{URL4}.

El NCCLS se encarga de determinar y en su caso mejorar, la calidad de los resultados de laboratorio identificando la necesidad, prioridad y manejo del desarrollo de los protocolos y guías en los laboratorios clínicos y manufactureros para que estos puedan caracterizar y mejorar los sistemas analíticos. Así mismo, cubre otras funciones: mejorar y estandarizar los procedimientos de control de calidad y la interpretación de los resultados de prueba en los laboratorios clínicos microbiológicos; establecer un criterio de proceso para los medios de cultivo, procedimientos automatizados o métodos de prueba en la microbiología clínica; y mejorar el manejo de los servicios clínicos y de laboratorio en bien del paciente.

Además, los métodos del NCCLS se han diseñado específicamente para asegurar la actividad de los componentes antimicrobianos, y los factores que afecten la reproducibilidad se han investigado exhaustivamente⁷⁵. Aun cuando los métodos del NCCLS se han desarrollado para agentes antimicrobianos convencionales, se pueden hacer modificaciones menores para que estos métodos puedan ser usados para probar la efectividad de aceites esenciales y extractos vegetales³².

La técnica actualmente utilizada para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es el producto de importantes esfuerzos internacionales desde hace más de dos décadas enfocados a normatizar el método. El comité de expertos de la OMS sugirieron recomendaciones que fueron seguidas por la mayor parte de los países europeos. Sin embargo, la falta de un acuerdo general sobre los puntos de corte para la interpretación de estas pruebas continúa siendo un tema de importantes esfuerzos internacionales.

Europa está dividida en varias regiones de influencia con diferentes sistemas de sensibilidad antimicrobiana: Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos, el Sistema DIN, el de los países bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de Microbiología y el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS). En nuestro país y en la mayoría de los países latinoamericanos se siguen las pautas del NCCLS con algunas modificaciones.

2.2.5.2.- Principio del Método

El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobianos en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Se formará así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio.

El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa del agar, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, la temperatura, la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo. Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados y estandarizados cuidadosamente.

El método recomendado por la NCCLS (Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se basa en los estudios de *Bauer* y colaboradores ¹³⁶. Este es el método descrito de manera más completa para el cual se han desarrollado tablas de interpretación que están respaldadas por datos clínicos y de laboratorio. El único método alternativo que ha sido estudiado adecuadamente y que demostró datos comparables de los diámetros de las zonas de inhibición, con precisión similar y correlación satisfactoria con la CIM, es la modificación de doble capa de Barry, García y Thrupp ¹⁰⁵. Este método es una alternativa aceptable para la normalización del inóculo en las pruebas de sensibilidad de aislamientos de gérmenes patógenos de rápido crecimiento, como *S. aureus*, Enterobacterias y *P. aeruginosa*. El método de doble capa en agar no es aplicable a las pruebas con otros microorganismos tales como *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., etc.

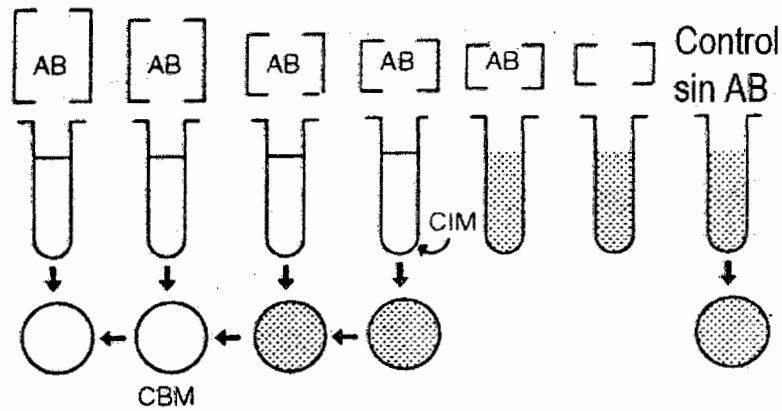
Las pruebas por cualquiera de los dos métodos pueden interpretarse con las mismas tablas de medida de los halos de inhibición si los resultados de las pruebas con las cepas controles se encuentran dentro de los rangos esperados.

2.2.5.3.- Macrodilución en Caldo

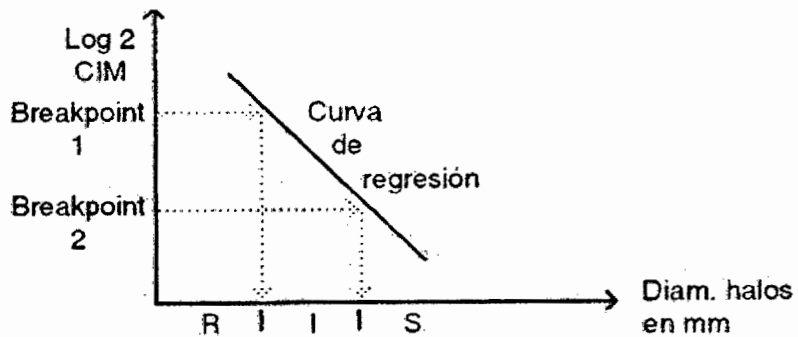
Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método ¹²⁴.

Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo.

Figura 1. Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)



Relación entre los puntos de quiebre (“break point”) y el halo de inhibición en la técnica de Antibiograma.



Fundamentos: consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM (ver figura 1).

2.2.5.4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La concentración mínima inhibitoria de un agente antimicrobiano es aquella que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible en una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Se determina incubando una cantidad conocida de bacterias en presencia de diluciones definidas del agente

antimicrobiano, posteriormente se hacen los conteos correspondientes para determinarla. Ésta es probablemente la prueba de determinación de CMI más popular. Utilizando los criterios del NCCLS, los resultados son interpretados como microorganismo sensible (tratable), intermedio o resistente (intratable)

106

2.2.5.5.- Lectura e Interpretación de la CMI

La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en µg/ml. Luego se debe recurrir, teniendo en cuenta el valor de CIM obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CIM que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico ⁶⁰.

2.2.5.6.- Característica de las cepas en estudio

2.2.5.6.1.- *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva esférica que se agrupa en pares, cadenas cortas o agrupado en racimos. Algunas cepas son capaces de producir toxinas termostables capaces de causar enfermedades en humanos como la estafiloenterotoxiosis. La estafiloenterotoxiosis, estafiloenterotoxemia o intoxicación estafilocócica es una intoxicación alimentaria asociada a *Staphylococcus aureus* ⁴².

La gravedad de los síntomas depende de la susceptibilidad del individuo hacia la toxina, la cantidad ingerida de alimento contaminado, la cantidad ingerida de toxina y la salud general en general del hospedero. Los síntomas más comunes son náusea, vómito, dolor y calambres abdominales y postración. Algunos individuos podrían no siempre mostrar todos los síntomas asociados con la enfermedad ³⁰.

En los casos más graves podrían presentarse dolores de cabeza, calambres musculares y cambios temporales en la presión arterial y en la frecuencia del pulso. La recuperación generalmente lleva dos días. Sin embargo, no es inusual que la recuperación completa lleve tres días y algunas veces más en los casos más graves ^{URL3}. Esta intoxicación está asociada a alimentos que se han sometido a un proceso de cocción inadecuado o bien a un almacenamiento a bajas temperaturas (7.2 °C o menos) ^{URL3}. *S. aureus* es el agente más identificado como causante de enfermedades nosocomiales y es causante de la muerte de ancianos, infantes y personas inmunocomprometidas o muy débiles en casos de enterotoxiosis ^{URL3}.

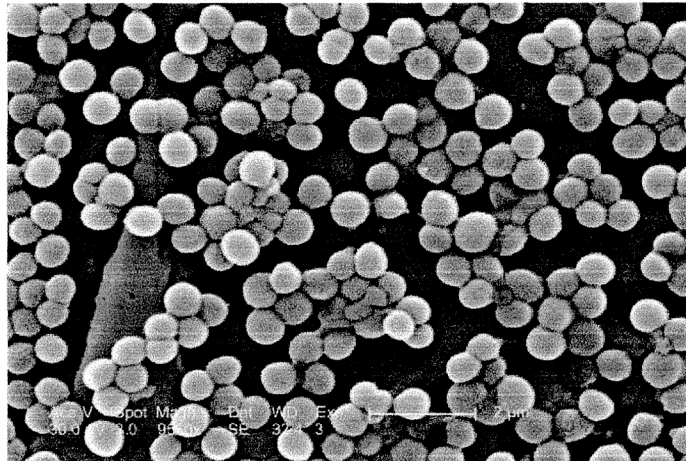


Figura N°2. Microfotografía de contraste de *Staphylococcus aureus*

S. aureus se encuentra en el aire, el suelo, el sistema de drenaje, agua, leche y comida o maquinas preparadoras de productos alimenticios, mascotas y humanos. Estos dos últimos son los reservorios principales pues el microorganismo se encuentra en pasajes nasales y garganta, el pelo y la piel de casi el 50% de los individuos aparentemente sanos. La incidencia se incrementa ante los individuos que se encuentren en contacto con personas propensas a la adquisición del microorganismo ^{85, URL3}.

2.2.5.6.2.- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo ambiental común resistente a algunos desinfectantes químicos, y que además puede crecer en algunos de ellos. *P. aeruginosa* es el principal agente biológico de la mayoría de las intoxicaciones, septicemias y enfermedades gastrointestinales intrahospitalarias ¹⁰⁷.

Asimismo, los miembros de la familia *Pseudomonaceae* son relevantes en los procesos de conservación de alimentos y constituyen puntos de riesgo en programas de calidad de acuerdo con HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points) ¹¹⁹.

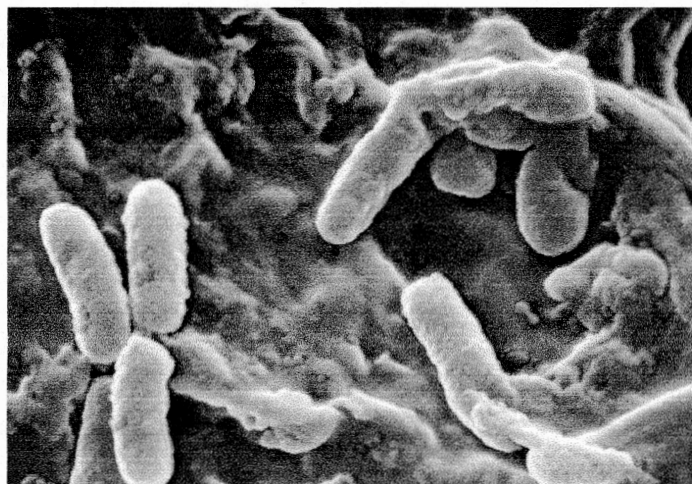


Figura N° 3. Microfotografía electrónica de barrido de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena Gram negativa de 2-5 μm de largo por 1 μm de ancho, móvil por un flagelo polar. Versátil y oportunista en términos de su genética, potencial metabólico y mecanismos de virulencia (ver fig. 5) ¹⁴⁷, ubicuo en la naturaleza e inocuo en casi todos los ambientes, sin embargo, *P. aeruginosa* puede causar infecciones graves o hasta mortales en pacientes inmunodeprimidos ⁶⁵.

Esta versatilidad le da oportunidad de responder a condiciones ambientales variables y frecuentemente adversas. Considerado por muchos como un organismo aeróbico, es capaz de crecer anaeróbicamente en presencia de ciertos sustratos como los nitratos o la arginina ¹⁴⁷. Es capaz de crecer en fuentes nutritivas muy simples e inclusive utilizar lentamente compuestos empleados en la formulación de desinfectantes y antisépticos. Se considera mesofílica, aunque puede crecer a 42 °C. *P. aeruginosa* se considera de fácil crecimiento, por lo que puede ser recuperada en medios simples, ricos y selectivos.

Asimismo, la patogenicidad del microorganismo se asocia a algunos factores de virulencia que lo hace particularmente hábil para infectar tejidos de hospederos específicos. Entre los principales están: toxinas extracelulares, proteasas, hemolisinas y exopolisacáridos por mencionar algunos ^{64, 65, 79, 90, 91, 103, 147}.

2.2.5.6.3.- *Bacillus cereus*

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño (4-10 µm), Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Son capaces de sobrevivir en medios hostiles mediante la formación de una estructura muy resistente, la endospora (también llamada spora o esporo), la estructura con vida más resistente a los agentes físico-químicos, y por lo tanto, a la esterilización y desinfección ⁹⁵.

La presencia de *Bacillus* spp. es frecuente en una gran variedad de ambientes naturales, se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno ^{140, 143}.

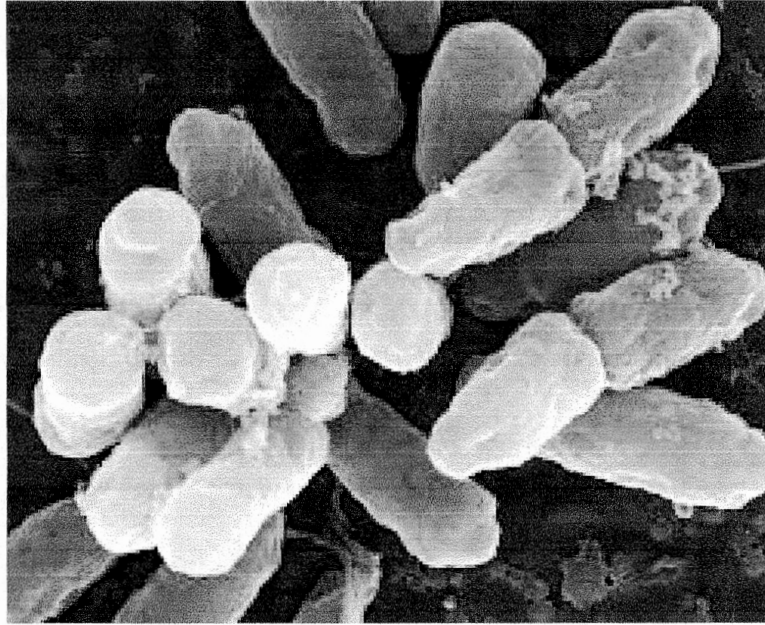


Figura N° 4. Micrografía electrónica de barrido de *Bacillus cereus*

Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos ⁸².

Forman parte de las bacterias reveladas mediante la cuenta estándar en placa, fácilmente detectables en la mayoría de las aguas de consumo ¹². Elaboran enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Entre las especies más representativas del género *Bacillus* se encuentran *B.alkalophilus*, *B anthracis*, *B azotoformans*, *B brevis*, *B cereus*, *B subtilis*, *B coagulans*, *B firmus*, *B insolitus*, *B lincheniformis*, *B polimyxa* y *B turingiensis* ¹⁴. Las esporas de algunas especies (sobre todo de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*) sobreviven a la cocción, germinan seguidamente y crecen bajo condiciones favorables.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1.- METODOLOGÍA

3.1.1.- Lugar de Estudio

El trabajo Farmacognósticos se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) del Seguro Social (EsSalud) ubicada en pasaje Nuevo San Lorenzo s/n (Carretera Abelardo Quiñonez), Distrito de San Juan Bautista. La determinación de la Actividad Antimicrobiana mediante el Método de KIRBY-BAUER se realizó en los ambientes del Laboratorio de Ingeniería Alimentaria ubicado en la Planta Piloto de la Universidad nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos, entre los meses de julio y noviembre del 2012.

3.1.2.- Tipo de Investigación

Se empleó el siguiente tipo de investigación:

- *Experimental*, porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que modifica el comportamiento de las variables en estudio (Aceites esenciales y microorganismos), las mismas que fueron medidos en determinados momentos.
- *Descriptivo*: porque el estudio describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- *Prospectivo*, porque se desarrolló hacia delante del tiempo.
- *Longitudinal*, porque permitió realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.3.- Diseño de la Investigación

Figura N° 05. Esquema del diseño de investigación en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

	Resistente	Intermedio	Sensible	
CMI				
8				Resistente
4				
2				
1				Intermedio
0,5				
0,25				Sensible
0,12				
0,06				
0,03				
	<14 16 18	20 22 24 26	28 30 32 34 36 38 40 42	
	Diámetros (Kirby-Bauer)			

3.1.4.- Flujograma de Estudio

3.1.4.1.- Diagrama de Flujo para Extracción de los Aceites Esenciales

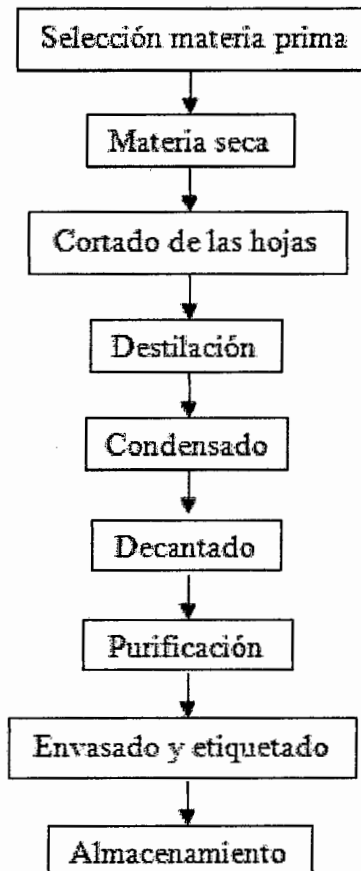
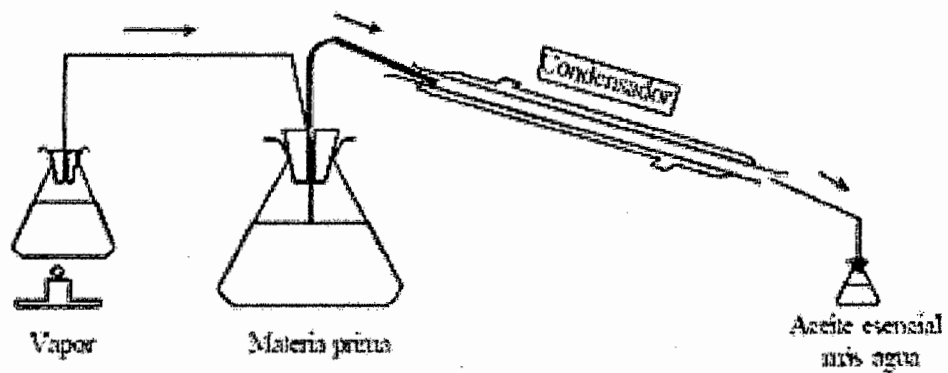
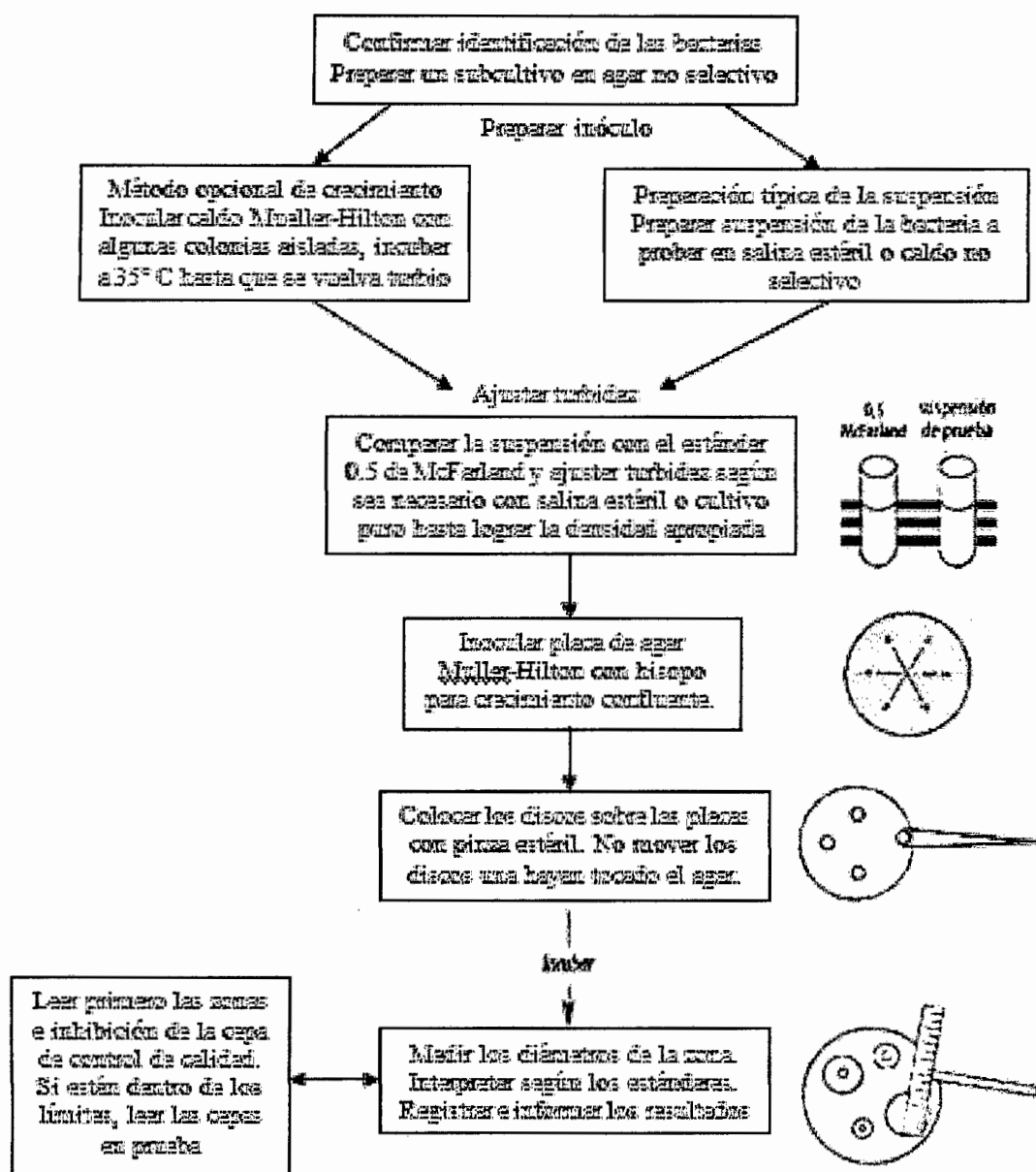


Figura N° 6. Diagrama del equipo utilizado para la extracción de los aceites esenciales



3.1.4.2.- Diagrama de Flujo del Procedimiento General para la prueba de Susceptibilidad



Para la interpretación de los resultados se consideraron 3 categorías:

- Inhibición del crecimiento, a todo halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que la bacteria es sensible al compuesto.
- No inhibición del crecimiento, es decir que no se forma halo y la bacteria no es sensible. Se presenta en la tabla como (NI)
- Inhibición del crecimiento en forma irregular, es decir que se observa una inhibición pero el halo no adopta la forma esperada. Se presenta en la tabla como (II) Las soluciones de terpenoides utilizadas para embeber los discos poseen un grado de pureza del 99%.

3.1.5.- Procedimiento Experimental

3.1.5.1.- Recolección y Procesamiento de las Muestras

La muestra botánica fue envuelta en papel periódico y puesta en costales desinfectados para su transporte al Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET) del Seguro Social (EsSalud) ubicada en pasaje Nuevo San Lorenzo s/n (Carretera Abelardo Quiñonez), Distrito de San Juan Bautista. Con la muestra botánica recolectada se anotaron los datos referente a la especie y fecha de colecta, luego parte de la muestras botánica se preuso y fue sometido al proceso de secado a temperatura de 40° C, luego las muestras pasaron al montaje sobre cartulina y se etiquetaron consignándose los siguientes datos, según anexo N°01.

3.1.5.2.- Identificación Taxonómica de la Muestra Vegetal

La identificación taxonómica de las especies colectadas fueron identificadas en el *Herbarium Amazonense* de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, con la asesoría de un botánico, el cual determinó la categoría taxonómica según el sistema de clasificación de *Engler & Prantl* modificado por *Melchor*.

3.1.5.3.- Preparación de Materia Prima

Con la finalidad de adecuar la materia prima para el proceso de extracción, se realizaron operaciones previas, según los protocolos estandarizados del laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Medicina Tradicional (IMET-EsSalud) cuyas metodologías están descritas en las referencias bibliográficas 26, 76, 87, 146

3.1.5.3.1.- Limpieza

Se eliminó cuidadosamente el polvo y la tierra adherida, de preferencia se utilizaron cuchillos de acero inoxidable de hoja roma

3.1.5.3.2.- Lavado

Tuvo por finalidad eliminar los últimos vestigios de tierra, se realizó mediante un flujo continuo de agua potable a temperatura ambiente y luego se dejó escurrir y se dio un oreado por seis (06) horas para eliminar el exceso de humedad.

3.1.5.3.3.- Cortado

Debido a que la muestra debe ser secada, se recomienda cortarlas en hojuelas de 1 cm para facilitar la operación de secado. Esto se realizó en forma manual con ayuda de cuchillos de acero inoxidable.

3.1.5.3.4.- Secado

Se realizó para facilitar el proceso de extracción; se hicieron pruebas con un secador de bandejas a 60°C, secado natural bajo el sol y secado natural bajo cobertizo. El tiempo total de secado estuvo comprendido entre una a dos semanas y la humedad final de la materia prima varió entre 12 y 13%.

3.1.5.3.5.- Molienda

Se utilizó un molino de martillo de malla intermedia para obtener un mayor número de partículas, haciéndolo más eficiente la extracción al aumentar la superficie de contacto.

3.1.5.4.- Estudio Farmacognóstico

El estudio farmacognósticas se realizó en el laboratorio de Fitoquímica del IMET-EsSalud, según *Kuklinski* (2000)⁸⁴ (ver Anexo N° 9)

3.1.5.5.- Proceso de Extracción

La extracción de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra) se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor⁶⁶, para ello las muestras botánicas se puso en un matraz y se aplicó calor durante dos horas aproximadamente, en donde se obtuvo la evaporación del aceite esencial y una mezcla de vapor – aceite esencial.

3.1.5.5.1.- Condensado

En esta etapa se logró condensar los vapores del destilador, el producto resultante fue una emulsión constituida por agua-aceite esencial, puesto que ambos presentan diferentes densidades.

3.1.5.5.2.- Decantado

Para la separación total del aceite esencial y el agua se utilizó una pera de separación en donde debido a la diferencia de densidades, es posible separar la mayor parte del agua.

3.1.5.5.3.- Purificación del Aceite

Al aceite obtenido de la decantación se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro, añadiéndolo al vaso de precipitado; luego se filtró separando al aceite esencial de las impurezas.

3.1.5.5.4.- Envasado y Almacenamiento

Cada muestra fue colocada en viales de vidrio color ámbar, y éstos, a su vez, se guardaron en refrigeración, evitándose la volatilización del aceite esencial.

3.1.5.6.- Determinación del Rendimiento

Para el cálculo de los porcentajes de rendimientos se utilizará la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra total}} \times 100$$

3.1.6.- Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

1.6.1.- Preparación del Inóculo

Con un asa bacteriológica se tocan cuatro o cinco colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico y se inoculó en 4 ml de caldo *Mueller Hinton*. Los cultivos de caldo se dejaron incubar por 2 horas a 35°C hasta la aparición de una turbidez ligeramente visible. La turbidez se ajustó con caldo Nutritivo BHI para obtener una turbidez visualmente comparable a la del estándar (0.5 de *Mc Farland*). Luego de preparado el inóculo bacteriano con la cepa en estudio se realizaron los siguientes pasos:

- Se introdujo un asa bacteriana estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Antes de retirarlo se escurrió sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.
- Se sembró la placa de *Mueller Hinton* de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se realiza estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.
- Se dejó secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

- Se colocó los discos, los cuales fueron colocados con pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se presionó los discos levemente para que quedaran adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. En las placas de 100 mm se colocó 5 discos.
- Luego de colocados los discos las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Las placas se colocaron en forma invertida para evitar que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo cual hubiese cambiado las condiciones del medio de cultivo y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.

1.6.2.- Preparación de los Discos de Sensibilidad

Con un perforador estéril se perforó papel filtro Wattman N° 01, obteniéndose discos de 5.5mm de diámetro. Se añadió 15 µl de los aceites esenciales en estudio en cada disco de papel.

1.6.3.- Aplicación de los Discos

- Se aplicó los discos usando unas pinzas ligeramente flameadas
- Se presionó los discos ligeramente contra el Agar.
- Se usó 5 discos por placa.

1.6.4.- Porcentaje de Inhibición Relativa

Para determinar el porcentaje de inhibición relativa se realizó la siguiente fórmula:

$$\text{PIR (\%)} = \frac{\mathbf{A} \times 100}{\mathbf{B}}$$

A = Promedio del diámetro del halo de inhibición de la muestra

B = Promedio del diámetro del halo de inhibición del antibiótico

1.6.5.- Lectura

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición con el vernier sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre los microorganismos estudiados. Para interpretar los resultados se tomó como referencias como:

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm.
- Sensibilidad limite (sensible = +) de 9 a 14 mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm.
- Sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.⁽⁵⁵⁾

3.1.7.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se basó en las normas de la NCCLS. Se preparó Caldo Nutritivo en tubos con tapa rosca en los que se añadieron los aceites esenciales preparados a concentraciones finales de 0.00mg/ml (control negativo), 3.50mg/ml, 6.25mg/ml, 12.50mg/ml, 25.00mg/ml y 50.00mg/ml se autoclavarón los tubos a 125° C a 15lb de presión, luego de atemperar los tubos a 37° C se sembrará 10^7 UFC de las bacterias control en los tubos con Caldo Nutritivo BHI, se incubarán a 37° C por 48 horas, luego se tomó 15µl del cultivo y se añadió al caldo nutritivo BHI, los que se incubaron a 37° C por 48 horas, al cabo de ese tiempo se registró la turbidez de los tubos.

Al cabo de 24 horas se observa la turbidez de los tubos que indicara desarrollo bacteriano. La concentración del aceite esencial que presente ausencia de crecimiento, es detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). (Anexo Foto N° 08)

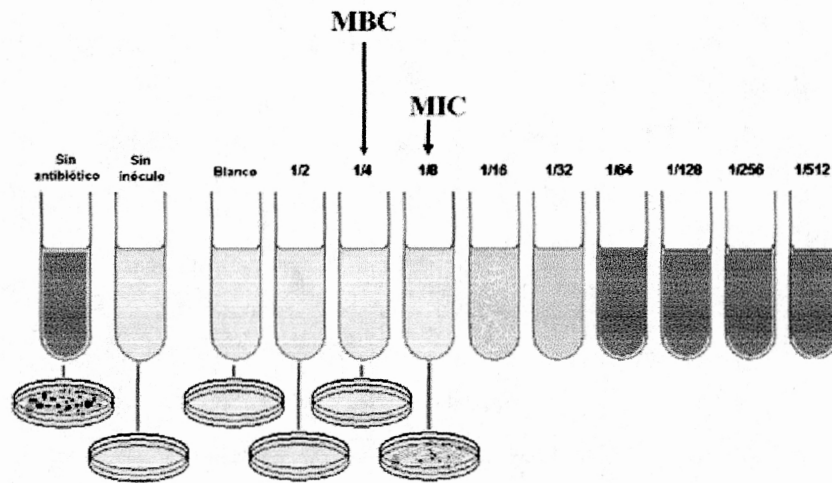
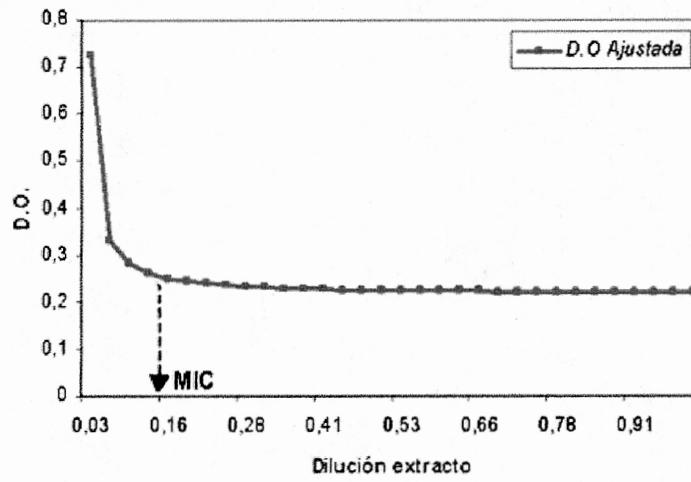


Figura N° 7. Fundamento de la determinación de la mínima concentración inhibitoria y de la mínima concentración bactericida, mostrando las diferencias entre estas dos variables.

3.2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1.- Población en Estudio

Lo constituyen las unidades de las especies vegetales de:

- *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa)
- *Piper aduncum* (Cordoncillo)
- *Citrus medica* (Cidra)

3.2.2.- Muestra en Estudio

La muestra vegetal lo constituyen las hojas frescas de:

- *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa)
- *Piper aduncum* (Cordoncillo)
- *Citrus medica* (Cidra)

3.2.3.- Selección de las Muestras Botánicas

La selección de las muestras botánicas a estudiar, se realizará tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Arbustos jóvenes de tamaño mediano de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra).
- Hojas sanas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra).

3.2.4.- Lugar de Muestreo

Las muestras botánicas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra) se colectaron en la comunidad de “TAMSHIYACU”, ubicado en las coordenadas geográficas aproximadamente de 3° 59' 54" de latitud sur 73° 09' 43" de longitud oeste, altitud de 108 m.s.n.m. distrito de Fernando Lores, departamento de Loreto. El lugar de muestreo se eligió debido a que en la comunidad se da el crecimiento abundante de estas especies y es aprovechada por los pobladores para uso medicinal.

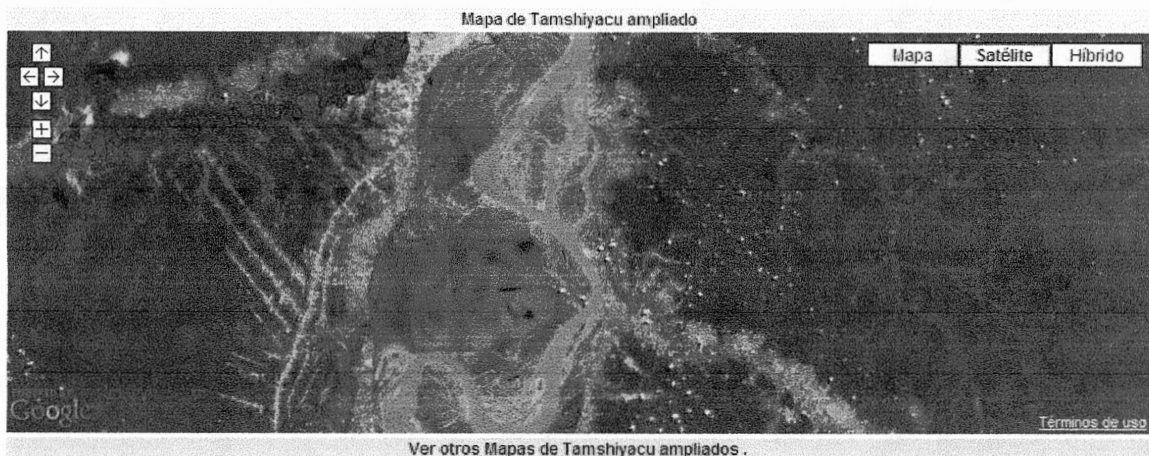


Figura N° 8. Mapa satelital de la comunidad de TAMSHIYACU



Figura N° 9. Mapa satelital de la comunidad de TAMSHIYACU

3.3.- INSTRUMENTOS

3.3.1.- Material Vegetal

- El material vegetal serán los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (Cordoncillo) y *Citrus medica* (Cidra)

3.3.2.- Material Biológico en Estudio

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Bacillus cereus* ATCC 14579

3.3.3.- Medios de Cultivos

- Agar *Mueller Hinton*

3.3.4.- Materiales de Vidrio

- Balón
- Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Matraz 1000 ml.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Peras de separación
- Placas Petri de 150 mm y 100 mm
- Probetas de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Vasos precipitados de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.

3.3.5.- Materiales de Plástico

- Hisopos estériles
- Micropipetas graduables de 10, 100 y 1000 μ l (Labsytem)
- Tip's 200 y 1000 μ l

3.3.6.- Material de Metal

- Asa de siembra bacteriológica que termina en aro.
- Escobillas para tubos.
- Gradilla metálica.
- Machete
- Pinza estéril.
- Tijera

3.3.7.- Otros Materiales

- Medidor de halo antimicrobiano (vernier)
- Detergente.
- Guantes quirúrgicos.
- Mascarillas.
- Papel periódico
- Papel filtro

3.3.8.- Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara fotográfica profesional
- Cocina eléctrica
- Destilador de aceite
- Incubadora con una temperatura que se regula entre 60 y 65 °C
- Refrigeradora

3.3.9.- Reactivos

- Agua destilada
- Suero fisiológico estéril
- Ácido sulfúrico
- Cloruro de Bario

3.4.- ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico se realizó aplicando un análisis de varianza (ANOVA) a través de un diseño completamente al azar para corroborar si existía una actividad antimicrobiana significativa de los aceites esenciales.

3.5.- PROTECCION DE LOS DERECHOS HUMANOS

La cantidad de las muestras a utilizar, no involucra grandes cantidades de las hojas, que ponga en peligro la especie o atente contra la conservación de la biodiversidad.

El área de microbiología, donde se realizó los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que pueden presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ellos se contará con las estrictas medidas de bioseguridad ⁷⁸.

El manejo de las cepas microbianas será realizado por el personal especializado del Laboratorio, la cual no involucra grandes cantidades de material biológico que ponga en riesgo la bioseguridad de la institución, la integridad física del personal que labora en la misma o atente contra la vida ni de los tesisistas ni de los asesores.

3.6.- CUESTIONES ÉTICAS EN LA EXPERIMENTACIÓN

Los avances técnicos-científicos en estos últimos años han conducido a fortalecer el criterio de la evaluación antimicrobiana, en especial el riesgo biológico a cepas resistentes. En la misma medida que estos conocimientos se han revelado; y teniendo en consideración la responsabilidad ética (e incluso económica) de salvaguardar la salud y el bienestar de los animales de experimentación, preservándolos de cualquier daño, dolor y sufrimiento innecesario antes, durante y después del período del estudio ^{40, 104}, se ha hecho evidente la necesidad de desarrollar nuevos modelos de evaluación de potencial antimicrobiano, que permitan aplicar la Regla de 3 R (Reducción, Refinamiento, Reemplazo) ¹⁷, en la cual podamos Reducir a cero el número de animales.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1.- RESULTADOS

4.1.1.- Determinación de las Características Organolépticas

TABLA N° 1

Propiedades Farmacognósticas de los Aceites Esenciales en estudio.

Propiedades	Características		
	<i>Aniba rosaeodora</i>	<i>Piper aduncum</i>	<i>Citrus medica</i>
Partículas	Gruesas	Fina	Fina
Color	Moderadamente pardo oscuro	Moderadamente marrón oscuro	Moderadamente verde oscuro
Olor	Sui generic	Sui generic	Sui generic
Higroscopicidad	Muy poco	Poco	Muy poco
Determinación de pH	4.52 ± 1 (25° C)	5.38 ± 1 (25° C)	3.74 ± 1 (25° C)
Densidad relativa	0.9978 g/ mL	0.9023 g/ mL	0.9563 g/ mL
Sólidos totales	1.82 g/ 100 ml	1.89 g/ 100 ml	1.94 g/ 100 ml



TABLA N° 2

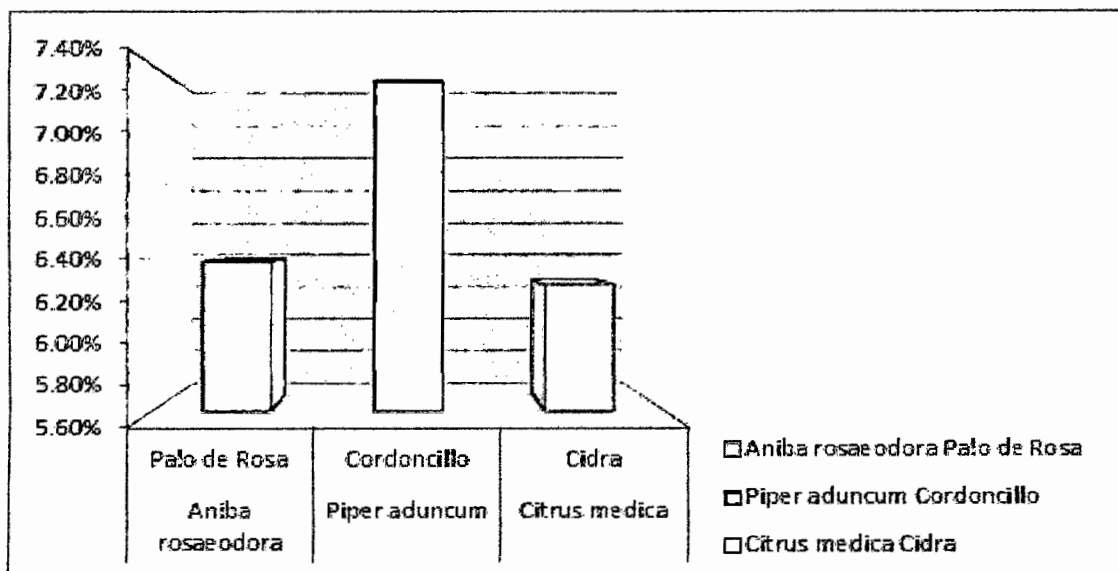
Rendimiento de los Aceites Esenciales

Nombre Científico	Nombre Común	Rendimiento
<i>Aniba rosaeodora</i>	Palo de Rosa	6.38 %
<i>Piper aduncum</i>	Cordoncillo	7.31 %
<i>Citrus medica</i>	Cidra	6.26 %

La Tabla N° 2, porcentaje de rendimiento del aceite esencial destilado de cada una de las 3 plantas estudiadas. Puede observarse que la especie de mayor rendimiento es la *Piper aduncum* (Cordoncillo), mientras que la esencia de *Citrus medica* (Cidra) es la menos abundante.

GRAFICO N° 1

Porcentaje de Rendimiento de los Aceites de las Especies Estudiadas



El gráfico No 1, representa el rendimiento, en porcentaje, de cada uno de los aceites obtenidos por destilación de arrastre de vapor.

4.1.2.- Resultados de los Diámetros de Halos de Inhibición

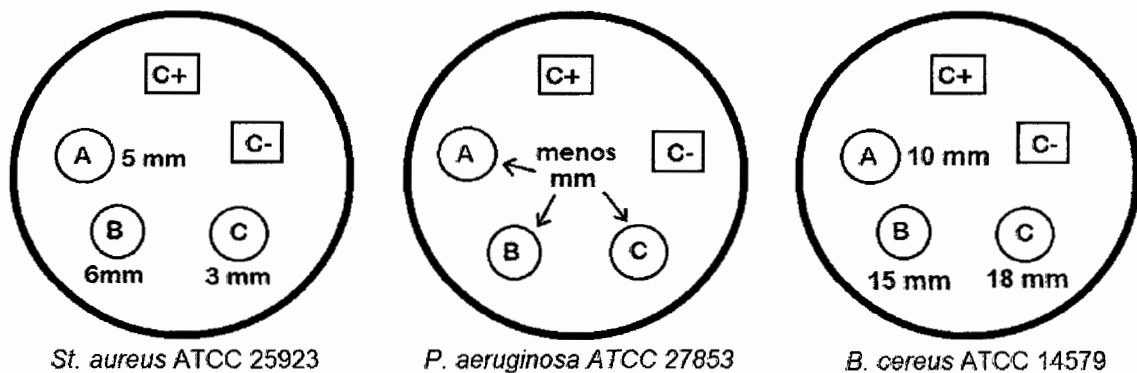
TABLA N° 3

Diámetro del halo de inhibición (en mm) promedio obtenido para cada Aceite esencial de las especies botánicas en estudio

Nombre Científico	Concentración	Diámetro del halo de inhibición (promedio)		
		<i>St. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. cereus</i> ATCC 14579
<i>Aniba rosaeodora</i>	15 µl	5 mm	mm ≤ 0	10 mm
<i>Piper aduncum</i>	15 µl	6 mm	mm ≤ 0	15 mm
<i>Citrus medica</i>	15 µl	3 mm	mm ≤ 0	18 mm
Cloranfenicol	30 µg	20 mm	-	-
Ceftazidima	30 µg	-	14 mm	19 mm
Control Negativo	-	-	-	-

Figura N° 10

Diagrama de los diámetro del halo de inhibición (en mm) obtenida para cada Aceite esencial en estudio.



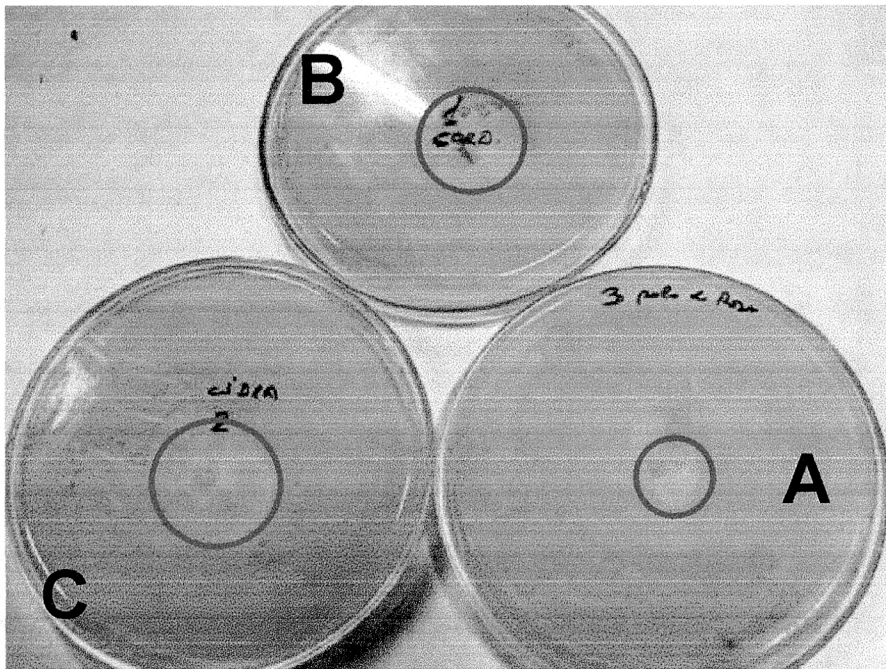
Leyenda:

A: *Aniba rosaeodora*

B: *Piper aduncum*

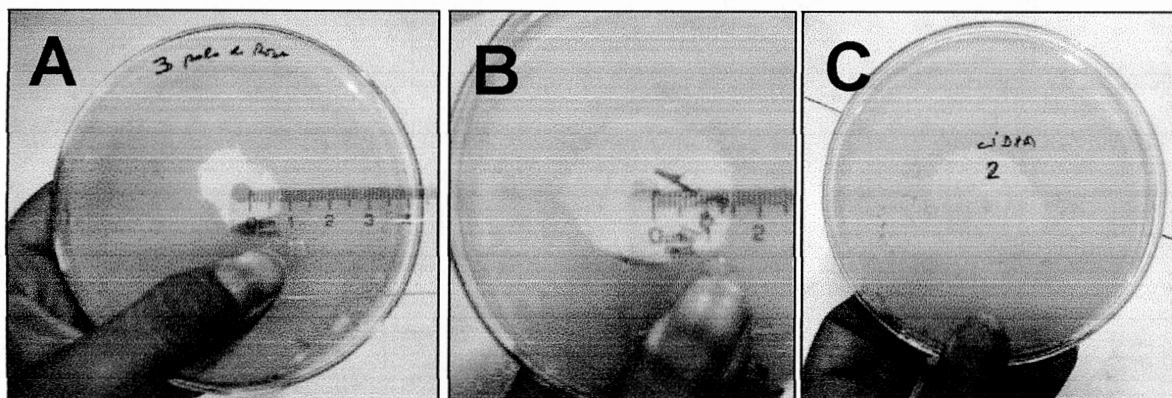
C: *Citrus medica*

La tabla N°3 detalla los resultados del promedio de los halos de inhibición de cada aceite esencial de las especies botánicas estudiadas; en el cual se puede apreciar que ningunos de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* tuvo una lectura de halos de inhibición significativo, frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($\text{mm} \leq 0$); sin embargo frente a *B. cereus* ATCC 14579, los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* tuvieron un promedio de halos de inhibición de 10, 15 y 18 mm, respectivamente



Fotografía N° 1. Acción antimicrobiana del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (A), *Piper aduncum* (B) y *Citrus medica* (C) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

En la fotografía N° 1 y 2 se puede apreciar los diámetros de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579, así como también se puede apreciar la lectura de los diámetros de los halos de inhibición, respectivamente. El aceite esencial de *Citrus medica* fue el que más diámetros de halos de inhibición presente (18 mm)



Fotografía N° 2. Lectura de los diámetros de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora* (A), *Piper aduncum* (B) y *Citrus medica* (C) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

La tabla N° 4, se determina el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Observándose que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 mostraron sensibilidad nula (halos de inhibición menor de 8 mm en promedio) frente a los 15 µl de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*; Sin embargo *Bacillus cereus* ATCC 14579 mostro sensibilidad (+) frente a *Aniba rosaeodora* (halos de inhibición entre 9 y 14 mm en promedio), mostro ser muy sensible (++) frente *Piper aduncum* y *Citrus medica* (halos de inhibición entre 15 y 19 mm en promedio)

TABLA N° 4

Sensibilidad de los Aceites Esencial en estudio

Nombre de la cepa	Sensibilidad de los Aceites Esenciales		
	<i>Aniba rosaeodora</i>	<i>Piper aduncum</i>	<i>Citrus medica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	+	++	++

Leyenda: (+++) sumamente sensible, (++) muy sensible, (+) sensibilidad y (-) nula.

TABLA N° 5

Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR)

Nombre de la cepa	Porcentaje de Inhibición Relativa		
	<i>Aniba rosaeodora</i>	<i>Piper aduncum</i>	<i>Citrus medica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25 %	30 %	15 %
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	52.63 %	78.94 %	94.73 %

La tabla N° 5 se puede apreciar el porcentaje de inhibición relativa (PIR), donde la cepa *B. cereus* ATCC 14579 presenta mayor sensibilidad a todos los aceites esenciales en estudio, del cual el aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) presenta el mayor PIR (94.73%), seguido del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) con 78.94 % y el aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) con 52.63 %. La cepa de *St. aureus* ATCC 25923 presenta poca sensibilidad a los aceites esenciales, cuyo PIR para *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (cordoncillo) y *Citrus medica* (cidra) son 25 %, 30 % y 15 %. Además se puede la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 no presenta sensibilidad alguna frente a los aceites esenciales en estudio (ver Gráfico N° 3)

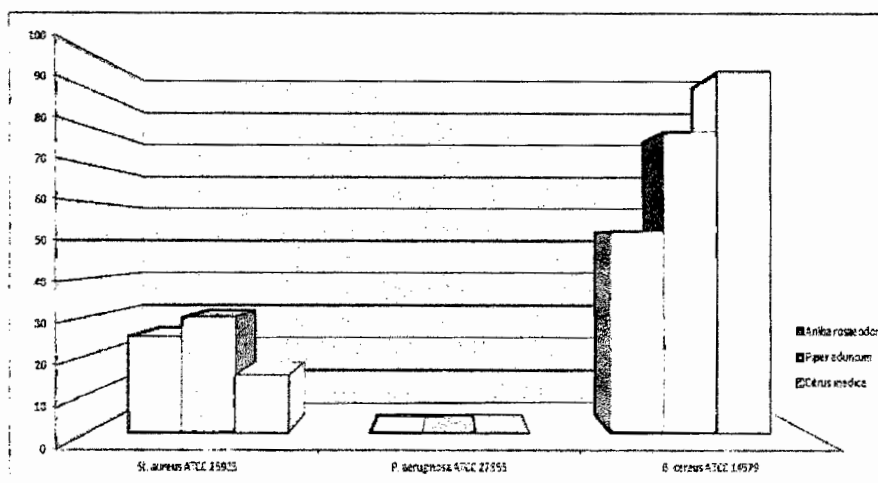


GRAFICO N° 2. Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) de los Aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), *Piper aduncum* (cordoncillo) y *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Bacillus cereus* ATCC 14579

4.1.3.- Determinación de la Concentración de los Aceites Esenciales

Aniba rosaeodora (Palo de rosa)

$$\delta = 0.9978 \text{ g/ mL}$$

$$\text{Si } \delta = m/v \Rightarrow m = \delta \times v$$

Entonces 1 ml de aceite esencial = 0.9978 g

$$\begin{array}{lcl} 1000 \text{ mg} & \rightarrow & 1 \text{ g} \\ X & \rightarrow & 0.9978 \text{ g} \end{array}$$

$$\boxed{X = 997.8 \text{ mg/mL}}$$

Pero si usamos el volumen del tratamiento 1 tenemos:

$$\begin{array}{lcl} \text{Si } 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L} & \rightarrow & 997.8 \text{ mg} \\ 50 \mu\text{L} & \rightarrow & Y \end{array}$$

$$\boxed{Y = 49.89 \text{ mg/mL}} \text{ es decir } T1 = 49.89 \text{ mg/mL}$$

Esta cifra es la concentración final para el tratamiento 1 cuyo volumen utilizado fue de 50 μL , con una concentrada de 49.89 mg/ml de aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa). La concentración de los demás tratamientos (T2, T3, T4 y T5) se realizó efectuando el mismo cálculo.

Piper aduncum (cordoncillo)

$$\delta = 0.9023 \text{ g/mL}$$

$$\text{Si } \delta = m/v \Rightarrow m = \delta \times v$$

Entonces 1 ml de aceite esencial = 0.9023 g

$$\begin{array}{lcl} 1000 \text{ mg} & \rightarrow & 1 \text{ g} \\ X & \rightarrow & 0.9023 \text{ g} \end{array}$$

$$\boxed{X = 902.3 \text{ mg/mL}}$$

Pero si usamos el volumen del tratamiento 1 tenemos:

$$\begin{array}{lcl} \text{Si } 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L} & \rightarrow & 902.3 \text{ mg} \\ 50 \mu\text{L} & \rightarrow & Y \end{array}$$

$$\boxed{Y = 45.11 \text{ mg/mL}} \text{ es decir } T1 = 45.11 \text{ mg/mL}$$

Esta cifra es la concentración final para el tratamiento 1 cuyo volumen utilizado fue de 50 μL , con una concentrada de 45.11 mg/ml de aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo). La concentración de los demás tratamientos (T2, T3, T4 y T5) se realizó efectuando el mismo cálculo

Citrus medica (cidra)

$$\delta = 0.9563 \text{ g/mL}$$

$$\text{Si } \delta = m/v \Rightarrow m = \delta \times v$$

Entonces 1 ml de aceite esencial = 0.9563 g

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ mg} & \rightarrow & 1 \text{ g} \\ X & \rightarrow & 0.9023 \text{ g} \end{array}$$

$$\boxed{X = 956.3 \text{ mg/mL}}$$

Pero si usamos el volumen del tratamiento 1 tenemos:

$$\begin{array}{rcl} \text{Si } 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L} & \rightarrow & 956.3 \text{ mg} \\ 50 \mu\text{L} & \rightarrow & Y \end{array}$$

$$\boxed{Y = 47.81 \text{ mg/mL}} \text{ es decir } T1 = 47.81 \text{ mg/mL}$$

Esta cifra es la concentración final para el tratamiento 1 cuyo volumen utilizado fue de 50 μL , con una concentrada de 45.11 mg/ml de aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo). La concentración de los demás tratamientos (T2, T3, T4 y T5) se realizó efectuando el mismo cálculo

TABLA N° 6. Cálculo de las Concentraciones de Aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*.

N° de Tratamiento	<i>Aniba rosaeodora</i> $\delta = 0.9978 \text{ g/ mL}$		<i>Piper aduncum</i> $\delta = 0.9023 \text{ g/ mL}$		<i>Citrus medica</i> $\delta = 0.9563 \text{ g/ mL}$	
	Volumen (μl)	Concentración (mg/ml)	Volumen (μl)	Concentración (mg/ml)	Volumen (μl)	Concentración (mg/ml)
T1	50 μl	49.89 mg/ml	50 μl	45.11 mg/ml	50 μl	47.81 mg/ml
T2	25 μl	24.94 mg/ml	25 μl	22.55 mg/ml	25 μl	23.91 mg/ml
T3	12.5 μl	12.47 mg/ml	12.5 μl	11.27 mg/ml	12.5 μl	11.95 mg/ml
T4	6.25 μl	6.23 mg/ml	6.25 μl	5.64 mg/ml	6.25 μl	5.97 mg/ml
T5	3.50 μl	3.49 mg/ml	3.50 μl	3.15 mg/ml	3.50 μl	3.35 mg/ml

Se puede apreciar el cálculo de las concentraciones finales de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, cuyo resultados se realizó a través de sus densidades y volúmenes de cada aceite esencial en estudio, se calculó 5 concentraciones utilizando volúmenes de 50 μl , 25 μl , 12.5 μl , 6.25 μl y 3.50 μl para cada tratamiento

Control negativo: Que consiste en un disco de papel filtro impregnado con dimetilsulfóxido (DMSO) estéril para descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

Con el fin de saber entre cuales de estas cantidades pudiese estar la CMI; incubándolo a 37°C por un espacio de 18 horas. Se anotó la turbidez de las soluciones de cada tubo de ensayo.

La concentración del aceite esencial en estudio que presente ausencia de crecimiento, es detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

4.1.4.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

TABLA N° 7. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

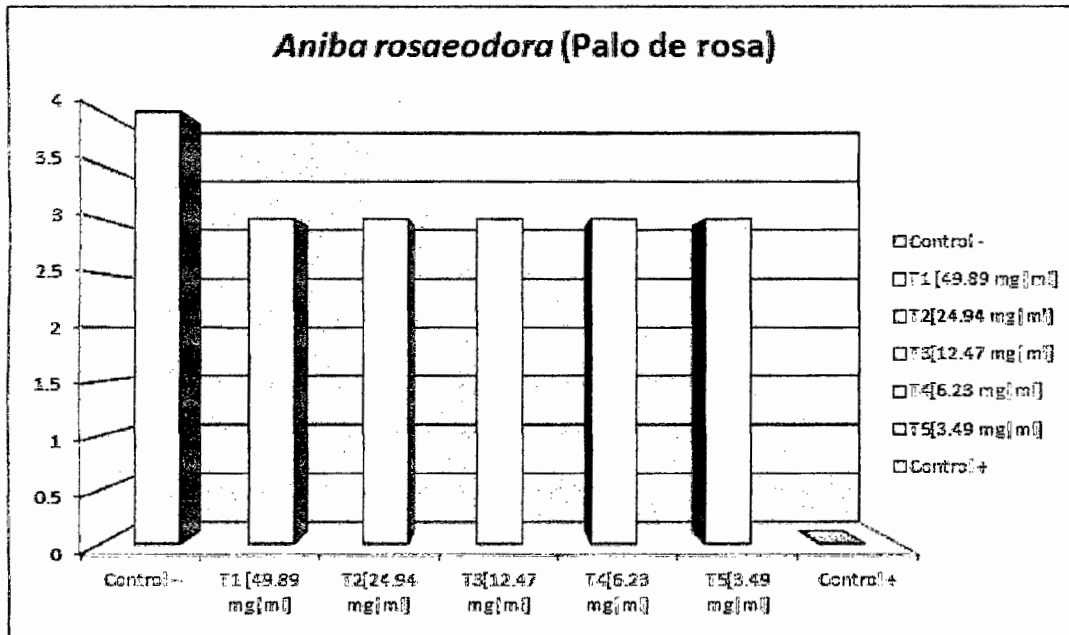
	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Aniba rosaeodora</i>
			Grado de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	4
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	0
T1	50.00 μ l	49.89 mg/ml	3
T2	25.00 μ l	24.94 mg/ml	3
T3	12.50 μ l	12.47 mg/ml	3
T4	6.25 μ l	6.23 mg/ml	3
T5	3.50 μ l	3.49 mg/ml	3

La tabla 7, presenta el Grado de Inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una ligera inhibición del crecimiento bacteriano (inhibición del 25%) en todas las concentraciones probadas el cual; según la leyenda, se le asignó 3. En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano.

Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

GRAFICO N° 3. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

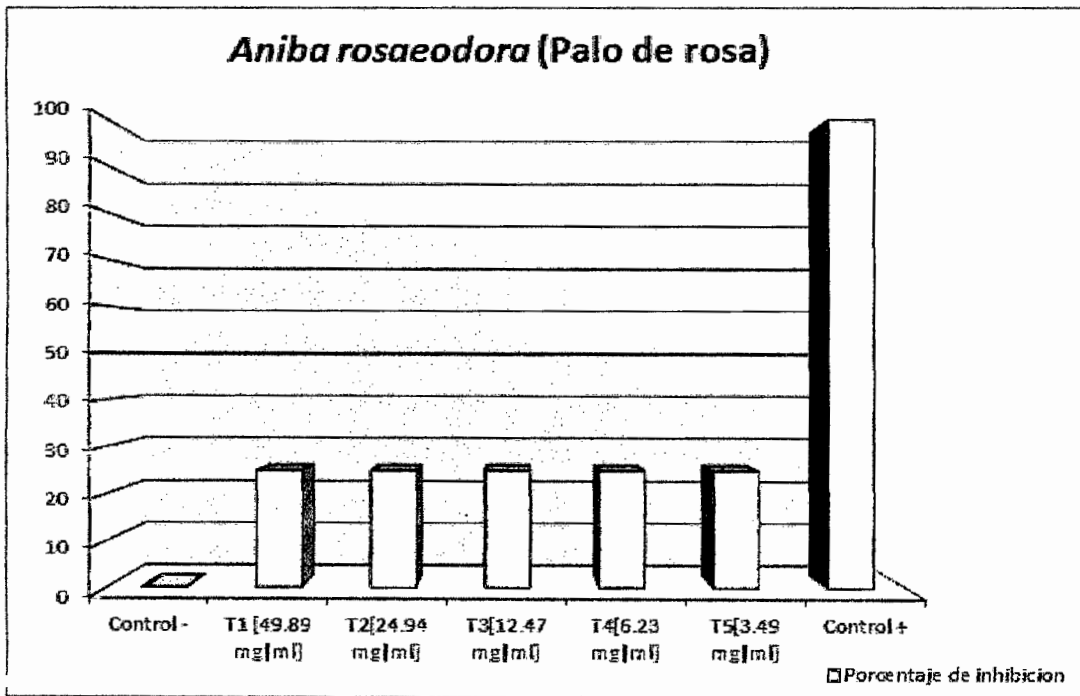
El grafico 3, se muestra el Índice de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Se aprecia que todos los tratamientos se obtuvieron una ligera inhibición del medio (inhibición del 25%), el cual se le asignó 3 (según leyenda)

TABLA N° 8. Porcentaje de Inhibición de los Aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Aniba rosaeodora</i>
			Porcentaje de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	0
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	100
T1	50.00 μ l	49.89 mg/ml	25
T2	25.00 μ l	24.94 mg/ml	25
T3	12.50 μ l	12.47 mg/ml	25
T4	6.25 μ l	6.23 mg/ml	25
T5	3.50 μ l	3.49 mg/ml	25

La tabla 8, presenta el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una ligera inhibición del medio (inhibición del 25%). En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano.

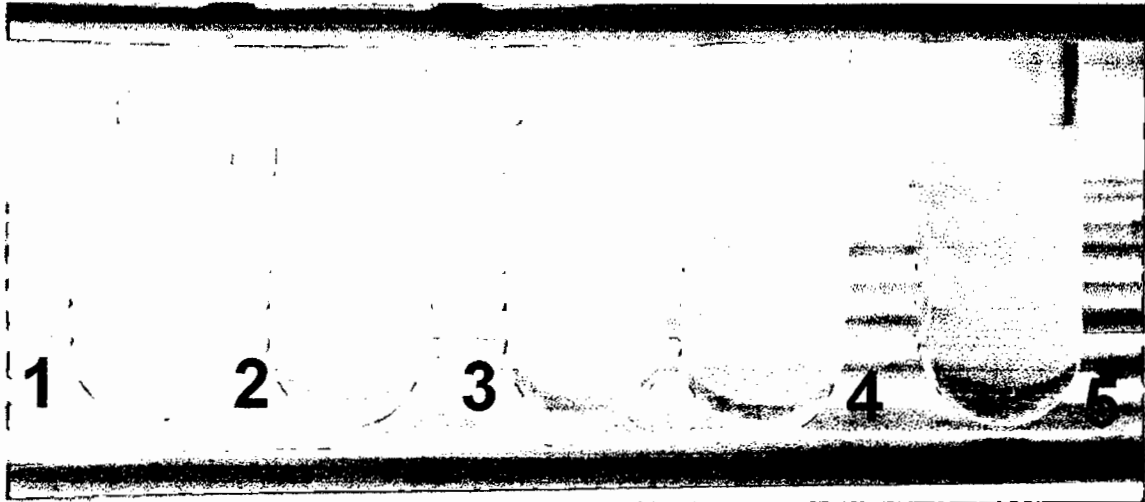
GRAFICO N° 4. Porcentaje de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

El grafico 4, se muestra el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Se aprecia que todos los tratamientos se obtuvieron una ligera inhibición del medio (inhibición del 25%)



Fotografía N° 3. Resultados de la turbidez del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa), a concentraciones de T1 = 49.89 mg/ml, T2 = 24.94 mg/ml, T3 = 12.47 mg/ml, T4 = 6.23 mg/ml y T5 = 3.49 mg/ml frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

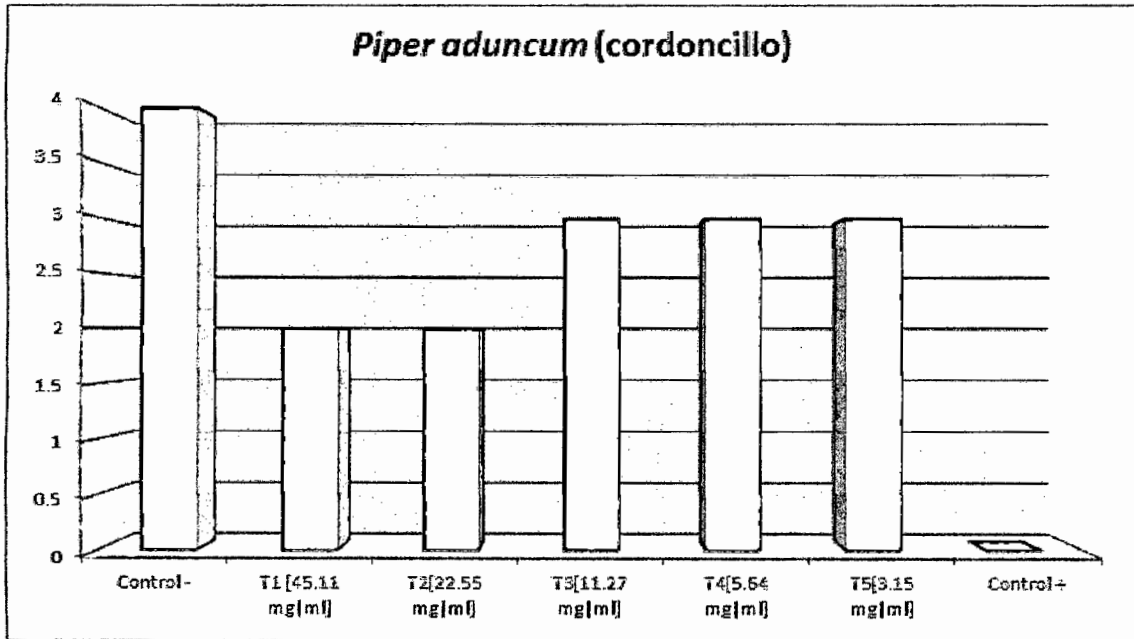
En la fotografía 3, se puede apreciar la ligera inhibición del medio (inhibición del 25%) en todas las concentraciones estudiadas del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* (Palo de rosa) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579.

TABLA N° 9. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Piper aduncum</i>
			Grado de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	4
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	0
T1	50.00 μ l	45.11 mg/ml	2
T2	25.00 μ l	22.55 mg/ml	2
T3	12.50 μ l	11.27 mg/ml	3
T4	6.25 μ l	5.64 mg/ml	3
T5	3.50 μ l	3.15 mg/ml	3

La tabla 9, presenta el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una inhibición aparente del crecimiento (inhibición del 50%) a concentraciones de 45.11 mg/ml (T1) y 22.55 mg/ml (T2), sin embargo a concentraciones de 11.27 mg/ml (T3), 5.64 mg/ml (T4) y 3.15 mg/ml (T5) hubo una ligera inhibición del medio (inhibición del 25%). En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100% de inhibición).

GRAFICO N° 5. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

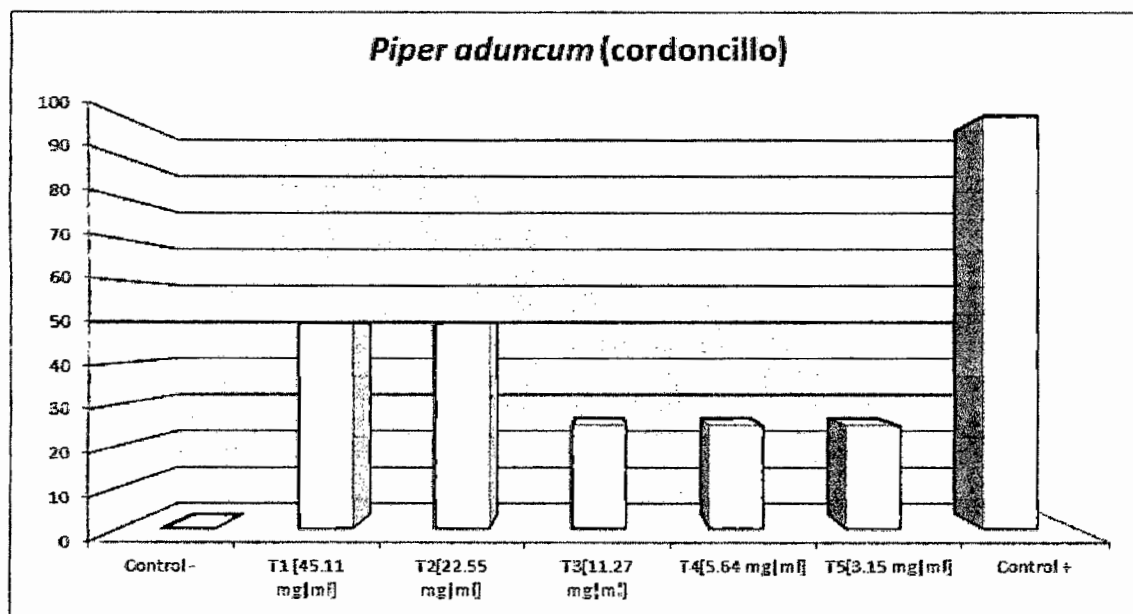
En el grafico 5, se observa que el grado de inhibición del aceite esencial la *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Se puede apreciar una inhibición aparente del crecimiento bacteriano (inhibición al 50 %) a concentraciones de 45.11 mg/ml (T1) y 22.55 mg/ml (T2); sin embargo el crecimiento bacteriano crece aún más, siendo la inhibición en un 25 % a concentraciones de 11.27 mg/ml (T3), 5.64 mg/ml (T4) y 3.15 mg/ml (T5). En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100% de inhibición).

TABLA N° 10. Porcentaje de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Piper aduncum</i>
			Porcentaje de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	0
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	100
T1	50.00 μ l	45.11 mg/ml	50
T2	25.00 μ l	22.55 mg/ml	50
T3	12.50 μ l	11.27 mg/ml	25
T4	6.25 μ l	5.64 mg/ml	25
T5	3.50 μ l	3.15 mg/ml	25

La tabla 10, presenta el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una inhibición aparente del crecimiento bacteriano (inhibición del 50%) en las concentraciones de 45.11 mg/ml (T1) y 22.55 mg/ml (T2). En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100%)

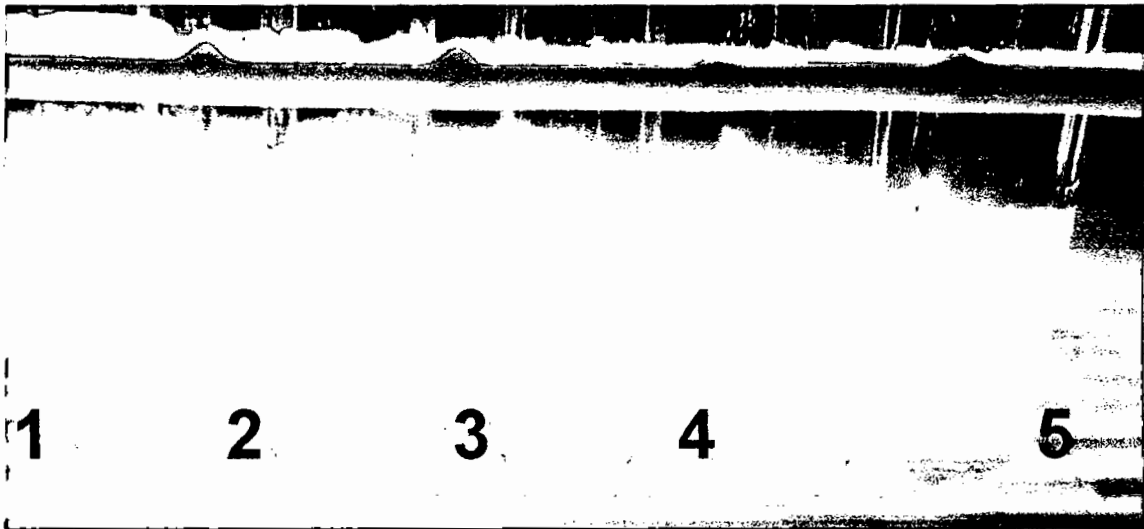
GRAFICO N° 6. Porcentaje de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

En el grafico 6, se observa que el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579; la concentración del T1 = 45.11 mg/ml y T2 = 45.11 mg/ml presentan poca turbidez, es decir que el aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) a esas concentraciones inhibe el 50% crecimiento de la bacteria; además se observa que concentraciones inferiores a 11.27 mg/ml presentan abundante turbidez, lo que indica un mayor crecimiento bacteriano.



Fotografía N° 4. Resultados de la turbidez del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo), a concentraciones de T1 = 45.11 mg/ml, T2 = 22.55 mg/ml, T3 = 11.27 mg/ml, T4 = 5.64 mg/ml y T5 = 3.15 mg/ml frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

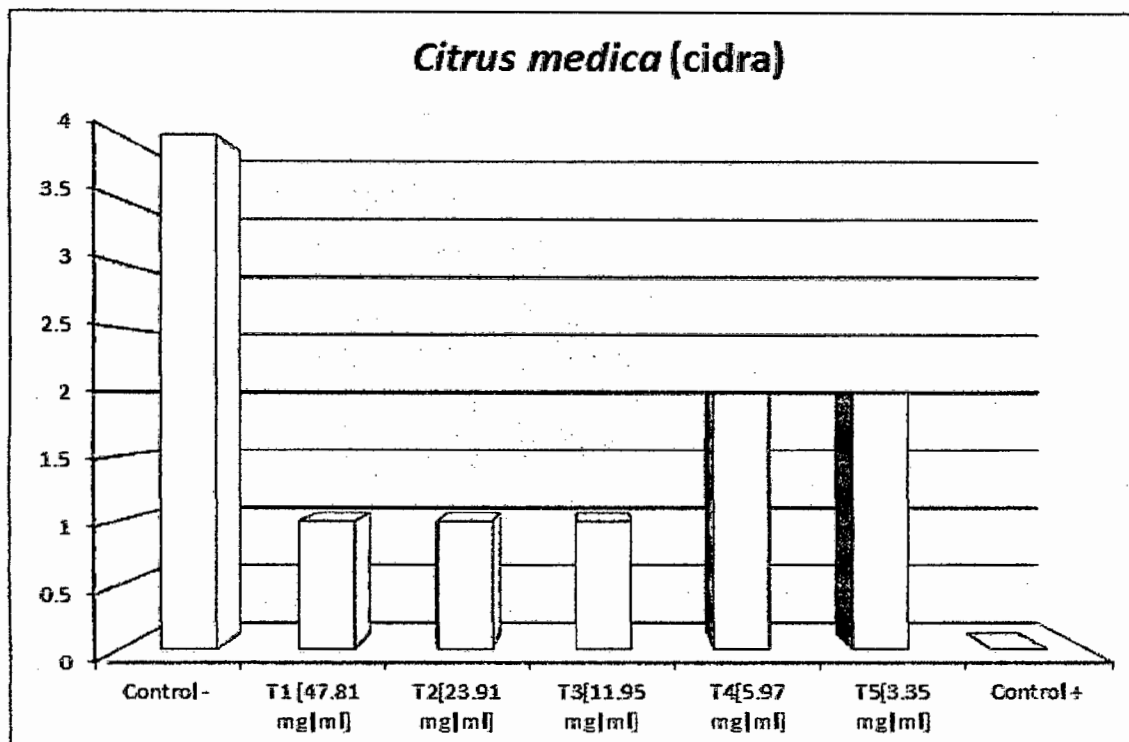
En la fotografía 4, se puede apreciar en T1 = 45.11 mg/ml y T2 = 22.55 mg/ml una turbidez del medio con inhibición del 50%; mientras que en las concentraciones del T3 = 11.27 mg/ml, T4 = 5.64 mg/ml y T5 = 3.15 mg/ml presentan abundante turbidez del medio con inhibición al 25% del aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579.

TABLA N° 11. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Citrus medica</i>
			Grado de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	4
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	0
T1	50.00 μ l	47.81 mg/ml	1
T2	25.00 μ l	23.91 mg/ml	1
T3	12.50 μ l	11.95 mg/ml	1
T4	6.25 μ l	5.97 mg/ml	2
T5	3.50 μ l	3.35 mg/ml	2

La tabla 10, presenta el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una ligera turbidez del medio (inhibición del 75%) desde las concentraciones T1 = 47.81 mg/ml hasta T3 = 11.95 mg/ml. Las concentraciones T4 = 5.97 mg/ml y T5 = 3.35 mg/ml presentan una turbidez con inhibición del 50%. En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100%)

GRAFICO N° 7. Índice de Grado de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

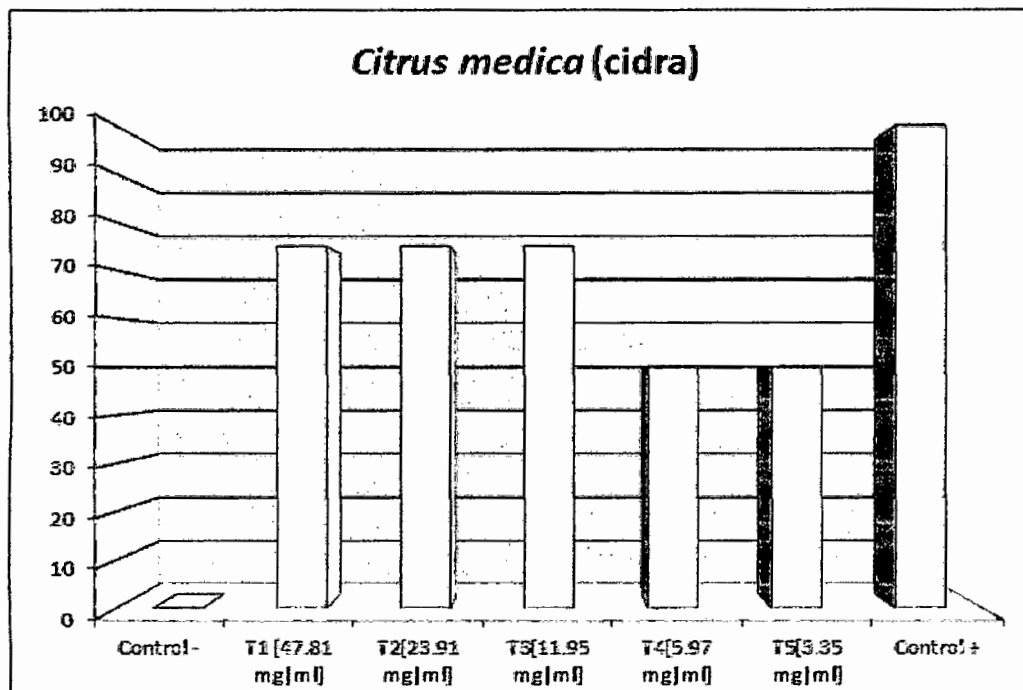
En el grafico 7, se observa que el Grado de Inhibición del aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579; la concentración del T1 = 47.81 mg/ml hasta T3 = 11.95 mg/ml presentan ligera turbidez, es decir que el aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) a esas concentraciones inhibe el crecimiento de la bacteria a un 75%; se observa que concentraciones inferiores a 5.97 mg/ml presentan una turbidez con inhibición del 50%. En el control positivo se puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100%)

TABLA N° 12. Porcentaje de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579

	Volumen (μ L)	Concentración (mg/ml)	<i>Citrus medica</i>
			Porcentaje de Inhibición
Control Negativo	50.00 μ l	0.00mg/ml	0
Control Positivo	50.00 μ l	50.00mg/ml	100
T1	50.00 μ l	47.81 mg/ml	75
T2	25.00 μ l	23.91 mg/ml	75
T3	12.50 μ l	11.95 mg/ml	75
T4	6.25 μ l	5.97 mg/ml	50
T5	3.50 μ l	3.35 mg/ml	50

La tabla 12, presenta el porcentaje de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Los resultados obtenidos indican una ligera turbidez del medio (inhibición del 75%) desde la concentración T1 = 47.81 mg/ml hasta T3 = 11.95 mg/ml; mientras que en las concetraciones T4 = 5.97 mg/ml y T5 = 3.35 mg/ml presenta una inhibición al 50%. En el control positivo de puede apreciar ausencia de crecimiento bacteriano (100%)

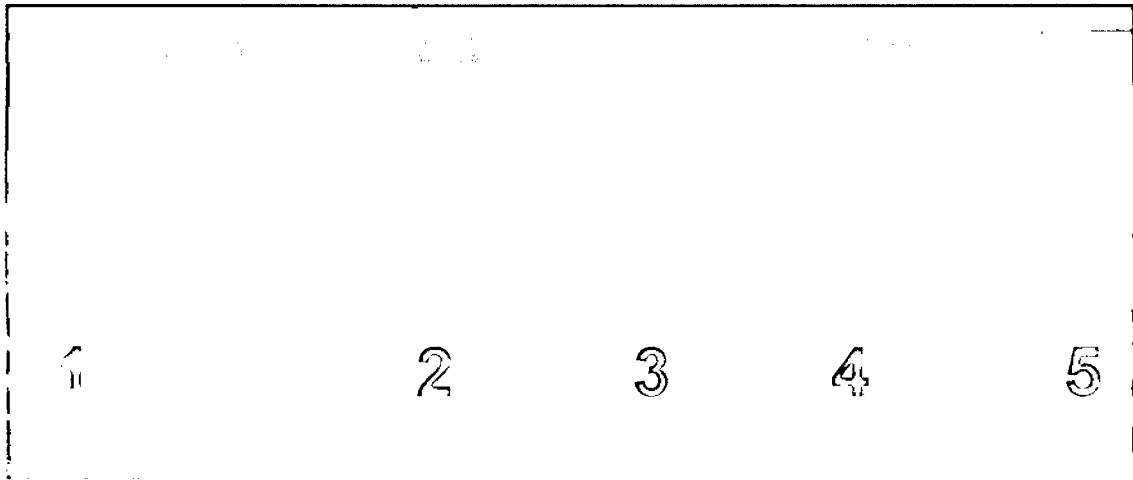
GRAFICO N° 8. Porcentaje de Inhibición de los aceites esenciales de las hojas de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579



Leyenda

- 4 (no inhibición),
- 3 (ligera inhibición, inhibición del 25%),
- 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),
- 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)
- 0 (inhibición del 100%).

En el grafico 8, se observa que el Porcentaje de Inhibición del aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579; la concentración del T1 = 45.11 mg/ml hasta T3 = 11.95 mg/ml presentan ligera turbidez, es decir que el aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) a esas concentraciones inhibe el crecimiento de la bacteria a un 75%; se observa que concentraciones inferiores a 5.97 mg/ml presenta una turbidez con inhibición al 50% (ver Fotografía N° 5).



Fotografía N° 5. Resultados de la turbidez del aceite esencial de *Citrus medica* (cidra), a concentraciones de T1 = 47.81 mg/ml, T2 = 23.91 mg/ml, T3 = 11.95 mg/ml, T4 = 5.97 mg/ml y T5 = 3.35 mg/ml frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

4.2.- DISCUSIÓN

El estudio de las características farmacognósticas de los aceites esenciales de las hojas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* se realizaron mediante protocolos estandarizados del laboratorio de Fitoquímica IMET-EsSalud, descritas en las referencias bibliográficas.

Se utilizaron las hojas frescas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, con superficie amplia y de color verde, en las cuales se concentra la mayor parte del aceite esencial. Se cortaron en trozos pequeños antes de iniciar la extracción del aceite esencial.

El método escogido para la preparación de los aceites esenciales fue mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor ⁶⁹. El rendimiento del aceite esencial de *Piper aduncum* fue el más alto, con 7.31 %, para *Aniba rosaeodora* y *Citrus medica* el rendimiento fue 6.38 % y 6.26 %, respectivamente (ver Tabla N°2).

Las hojas secas de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* presentaron poca higroscopicidad, dando la certeza y confiabilidad a que la droga vegetal en estudio no presentó crecimiento de bacterias, hongos ni la hidrólisis de sus constituyentes. En algunas farmacopeas, las monografías allí publicadas limitan el contenido de agua, especialmente en las drogas que tienen la facilidad de absorberla, o en las drogas en las cuales el exceso de agua causa su deterioro. Con pocas excepciones el contenido de agua en las drogas vegetales debe variar entre 8 y 14%,¹²⁰ para el caso de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* el tiempo requerido para el secado de las hojas fueron de 48±1 horas, debido al contenido de agua de las hojas frescas (entre 68.54% a 75.69 % aproximadamente) el mismo que se encuentra dentro de los valores normales lo que nos permitió almacenarlas sin ningún problema.

El contenido de sólidos totales de la droga vegetales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* fueron 1.82 g/ 100 ml, 1.89 g/ 100 ml y 1.94 g/ 100 ml respectivamente, el cual están dentro de los valores que se consideran aceptables para drogas como esta; un contenido de sólidos totales superior al permitido indica generalmente un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado ⁸⁴.

Dentro de lo concerniente a las propiedades fisicoquímicas de los extractos, el pH mantiene una ligera acidez entre 3.74 ± 1 para *Citrus medica* hasta un pH ligeramente neutro 5.38 ± 1 para *Piper aduncum* a 25 °C; debido a la moderada presencia de hidrogeniones; podemos señalar además una densidad relativa dentro de lo normal en relación al agua destilada. Se observó físicamente que la densidad del aceite esencial es menor en comparación con la densidad del agua, por lo que al extraerse se observó la división entre ambos líquidos.

El aceite esencial con más densidad fue para *Aniba rosaeodora* con 0.9978 g/ mL, para *Piper aduncum* fue 0.9023 g/ mL y para *Citrus medica* fue 0.9563 g/ mL (ver Tabla N°1). En forma general se analizaron las propiedades organolépticas de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, presentando un color pardo moderadamente oscuro a marrón oscuro, debido a la descomposición de la clorofila en feofitina⁹².

Las pruebas de actividad antimicrobiana realizadas por los métodos de difusión en disco (Kirby Bauer) mostraron que los aceites esenciales de *Piper aduncum* y *Citrus medica*, presentan actividad antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579, mientras que el aceite esencial de *Aniba rosaeodora* no reveló acción significativa ante esta bacteria, en ninguna de las tres réplicas. De acuerdo con el promedio del diámetro del halo de inhibición, se estableció que la actividad del aceite esencial de *Citrus medica* y *Piper aduncum* frente a *Bacillus cereus* ATCC 145, fue 94.73 % y 78.94 % respectivamente (ver Tabla N°5).

Por el contrario, al realizar el enfrentamiento de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, se evidenció que éstas no fueron sensibles ante ninguno de los aceites esenciales estudiados. Los aceites de *Aniba rosaeodora* (25 % de inhibición), *Piper aduncum* (30 % de inhibición) y *Citrus medica* (15 % de inhibición) presenta poco porcentaje de inhibición relativa frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cuyos resultados no superan el 50 % de inhibición.

Se puede suponer que los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, no tienen actividad sobre bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), lo que podría atribuirse a la baja concentración de los constituyentes químicos presentes en el vegetal con actividad antimicrobiana o quizá a la acción antagonista que ejercen sobre ellos otro grupo de compuestos, así como también porque las bacterias Gram Negativas presentan compuestos anfipáticos que operan como bombas de expulsión de diversas sustancias, por lo cual, el principio activo y/o fitocomplejo antibacteriano es expulsado de manera inmediata, sin alcanzar a cumplir el efecto ¹⁴⁷. Otras posibles explicaciones corresponden a la posibilidad que el compuesto activo no alcance el sitio blanco de acción o bien, la estructura de las porinas impida el paso del principio activo del aceite esencial al interior de la célula bacteriana ¹²⁰. Es conocido que bacterias Gram Negativas poseen una membrana adicional denominada “Estructura OM” la cual les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos ^{25, 147}. De los tres aceites esenciales sólo el *Citrus medica* presentó actividad frente *Bacillus cereus* ATCC 14579 (véase Tabla N° 5).

En la tabla N°3 muestra los diámetros de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, del cual podemos apreciar que estas 3 especies botánicas carecen de actividad antimicrobiana frente a *St. aureus* ATCC 25923 y *Ps. aeruginosa* ATCC 27853; sin embargo frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579 mostró halos de inhibición mayor de 10 mm para los 3 aceites esenciales en estudios, del cual *Citrus medica* presentó el mayor halo de inhibición promedio con 18 mm. El Cloranfenicol presentó halos de inhibición contra *St. aureus* ATCC 25923 dentro del rango establecido (19 a 26 mm); cabe mencionar que la *Pseudomonas aeruginosa* es resistente al Cloramfenicol, por esta razón se utilizó Ceftazidima como control positivo. Los resultados de inhibición contra *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 fueron negativos, los halos de median menos de 1 mm.

Cabe mencionar que las pruebas de difusión de disco por el método de Kirby-Bauer para organismos como *Bacillus cereus* ATCC 14579 no se han desarrollado estándares reproducibles para la interpretación de resultados.

La tabla N° 4 permite observar claramente la sensibilidad de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* frente a las cepas bacterianas utilizadas en el experimento. La actividad antimicrobiana del aceite de *Aniba rosaeodora* presenta sensibilidad nula frente a *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *St. aureus* ATCC 25923 y *B. cereus* ATCC 14579. El aceite esencial de *Piper aduncum*, también presenta sensibilidad nula frente a *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *St. aureus* ATCC 25923 y *B. cereus* ATCC 14579. *B. cereus* ATCC 14579 presentó sensibilidad (+) frente al aceite de *Aniba rosaeodora*; el *B. cereus* ATCC 14579 fue muy sensible (++) frente a los aceites de *Piper aduncum* y *Citrus medica*.

Para realizar el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se aplicó la siguiente expresión: % Efecto Inhibitorio = (Media diámetro halo de inhibición/ Diámetro halo de inhibición control positivo) X 100. El porcentaje de inhibición relativa del aceite esencial de *Aniba rosaeodora* fue 25 % (frente a *St. aureus* ATCC 25923) y 52.63 % (frente a *B. cereus* ATCC 14579). La actividad del aceite de *Piper aduncum* fue 30 % (frente a *St. aureus* ATCC 25923) y 78.94 % (frente a *B. cereus* ATCC 14579) y la actividad del aceite de *Citrus medica* fue 15 % (frente a *St. aureus* ATCC 25923) y 94.73 % (frente a *B. cereus* ATCC 14579). Una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es >70%, intermedia entre el 50-70% y baja cuando es <50%^{104, 103}. En consecuencia, el aceite esencial de extracto de *Citrus medica* presentó una alta actividad, mientras que *Piper aduncum* y *Aniba rosaeodora* mostraron actividad intermedia frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579

Al determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con la técnica de la dilución en caldo BIH, se observó que los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* no mostraron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579; La CMI en tubo caldo, se considera como el parámetro fundamental para comprobar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibacteriano^{106, 105}. Por tal razón, es la técnica más confiable para determinar las propiedades antimicrobianas de una sustancia.

Cabe señalar que de acuerdo con Remmal, *et al.*, (1993a) ¹²⁰ es sumamente difícil estandarizar un procedimiento para el estudio de las plantas como antimicrobianos, ya que existen diversos factores que están involucrados y que pueden influir de manera importante en los resultados obtenidos; se puede mencionar, la composición del medio de cultivo, método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, y el microorganismo en cuestión.

En el presente estudio no se halló halos de inhibición mayor a 20 mm.; rango correspondiente, según Duraffourd, al valor sumamente sensible (+++), sin embargo el *Citrus medica* (cidra) resultó tener 18 mm en promedio, se le consideró un valor muy sensible (++); estos resultados se tomó en cuenta para el análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica*, lo cual presentaron muy poca actividad frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579. De acuerdo con lo descrito por el National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS) ^{105, 106}, una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12,5 mg/ml, de mediana sensibilidad, entre 12,5 y 50mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 a 100mg/mL. Según esta escala, *Bacillus cereus* ATCC 14579 exhibió baja sensibilidad frente a los aceites esenciales de *Piper aduncum*, *Aniba rosaeodora* y *Citrus medica*, mientras que *Aniba rosaeodora*, no mostró actividad alguna.

En la presente investigación se observa, en todos los casos, que los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* no presentaron CMI significativa frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579, pese a que la efectividad del Porcentaje de Inhibición Relativa de los aceites esenciales fueron evidente en el laboratorio. Esto podría deberse a una resistencia intrínseca del microorganismo dentro del procedimiento del ensayo, aún y cuando los resultados concordaron en todas la repeticiones hechas para este experimento.

4.3.- CONCLUSIONES

- El rendimiento de los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora*, *Piper aduncum* y *Citrus medica* fueron 6.38 %, 7.31 %, 6.26 %, respectivamente.
- La mayor inhibición obtenida con el método de Kirby-Bauer se obtuvo con el aceite esencial de *Citrus medica* (cidra) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579 con un halo de inhibición de 18 mm a una concentración de 15 µL por disco de papel filtro del extracto del aceite esencial.
- El porcentaje de Inhibición Relativa fue mayor (94.73 %) para *Citrus medica* (cidra) frente a *Bacillus cereus* ATCC 14579, sin embargo en la CMI no fue significativo.
- La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración máxima bactericida (CBM) no se calcularon ya que la sensibilidad de las cepas a los aceites esenciales fue reducida.

4.4.- RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el método de Kirby-Bauer mediante Microdilución en microplacas para evitar errores humanos durante todo el procedimiento experimental.
- Se recomienda diseñar ensayos de actividad antibacteriano con diferentes antibacterianos comerciales conocidos con el objetivo de profundizar su estudio de acuerdo a estos resultados.
- Es necesario realizar más trabajos experimentales, pues el enfoque a solo tres microorganismos (2 cepas Gram positivas= *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y 1 cepa Gram negativa= *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853) nos deja sin la visión global o en conjunto del potencial de estos tres aceites esenciales, por lo que se recomienda la experimentación con más cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas

4.5.- BIBLIOGRAFÍA

4.5.1.- Referencias Bibliográficas

- 1.- A. V., Turina, M. V., Nolan, J. A. Zygadlo, y M. A., Perillo, (2006). Natural terpenes: selfassembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122:101–113.
- 2.- Aguilera L, Tacoronte JE, Leyva M, Navarro A, Bello A, Marquetti MC. (2001). Actividad biológica del aceite esencial de *Eugenia melanadenia* sobre *Blattella germanica*. *Memorias del Congreso Latinoamericano de Etnomedicina*.
- 3.- Albiero A, Souza L, Mourao K, Almeida O, Lopes W. (2005). Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). *Acta Farm Bonaerense* 24: 550 - 554.
- 4.- Alzamora, L., L. Morales, L. Armas & G. Fernández. (2001). Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *An. Fac. Med.* 62: 156-161.
- 5.- Araújo, V.C.; Correa, R.G.C.; Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Gottlieb, O.R.; Marx, M.C.; Magalhães. (1971). Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta amazonica*, V.1. n. 3: 45–47
- 6.- Arroyo. J, Hañari. R. (2012). Efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *An Fac med.*; 73(4):275-80
- 7.- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., é Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–475.

- 8.- Balch, Phyllis A. (2000). Prescription for Nutritional Healing, 3rd ed. New York: Avery. p. 97
- 9.- Bandoni, Arnoldo, MIZRAHI Isaac (1993), "Taller Normalización de Esencias", Programa Agroquímico CORDECO-UMSS; Cochabamba.
- 10.- Barret B. (1994) Medicinal Plants of Nicaragua's Atlrantic COSAT. Econ. Bot.; 48(1): 8-20.
- 11.- Barrow L. (2004). Capacidad Antibiótica de Aceites Esenciales empleados en Aromaterapia. Microbiología general, 3ª edición, México D.F. Págs. 753-754
- 12.- Bartram J. (2003): Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease. Londres (Reino Unido), IWA Publishing. Págs. 4:854 –871
- 13.- Begun, J. (2005). Sthapylococcus aureus virulence factors identified by using a hightroughput Caenorhabditis elegans-killing model. Infect Immun. 73:872-877.
- 14.- Bergeys D, (2000). Manual of the Determinative Bacteriology. Night Edition. Philadelphia 2: 540-589.
- 15.- Bergonzelli, G.E., Donnicola, D., Porta, N., y Corthésy-Theulaz, I.E. (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of Helicobacter infection. Antimicrob Agents Chemother. 47:3240-3246.
- 16.- Bernard CB, Krishnamurty HG, Chauret D, Durst T, Philogène BJ, Sánchez-Vindas I, et al. (1995). Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. J Chem Ecol; 21:801-8

- 17.- Betancourt B. J. (1999). Cuestiones éticas en la experimentación animal. DOC. Págs. 37-41
- 18.- Betts, T. J. (2001). Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A* 936:33–46.
- 19.- Bezerra, D., D. Mourab, R. Rosa, M. de Vasconcellos, A. Romano, M. de Moraes, E. Silveira, M. Sousa, J. Pegas, L. Costa-Lotufo & J. Saffib. (2008). Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutat. Res.* 652: 164-174.
- 20.- Bottia E, Díaz O, Mendivelso D, Martínez J, Stashenko E. (2007) Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia et Technica*; 13:913-18.
- 21.- Bowles, E. J. (2003). *Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. Allen & Unwin, ISBN 174114051X.
- 22.- Brack A, Heinz P. (2002). *Perfume Maravilloso*. Edit. Epenza. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima – Perú.
- 23.- Brack, E. A. (2000). *Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú*. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú
- 24.- Brako L, Zarucchi J. (1993) *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Perú*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 45
- 25.- Brehm-stecher, B. F. y E. A. Johnson. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the

- sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3357-3360.
- 26.- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales.* 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. 1100 Págs., ISBN: 84-200-0956-3
- 27.- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., y Dehesa, M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85:415–421.
- 28.- Burke B., Nair M., (1986) Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of jamaican Piper species. *Phytochemistry* 25(6): 1427-1430.
- 29.- Caillion, J., Le Malbecque, V., Miègeville, A.-F., Donnio, P.-Y., Bugnon, D., y Potel, G. (2003). In vitro activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J. Antimicrob Chemother.* 51:857-864.
- 30.- Caillion, N, D., Batard, E., Miegerville, A. F., Le Mabecque, V., Kergueris, M. F., Bugnon, D., Potel, G., y Caillon, J. (2005). In vitro and in vivo synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:45-51.
- 31.- Casio J., Mattana A., Usai M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12:516–522.

- 32.- Carson, C.F., Hammer, K.A. y Riley, T.V. (1995). Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82, 181–185.
- 33.- Celis A, Mendoza C, Pachón M, Cardona J. (2008) Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agro Colomb.*; 26(1): 97-106.
- 34.- Centro de Comercio Internacional UNCTAD/GATT. (1986). Aceites Esenciales y Oleorresinas: Estudio de Distintos Productores y de Mercados Importantes. Ginebra, Suiza. 222 p
- 35.- Chaar, J.S. (2000). Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans. Tese de doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Carlos
- 36.- Chacón, T., Gonzales Mora, E y Cueva Gálvez, G. (2006) Características del Aceite Esencial de la Madera de «Palo Rosa» (*Aniba Rosaeodora* Ducke), Obtenido Mediante Destilación. *IIAP - Folia Amazónica* 15 (1-2)
- 37.- Cleaves, C. (2001). Etnobotánica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá, Cobán, Alta Verapaz. Guatemala. 282p. Tesis Licenciada en Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Biología.
- 38.- Coee FG, Anderson GJ. (1996) Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Econ. Bot.*; 50(1): 71-107.
- 39.- Coee FG, Anderson GJ. (1996) Screening of Medicinal Plants Used by the Garifuna of Eastern Nicaragua for Bioactive Compounds. *J. Ethnopharmacol.*; 53: 29-50.

- 40.- Comité Ética de Experimentación Animal (2005). Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. Universidad de Barcelona. Págs. 101-107
- 41.- Consejo de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. (2000). “Declaración de la Agrupación Farmacéutica Europea (PGEU). Control de los antibióticos”. *Farmacéuticos* (237)
- 42.- Cooper, B.S., Medley, G. F., Stone, S. P., Kibbler, C. C., Cookson, B. D., Roberts, J. A., Duckworth, G., Lai, R., y Ebrahim, S. (2004). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:10223-10228.
- 43.- Cornejo A; V. (1986). Estudio morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. Tesis. Universidad San Cristóbal de Huamanga. Perú.
- 44.- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., y Palmas, F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29:130– 135.
- 45.- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., y Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88:170–175.
- 46.- Critchley, I. A., Blosser-Middleton R. S., Jones, M. E., Thornsberry, C., Sahm, D. F., y Karlowsky, J. A. (2003). Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrob Agents chemother.* 47:1689-1693.

- 47.- Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. (2000). Natural products secondary metabolites. In: Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- 48.- Cruz S, Mascia, V (2004) Caracterización Química de los Aceites Esenciales y Extractos de Especies Mesoamericanas del Género Piper como Nuevos Recursos Aromáticos. *Rev. Científica* 4(1): 25-29.
- 49.- Cruz S, Mascia, V (2005) Caracterización de Aceites Esenciales y Evaluación de la Actividad Biocida de Cinco Especies Nativas de Piperaceae. *Tikalia* 23. 2005; 2: 51-67.
- 50.- D'Angelo L, Zavier H, Torres L, Lapa A, Souccar C. (1997). Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, anti-inflammatory and hemostatic. *Phytomedicine* 4: 33 - 40.
- 51.- Dartois, V., Sanchez-Quezada, J., Cabezas, E., Chi, E., Dubbelde, C., Dunn, C., Granja, J., Gritzen, C., Weinberger, D., Reza-Ghadiri, M., y Parr, T. R. Jr. (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3302-3310.
- 52.- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., y Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54:2745–2749.
- 53.- Dorman, H. J. D., y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:08– 316.

- 54.- Dryla, A., Prustomersky, S., Gelbmann, D., Hanner, M., Bettinger, E., Kocsis, B., Kustos, T., Henics, T., Meinke, A., y Nagy, E. (2005). Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. Clin Diagn Lab Immunol. 12:387-398.
- 55.- Duraffourd, C y J., Lapraz, (1983). Cuaderno de fitoterapia clínica. Editorial Masson. Francia.
- 56.- Evans Schultes, Richard, Raffauf, Robert F., (1992). The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia, Vol.2. Ed. Dioscorides Press. Portland Oregon.
- 57.- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., y Pedro, L. G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. Lett Appl Microbiol. 36:35-40.
- 58.- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., y El-Baroty, G.S.A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection 52:665– 667.
- 59.- Fernaroli, Giovanni. (1963) Sostanze Aromatiche Natural. Ed. Ulrico Hoepli, Milan
- 60.- Ferraro, M.J. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Performance Standards for Antimicrobial Disks Susceptibility Tests. Approved Standard-Seventh Edition. Vol 20, N° 1 M2-A7 NCCLS.
- 61.- Flores N, Jimenez I, Gimenez A, Ruiz G, Gutierrez D, Bourdy G, Bazzocchi I. (2009). Antiparitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. Phytochemistry 70: 621 - 627.

- 62.- Gómez López, Ana L. (2008) Caracterización de Extractos y Aceites Esenciales y Evaluación de la Actividad Biológica de Hoja de Tres Especies de Piperaceas (*P. Jacquemontianum*, *P. Oradendron* Y *P. Umbellatum*). Tesis para optar título de Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- 63.- Gonzales, E. (2000). Industrias con Productos Diferentes a la Madera. Copias del curso. Fac. Cc. Forestales, Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú. 20 p.
- 64.- Govan, J. R. W. (1988). Alginate biosynthesis and other unusual characteristics associated with the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, p. 67-96. In E. Griffiths, W. E. Donachie, and J. Stephen (ed.), *Bacterial infections of respiratory and gastrointestinal mucosae*. IRL Press, Oxford.
- 65.- Govan, J. R. W., y G. S. Harris. (1986). *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiol. Sci.* 3:302-308.
- 66.- Guenther, E. (1950). *The Essential Oils*. D. Von Nostrand Company, Inc. Princeton. New Jersey. New York, USA. 752 p.
- 67.- Guerra Ordóñez, Marta; Rodríguez Jorge, C. Mayra; García Simón, Gastón y Llerena Rangel, Celia. (2004)“Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf”, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, *Rev Cubana Plant Med.* Págs. 9
- 68.- Guerrini, A., G. Sacchetti, D. Rossi, G. Paganetto, M. Muzzoli, E. Andreotti, M. Tognolini, M. Maldonado & R. Bruni. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27: 39-48.

- 69.- Günther, E. (1948). *The Essential Oils*. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA
- 70.- Gupta M .P., T.D. Arias, N.H. Williams, R. Bos & D.H.E. Tattje. (1985). Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panamá. *J. Natl. Prod.* 48:330.
- 71.- Gupta M. (1995). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, (CYTED) - Convenio Andrés Bello (SECAB). Santafé de Bogotá, DC, Colombia.
- 72.- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27:1-93.
- 73.- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., y Wyllie, S. G., Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:194–198.
- 74.- Haddadin, A. S. Fappiano, S. A., y Lipsett, P. A. (2002). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad Med J.* 78:385-392.
- 75.- Hammer, K. A., Carson, C.F. y T.V. Riley. (1999). Antimicrobial activity of essential oils an other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 86:985–990.
- 76.- Harrison, Jack. (1984) "Curso de Farmacognosia", Universidad San Marcos Lima.
- 77.- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., y Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590–3595.

- 78.- Hajar Guerra, Gisely. Bioseguridad en el Laboratorio. (2008). BIOSEGURIDAD. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud-INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud. Pág. 98
- 79.- Iglewski, B. H., L. Rust, y R. A. Beever. (1990). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, p. 36-43. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 80.- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626–631.
- 81.- K., Knobloch, A., Pauli, B., Iberl, H., Weigand, y N., Weis, (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1:119–128.
- 82.- Koneman.E.W (2001). Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Págs. 372-406
- 83.- Kubitzki, K.; Renner, S. (1982). Lauraceae I (Aniba and Aiouea). *Flora Neotropica*, Monograph number 31. The New York Botanical Gardem. New York.
- 84.- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, España
- 85.- Kumar A. (1997). “Microbial resitance to drugs – a universal problem in urgent need of a comprehensive approach”. *Natl Med J India* 10 (5): 221-4

- 86.- Lago J, Chen A, Young M, Guimarães E, Oliveira A, Kato M. (2009). Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochem Lett* 2: 96 - 98.
- 87.- Lahlou M. (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res.*; 18(6): 435-48
- 88.- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453-462.
- 89.- Lehoux, Daryn. (2003) Tropes, Facts, and Empiricism. *Perspectives on Science*. Vol. 11. pp. 326-345.
- 90.- Liu, P. V. (1974). Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 130(Suppl):S94-S99.
- 91.- Liu, P. V. (1979). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In R. G. Doggett (ed.), *Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, Inc., New York. P. 63-88.
- 92.- Lock de Ugaz, Olga (1995). *Investigación Fitoquímica*", Ed. PUCP; Lima
- 93.- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 111:1265-1273.
- 94.- MacBride JF. (1937) *Flora del Perú*. Ed. Publ. Field Museum Natural History Bot. Tomo II.
- 95.- Macedo, M.; Vola, M. (2005). Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. Págs. 1-3. 81

- 96.- Mann, C.M. y Markham, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J App Microbiol* 84:538-544.
- 97.- Manual de Fitoterapia, EsSalud/OPS. Perú (2001)
- 98.- Marquis, R.J. (1991) Herbivore fauna of Piper (Piperaceae) in a Costa Rican wet forest: Diversity, specificity, and impact. En: Price PW, Lewinsohn TM, Fernández GW & Benson WW (eds.). *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions*. J. Wiley and Sons. Estados Unidos 1991. pp. 177-199.
- 99.- Maureen L., Tacoronte J., Scull R., Tiomno O., Domingo A., (2009) Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed*; 20:5-13
- 100.- Ministerio de Salud. (2010). Estrategias y metodologías de intervención para mejorar el uso de los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. Págs. 275
- 101.- Mitja, D.; Lescuere, J.P. (2000). Madeira para perfume: qual será o destino do Pau – rosa? In: (Vários autores). *A floresta em jogo. O extrativismo na Amazônia Central*. Ed. Científica. Laure Emperaire. São Paulo: Editora UNESP. 234 pp
- 102.- Morais, S., V. Facundo, L. Medeiros, E. Barreira, J. Anjos, S. Ferreira, E. Sousa & M. Souza. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochem. Systemat. Ecol.* 35: 670-675.
- 103.- Morihara, K., y J. Y. Homma. (1985). Pseudomonas proteases, p. 41-79. In I. A. Holder (ed.), *Bacterial enzymes and virulence*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

- 104.- Morton D. B. (1997) La importancia ética del sufrimiento de los animales para los profesionales responsables de su atención. *Animales de experimentación*, Págs. 3, 2, 9-11.
- 105.- NCCLS (1996). Evaluating Production Lots of dehydrated Mueller-Hinton Agar, approved standard. NCCLS document M6-A. NCCLS: Wayne, Pennsylvania.
- 106.- NCCLS (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—Fifth edition. NCCLS document M7-A5. [ISBN 1-56238-394- 9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898. USA.
- 107.- Nester, E. W., Anderson, D. G., Evans-Roberts, C. Jr., y Nester, M. T. (2007). *Microbiología humana. El manual moderno*. México, D. F. 996 pp.
- 108.- Organización Panamericana de Salud (1998). Situación de la Medicina Tradicional en America. *Bol. Org. Panam. Salud*.
- 109.- Oriala, J: Wright, Ad: Behrends, H: Folkers,G: Sticher, O: Ruegger, H: Rali, T (1993). Aduncamide, a Cytotoxy and antibacterial beta-Phenylethylamine derived amide from Piper aduncum. *Nat Product Lett* 23, 231-236.
- 110.- Oussalah, M., Caillet, S., y Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69:1046–1055.
- 111.- Pabón, M. 1982. Agrosilvicultura para la Amazonía. *Revista Colombia Amazónica* Vol. N°1 Dic. 1982. Bogotá, Colombia. 32 – 54 p.
- 112.- Palacios VJ. (1993). *Plantas medicinales nativas del Perú*. Lima, Concytec, 22-5.

- 113.- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja PA. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*; 46:597-673.
- 114.- Patrón, A. (1959). Obtención del Aceite Esencial de Palo rosa. Tesis para optar el título de Químico. Facultad de Química – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 32 p.
- 115.- Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. 2nd Ed. Cabi Publishing, U. K. Pág. 184
- 116.- Pereira Santos, Ronaldo. (2004) Avaliação da diversidade genética de populações naturais de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) por meio de marcadores moleculares RAPD. INPA/UFAM
- 117.- Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A. (2004) Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *J Essent Oil Res*; 16:124-126.
- 118.- Pohlit A, Calderwood, S. (2004) Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Ae. aegypti* larvae. *Acta Amazon.*; 34(1):97-105.
- 119.- Ray, B. (1996). *Fundamental food microbiology*. CRC. Press. Boca Ratón. E. U. pp7-15.
- 120.- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M. y Tantaoui- Elaraki, A. (1993a). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in the agar medium. *J Ess Oil Res* 5:179–184.
- 121.- Rengifo Salgado, Elsa. (2007). *Las Ramas Floridas del Bosque: Experiencias en el manejo de plantas medicinales Amazónicas*. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Págs. 88

- 122.- Rojas Hernández, C. Nidia M., Matos Aguilera, Mariela y Romeu Álvarez Beatriz (2004). Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav.”, Universidad de La Habana, Rev Cubana Plant Med. Págs. 9
- 123.- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., y Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem.* 91:621–632.
- 124.- Sacsquispe Contreras, Rosa Elena; Velásquez Pomar, Jorge. (2002). Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud.
- 125.- Sáez, J., Ettayebi, M. (1998) Piperlonguminina y estigmasterol, compuesto de raíces y tallos de *Piper auritum*, Actividad insecticida de extractos. *Revistas Colombiana de Química* 27 (1): 77.
- 126.- Santos, P.R, Hoekstra, F. (2001) Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochem.* 58: 547-551.
- 127.- Sartoratto A., Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Duarte M.C.T., Rehder V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35: 273-280.
- 128.- Schmolz, E., Doebner, R., Auste, R., Daum, R., Welge, G., y Lamprecht, I. (1999). Bioenergetic investigations on tea-tree and related essential oils. *Thermochim. Acta* 337:71–81.
- 129.- Sharapin, Nikolai (2000), Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.101-113, 247 p.

- 130.- Sifri, C. D., Barech-Bernal, A., Calderwood, S. B., y von Eiff, C. (2006). Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immun.* 74: 1091-1096.
- 131.- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., y Poolman, B., (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269:8022– 8028.
- 132.- Silva J, Nakagawa J. (1995) Estudio de las fórmulas para el cálculo de la velocidad de la germinación. *Abrates Newslet.*; 5(1):62-73.
- 133.- Skandamis, P. N., y Nychas, G. J. E., (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91:1011–1022.
- 134.- Smith RM, Kassim H. (1979) The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. *New Zealand J Sci*; 22:127-128.
- 135.- Smith, M. D. y Navilliat, P. L. (1997). A new protocol for antimicrobial testing of oils. *J Microbial Methods.* 28:21–24.
- 136.- Steers E, foltz EL, Graves BS. (1959) An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemother.*;9:307-311.
- 137.- Stevens, WD., (2008) *Flora de Nicaragua*. USA. Missouri Botanical Garden Press, 275-337
- 138.- Sudam. (1972). O extrativismo do Pau-rosa (*Aniba Duckei*, Kostem – *A. rosaeodora*, Duckei): Aspectos sócio – econômicos a silvicultura da espécie. *SUDAM*. Belém: doc.amaz. 3 (1/4): 5–55.

- 139.- Teixeira Duarte, Marta C. (2006) Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales y Aromáticas Utilizadas en Brasil. Universidade Estadual de Campinas. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.
- 140.- Thoroski, J., Blank, G., y Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52:399– 403.
- 141.- Tillan Capo, J. (2002). Plantas medicinales. *Revista cubana* N° 2. Volumen 7. Pág. 37-44. Cuba.
- 142.- Trease and Evans (1998) "Pharmacognosy" 2nd Edition WB Saunders, Londosn
- 143.- Ultee, A., Bennik, M. H., y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561–1568.
- 144.- Ultee, A., Kets, E. P., Alberda, M., Hoekstra, F. A., y Smid, E. J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174:233–238.
- 145.- Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Albán-Castillo J, Estevez Y, Lores FA, Rojas R, Gamboa D, Sauvain M, Castillo D, Bourdy G. 2009. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J Ethnopharmacol* 123: 413 - 422.
- 146.- Varro E, Tyler. "Farmacognosy", 9 Th Edition, Lea Febiger; Philadelphia, (1989).
- 147.- Vasil, M. L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr. Res.* 108:800-805.

- 148.- Vásquez Martínez, Rodolfo (1997) - Flórmula de las reservas biológicas de Iquitos, Perú. Págs. 63
- 149.- Velásquez. C, S. M. (2005). Caracterización de Aceites Esenciales y Evaluación de la Actividad Biocida de Cinco Especies Nativas de Piperaceas. Guatemala. 55. Tesis Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. MUPLAM. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Facultad de Agronomía.
- 150.- Watson, E. (1985). Cultivos Tropicales Adaptados a la Selva Alta Peruana, particularmente al Alto Huallaga. Edición Fondo del Libro, Banco Agrario del Perú. Lima, Perú
- 151.- Wyllie, M. G. (2003). The genesis of a phyto-pharmaceutical industry (Mark II). *BJU Int.* 91: 721-722.
- 152.- Zohary, Daniel and Hopf, Maria. (2000) Domestication of plants in the Old World, third edition (Oxford: University Press), p. 197.

4.5.2.- URL`s

- 1.- [http:// chemacx. Cambridgesoft.com/ chemacx/_prod](http://chemacx.Cambridgesoft.com/chemacx/_prod)
FAQ – CambridgeSoft
- 2.- www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=332&fr=1&sts=sss&lang=EN
Biblioteca de la Universidad San Carlos de Guatemala
- 3.- www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html
U.S. FDA Regulations - RegistrarCorp.com
- 4.- www.clsi.org
The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
- 5.- <http://web.sinectis.com.ar/fitomedicina/Introfito.html>.2006/05/28
Plantas medicinales aprobadas en Colombia

ANEXOS

ANEXO N° 1

**DATOS DE PASAPORTE DE COLECCIÓN DE ESPECIES DE LAS
PLANTAS MEDICINALES EN ESTUDIO**

N° de Ficha:

FICHA DE CAMPO

DATOS GENERALES:

Lugar de colección:..... Distrito:..... Provincia:.....
Fecha:..... Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X)..... (Y).....
Tipo de Suelo:..... Otras características:.....
Nombre del Colector:..... N° Colección:.....

TAXONOMÍA:

Familia Vegetal:..... Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....

CARACTERÍSTICAS VEGETALES:

Habitad:..... Estadio Productivo.....
Posición de Hojas:..... Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:..... Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:..... Látex:..... Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:..... Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:..... N° de Pétalos:..... Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:..... Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:..... N° de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:..... Consistencia:..... Dehiscencia:.....

DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:

Uso Medicinal 1:..... Parte Usada:.....
Cantidad Usada 1:..... Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 2:..... Parte Usada:.....
Cantidad Usada 2:..... Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 3:..... Parte Usada:.....
Cantidad Usada 3:..... Forma de Preparación:.....

COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:

Peso:.....
Parte Colectada:.....
Observaciones:.....
.....
.....

ANEXO Nº 2

Figura Nº 11: Exicata de una muestra botánica de *Aniba rosaeodora*

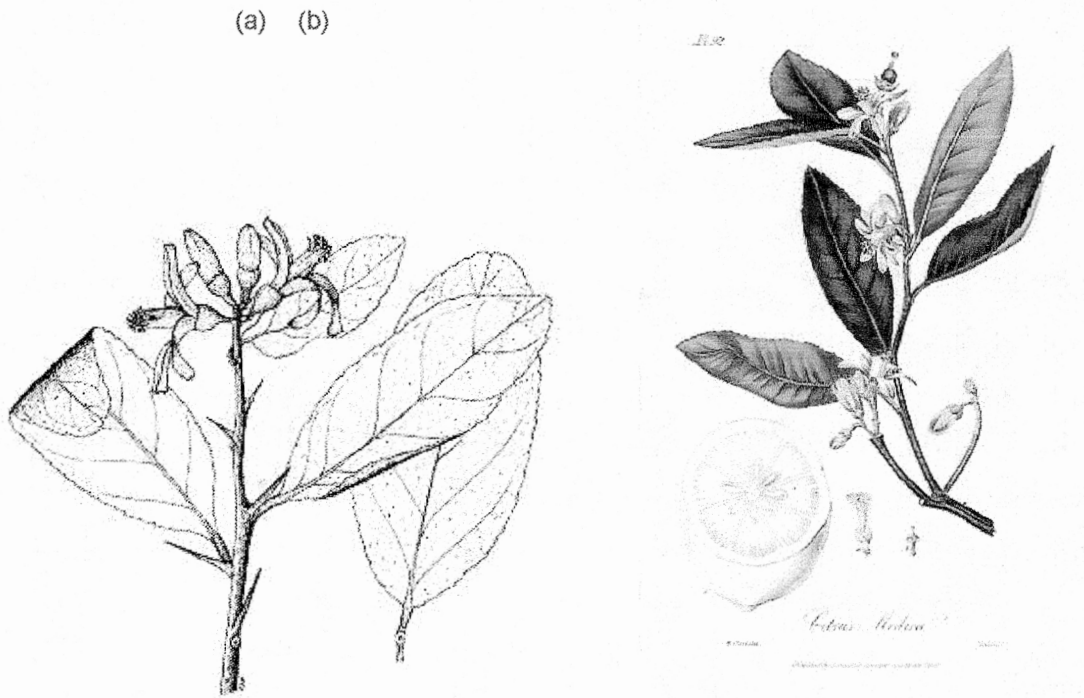


ANEXO N° 03

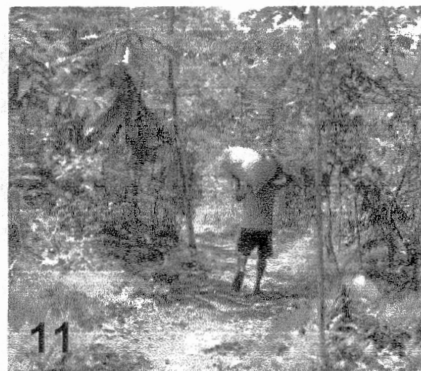
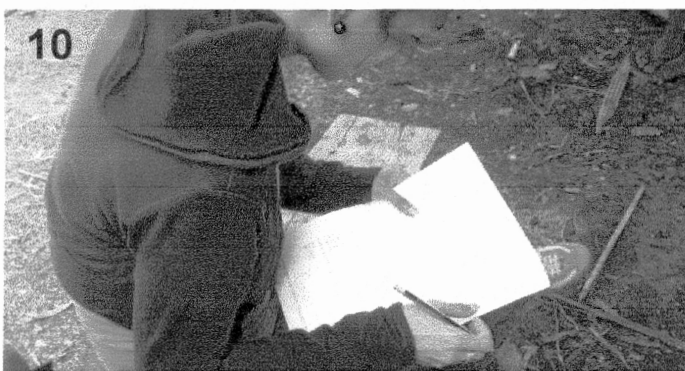
Figura N° 12: Exicata de una muestra botánica de *Piper aduncum*



Figura N° 13: imagen (a) y (b) de una muestra botánica de *Citrus medica*



ANEXO N° 4
Recolección de las muestras botánicas



Fotografía N° 5. Caminata al sitio de muestreo, **Fotografía N° 6.** Seleccionando las hojas libres de parásitos y en buen estado, **Fotografía N° 7.** Recolectando las ramas de las plantas con hojas en buen estado, **Fotografía N° 8.** Recolectando las muestras, **Fotografía N° 9.** Empacando las muestras, **Fotografía N° 10.** Recolectando la información botánica de las muestras, **Fotografía N° 11.** Retorno a la ciudad con las muestras recolectadas

ANEXO N° 5

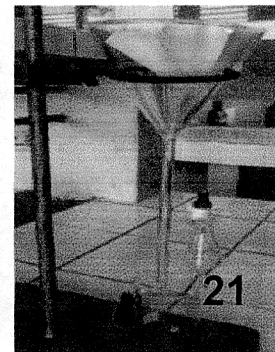
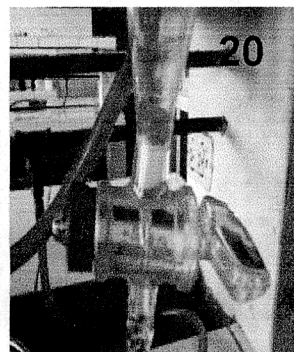
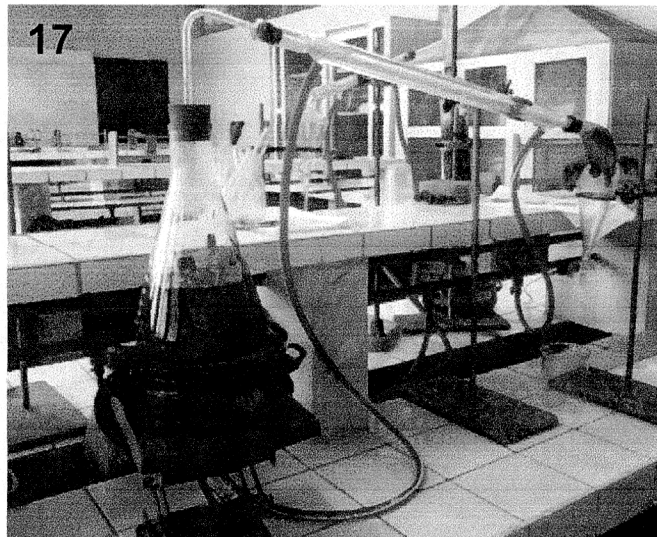
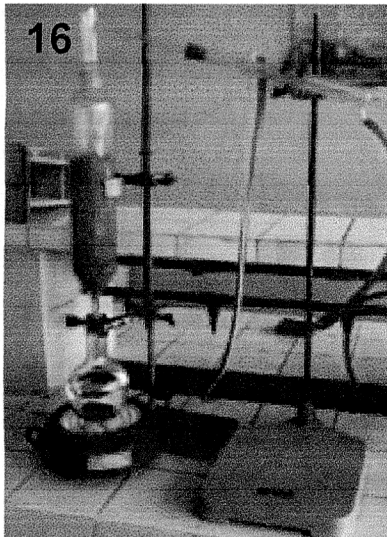
Pesada y Secado de las Muestras Botánicas Colectadas



Fotografía N° 12. Pesado de las muestras, **Fotografía N° 13.** Pesado de las muestras la cantidad necesaria que requiere el protocolo, **Fotografía N° 14.** Acomodando las muestras en el cuarto de secado y la **Fotografía N° 15.** Secado de las hojas

ANEXO N° 6

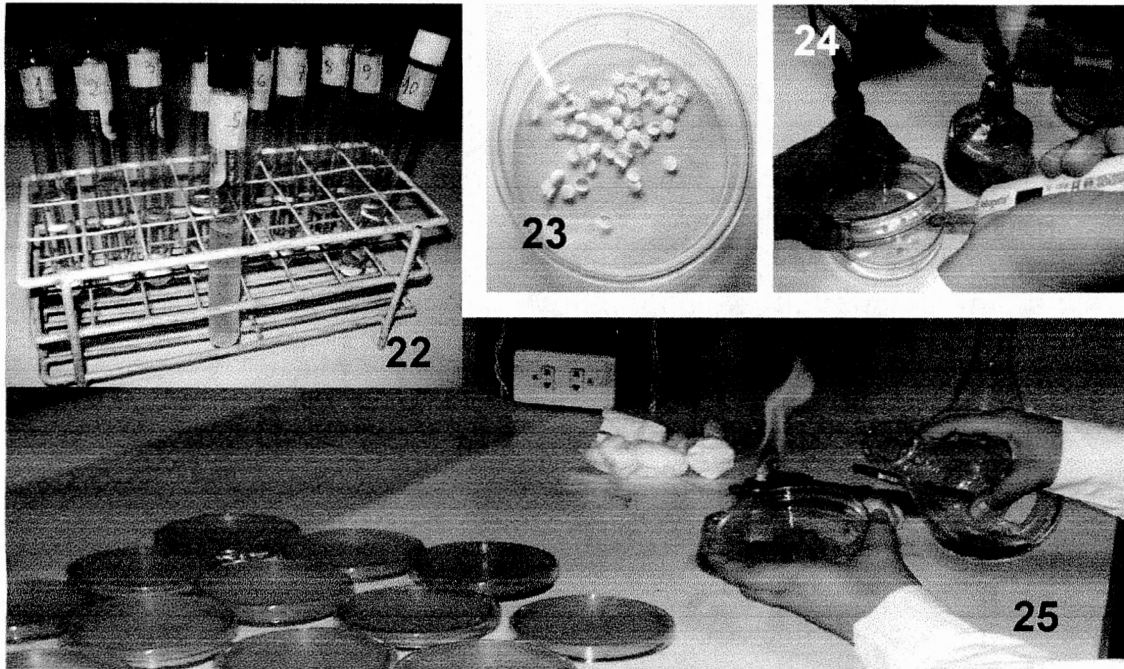
Destilación de Aceites Esenciales



Fotografía N° 16. Destilador, Fotografía N° 17. Destilación de los aceites esenciales, Fotografía N° 18. Pesado de la muestra seca y molidas, Fotografía N° 19. Decantación, Fotografía N° 20. Fraccionamiento de las fases y Fotografía N° 21. Filtrado

ANEXO N° 7

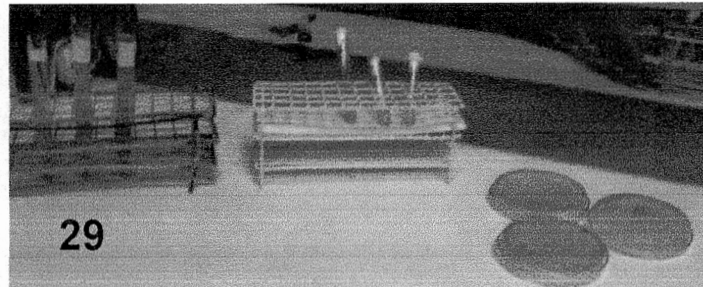
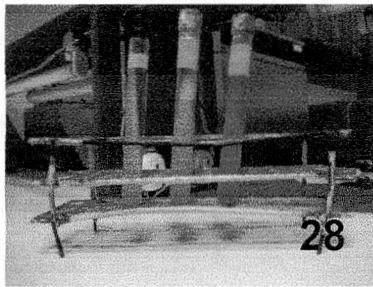
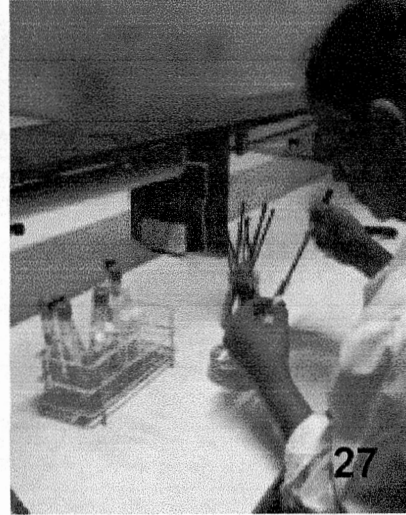
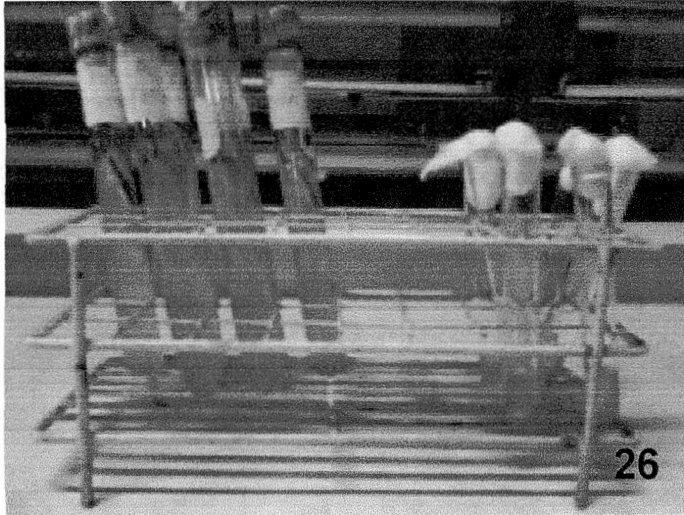
Preparación de las Placas Petri y Medios de Cultivo



Fotografía N° 22. Preparación de los tubos para el ensayo antimicrobiano, **Fotografía N° 23.** Elaboración de los discos de sensibilidad, **Fotografía N° 24.** Inoculación de los aceites en los discos de sensibilidad y **Fotografía N° 25.** Preparación de las placas

ANEXO N° 8

Repique de Cepa a la Placa Petri



Fotografía N° 26. Preparación de las cepas, **Fotografía N° 27.** Sembrando las cepas en los tubos para el ensayo, **Fotografía N° 28.** Cepas de origen, **Fotografía N° 29.** Siembra de las cepas en placas petri

ANEXO N° 9

9.1.- DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Las muestras que presenten sedimentos se filtran antes de efectuar las determinaciones.

9.2.- DETERMINACIÓN DEL OLOR

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con las características del producto.

9.3.- DETERMINACIÓN DEL COLOR Y ASPECTO

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco, se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas. Se informa el resultado.

9.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

De la muestra de ensayo se toma la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfría a 25°C. Se pesa el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de ± 0.5 mg. Y se llena con la muestra de ensayo de modo que no queden burbujas de aire, si es preciso se emplea una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra. Se sumerge en un baño de agua a $(25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ durante 30 minutos al cabo de los cuales se tapan, se seca exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesa. Se vacía el picnómetro, se lava con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25°C.

9.5.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfiere 5 ml. A una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada, la cápsula se coloca en un baño de agua (40-50°C) y se evapora hasta que el residuo este aparentemente seco; posteriormente se pasa a una estufa, a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 horas. Se retira la cápsula de estufa, se coloca en una secadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener masa constante.

ANEXO N° 9

9.1.- DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Las muestras que presenten sedimentos se filtran antes de efectuar las determinaciones.

9.2.- DETERMINACIÓN DEL OLOR

Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm. de anchura por 10 cm. de longitud y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con las características del producto.

9.3.- DETERMINACIÓN DEL COLOR Y ASPECTO

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco, se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas. Se informa el resultado.

9.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

De la muestra de ensayo se toma la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfría a 25°C. Se pesa el picnómetro limpio, vacío y seco con un error máximo permisible de ± 0.5 mg. Y se llena con la muestra de ensayo de modo que no queden burbujas de aire, si es preciso se emplea una tira de papel de filtro para extraer el exceso de muestra. Se sumerge en un baño de agua a $(25 \pm 1$ °C) durante 30 minutos al cabo de los cuales se tapan, se seca exteriormente cuidando de no frotar excesivamente o de transmitir el calor de la mano y se pesa. Se vacía el picnómetro, se lava con alcohol etílico y posteriormente con agua, repitiéndose el ensayo con agua enfriada a 25°C.

9.5.- DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

De la muestra de ensayo previamente homogenizada se transfiere 5 ml. A una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada, la cápsula se coloca en un baño de agua (40-50°C) y se evapora hasta que el residuo este aparentemente seco; posteriormente se pasa a una estufa, a una temperatura de 105 ± 2 °C durante 3 horas. Se retira la cápsula de estufa, se coloca en una secadora hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa. Se repite el proceso anterior, pero empleando solo 60 minutos de secado, las veces necesarias, hasta obtener masa constante.

ANEXO N° 10

TÉCNICA DE DIFUSIÓN DEL ANTIBIÓTICO EN PLACA EMPLEANDO MULTIDISCOS (MÉTODO DE KIRBY-BAUER)

Esta técnica consiste en discos de papel filtro impregnados con el antimicrobiano a probar, los cuales se aplican en la superficie de placas de medio de cultivo sólido sembrado masivamente con el microorganismo se quiera probar. Esta técnica será modificada para el uso de aceites esenciales. En caso de que haya sensibilidad, se observará un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco (min. <19mm). El tamaño del halo dependerá de la sensibilidad del microorganismo y de la concentración del antimicrobiano en el disco.

- Lavado, envoltura y esterilización de todo el material a utilizar como: microfiltros con membranas, tubos de ensayo, pipetas y puntas para micropipetas.
- Preparación de caldo peptona de caseína – peptona de harina de soya, colocar 10 mL en 35 tubos con tapón de rosca y esterilizarlos.
- Preparación de agar soya tripticaseína, vaciar en 30 cajas de Petri desechables y estériles, dejar solidificar e incubar a 37°C por 24 horas para comprobar que no hubo contaminación (prueba de esterilidad).
- Preparación de solución salina, colocar 10 mL. en 21 tubos de tapón de rosca y esterilizarlos.

Preparación del inóculo

- Siembra de los cultivos de microorganismos de referencia por estría cruzada cada uno de ellos en una placa de agar y se incubará a 37°C durante 24h.
- Toma con asa esteril de 3 a 5 colonias aisladas en las placas de agar soya tripticaseína al día siguiente; siembra en tubo con caldo peptona de caseína – peptona de harina de soya; incubación a 37°C 24h.

- Toma de algunos mililitros de estas cepas para su adicción a la solución salina hasta que la turbidez del tubo sea igual por comparación visual a la del tubo N° 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, pues este es el tubo de referencia que corresponde a la concentración de 1.5×10^8 bacterias/ ml.
- Uso inmediato una vez ajustado la suspensión celular para sembrar dos placas de agar soya tripticaseina con un hisopo sobre la totalidad de la superficie del agar para la obtención de un inóculo uniforme, se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja y el agar (siembra masiva).
- Dilución en 1 mL de solución salina una cantidad conocida del aceite esencial; esterilizar la solución pasándola por un microfiltro con membrana Millipore con un tamaño de poro de 0.45 micrómetros de diámetro.
- Obtención de discos de papel filtro Whatman 41 y con ayuda de una perforadora, colocarlos en una caja petri para obtener 20 cajas con 10 discos cada una; esterilización.
- Impregnado de diez microlitros a los discos de papel filtro estériles con ayuda de una micropipeta P-100 para cada una de las diluciones realizadas de los aceites esenciales.
- Colocación con pinzas flameadas en sentido de las manecillas del reloj de los discos de papel filtro a cada placa sembrada con los cultivos ajustados de los microorganismos, presionando ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto completo con la superficie.
- Incubación de las placas a 37°C por 24 horas y Corroboración del halo de inhibición alrededor del disco, en caso de presentarlo, medir su diámetro.