



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS:

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Aloysia triphylla (CEDRÓN) SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli*,
Salmonella typhi, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus***

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

BACHILLER: MAMANI CURAZI, Edwin Daniel

ASESOR: Mg. JARAMILLO BRICEÑO, Marilú R.

LIMA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

A Dios, por su protección; a mis padres, por ser el modelo de mis valores morales, espirituales y ayuda incondicional; a mi esposa e hijos por su apoyo permanente.

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater “UAP”, al Dr. Javier Gómez Guerreiro y a la Mg. Marilú R. Jaramillo Briceño; por su asesoría y orientación durante el desarrollo de la presente investigación.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. El diseño de la investigación fue de tipo prospectivo y experimental. Las muestras de *Aloysia triphylla* Cedrón se colectaron en el distrito de Corongo (3141 msnm), provincia de Corongo, región Ancash. El aceite esencial se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor. Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó el método de Kirby Bauer (Difusión en Agar). Los resultados confirmaron que el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presenta actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas lo que se evidenció por los halos de inhibición del desarrollo bacteriano obtenidos. Se evaluó volúmenes de 5, 10, 15 y 20 µl de aceite esencial puro frente a cepas de *Escherichia coli* que presentó halos de inhibición de 8, 13, 15 y 17 mm respectivamente, *Salmonella typhi* presentó halos de inhibición de 8, 11, 13 y 15 mm, *Staphylococcus aureus* presentó halos de inhibición de 11, 13, 14 y 23 mm y *Bacillus cereus* presentó inhibición total del desarrollo bacteriano. Además se realizó la marcha fitoquímica del extracto etanólico detectándose compuestos fenólicos que validan la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón.

Palabras Clave: *Aloysia triphylla* Cedrón, Aceite esencial, Actividad antibacteriana.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antibacterial activity of the essential oil of lemon verbena *Aloysia triphylla* on strains of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The research design was prospective and experimental. Lemon verbena *Aloysia triphylla* samples were collected from Corongo district (3141 meters above sea level), Corongo province, Ancash region in Perú. The essential oil was obtained by the steam stripping method. Kirby Bauer method (agar diffusion) was used to determine the antibacterial activity. The results confirm that the essential oil of lemon verbena *Aloysia triphylla* has antibacterial activity against the studied strains. It was evidenced by the inhibition halos of the obtained bacterial growth. Volumes of 5, 10, 15 and 20 µl of pure essential oil were evaluated against strains of *Escherichia coli*; presented inhibition halos of 8, 13, 15 and 17 mm respectively, *Salmonella typhi* presented inhibition halos of 8, 11, 13 and 15 mm, *Staphylococcus aureus* presented inhibition halos of 11, 13, 14 and 23 mm and *Bacillus cereus* presented complete inhibition of bacterial growth. Besides, the phytochemical march of the ethanol extract was performed where phenolic compounds were detected. It validates the antibacterial activity of essential oil of the lemon verbena *Aloysia triphylla*.

Keywords: Lemon verbena *Aloysia triphylla*; Essential oil; Antibacterial activity.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE CUADROS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIII
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	15
1.2 Formulación del Problema.....	16
1.2.1 Problema Principal.....	16
1.2.2 Problemas Secundarios.....	17
1.3 Objetivos de la Investigación.....	17
1.3.1 Objetivo General.....	17
1.3.2 Objetivos Específicos.....	17
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	18
1.4.1 Hipótesis General.....	18
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	18

1.5	Justificación e Importancia de la Investigación.....	18
1.5.1	Justificación de la Investigación.....	18
1.5.2	Importancia de la Investigación.....	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....		20
2.1	Antecedentes de la Investigación.....	20
2.1.1	Antecedentes Nacionales.....	20
2.1.2	Antecedentes Internacionales.....	21
2.2	Bases Teóricas.....	24
2.2.1	<i>Aloysia triphylla</i> Cedrón.....	24
2.2.2	Composición química del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón.....	27
2.2.3	Aplicaciones del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón.....	29
2.2.4	Aceites esenciales.....	30
2.2.5	Métodos para la obtención de aceites esenciales.....	36
2.2.6	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.....	40
2.2.7	Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales.....	44
2.3	Definición de Términos Básicos.....	52
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		56
3.1	Tipo de la Investigación.....	56
3.1.1	Método.....	56
3.1.2	Técnica.....	56
3.1.3	Diseño.....	57
3.2	Población y Muestreo de la Investigación.....	57
3.2.1	Población.....	57

3.2.2	Muestra.....	57
3.3	Variables e Indicadores.....	57
3.4	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	58
3.4.1	Técnicas e Instrumentos.....	58

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE		
	RESULTADOS.....	59
4.1	Resultados.....	59
	DISCUSIÓN.....	62
	CONCLUSIONES.....	67
	RECOMENDACIONES.....	68
	FUENTES DE INFORMACIÓN.....	69
	ANEXOS.....	74
	MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N° 01. PLANTA DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	24
FIGURA N° 02. MÁQUINA PARA HACER PRENSADO EN FRIO.....	37
FIGURA N° 03. MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN.....	39
FIGURA N° 04. DIFERENCIA ESTRUCTURAL ENTRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.....	43
FIGURA N° 05. CERTIFICACIÓN BOTÁNICA DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	76
FIGURA N° 06. MARCHA FITOQUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	78
FIGURA N° 07. MARCHA DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	78
FIGURA N° 08. ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	79
FIGURA N° 09. MESA DE TRABAJO.....	79
FIGURA N° 10. PLACAS PETRI CON LAS CEPAS BACTERIANAS.....	80
FIGURA N° 11. COLOCACIÓN DE LOS DISCOS EN LAS PLACAS PETRI.....	80
FIGURA N° 12. HALOS DE INHIBICIÓN PARA <i>Escherichia coli</i>	81
FIGURA N° 13. HALOS DE INHIBICIÓN PARA <i>Salmonella typhi</i>	81
FIGURA N° 14. HALOS DE INHIBICIÓN PARA <i>Staphylococcus aureus</i>	82
FIGURA N° 15. HALOS DE INHIBICIÓN PARA <i>Bacillus cereus</i>	82

LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 01. APLICACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	30
CUADRO N° 02. GRUPOS FUNCIONALES DE LAS MOLÉCULAS CONSTITUYENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	33
CUADRO N° 03. PRINCIPALES ÁREAS DE APLICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	34
CUADRO N° 04. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	59
CUADRO N° 05. SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	59
CUADRO N° 06. MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	60

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 01. INTERPRETACIÓN DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER.....	49
TABLA N° 02. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	61
TABLA N° 03. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i> CEDRÓN.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

g	gramos
°C	grados centígrados o Celcius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervioso Central
ml	mililitros
μl	microlitros
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standars
μg	microgramos
UFC	Unidad Formadora de Colonias
%	Porcentaje
cm	centímetros
\bar{X}	Promedio
≤	menor o igual
≥	mayor o igual
ATB	Antibiótico
S	Sensible
I	Intermedio
R	Resistente
CMB	Concentración Mínima Bactericida
GC-MS	Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas
CG	Cromatografía de Gases
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
m.s.n.m.	metros sobre nivel del mar
ATCC	American Type Culture Collection

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales se utilizan desde tiempos muy antiguos para tratar diversos problemas, tales como dermatológicos, alérgicos, digestivos, ginecológicos, etc. Actualmente se conoce que los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas y algunas especias han mostrado que poseen efectos antibacterianos y antimicóticos, además presentan la ventaja de que su extracción no genera toxicidad al medio ambiente.

Se sabe que multitud de pueblos descubrieron ya en tiempos remotos, que algunas plantas eran aptas para su uso como alimentos y otras se caracterizaban por tener propiedades curativas. La búsqueda de algún remedio fue la génesis del uso de las plantas para su propio beneficio, ya sea para sanar alguna dolencia o por creencias mágico-religiosas; en la mayoría de los casos, simplemente, fue el resultado de la búsqueda de nuevos alimentos.

El uso de las plantas medicinales nació con el hombre, hasta los primeros años del siglo XIX se utilizaron por ensayo-error, esta práctica pasaba de generación en generación por transmisión oral constituyendo lo que se conoce como medicina tradicional; con el transcurso del tiempo se dejó de lado el uso de las plantas medicinales debido al auge de la síntesis de sustancias químicas.

En la actualidad, se ha revalorado el campo de aplicación de las plantas y especias aromáticas, en farmacología y biotecnología; la investigación científica le abre un nuevo espacio a los aceites esenciales, evaluando su efecto antibacteriano, antimicótico e insecticida, por medio de pruebas *in vitro* y evaluaciones en tejidos vivos.

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, muchas de sus especies vegetales pueden ser aprovechadas de forma sostenible por las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria entre otras.

Una de estas plantas medicinales es *Aloysia triphylla*, conocida popularmente como cedrón; un arbusto con aplicaciones etnomedicinales, culinarias y cosméticas, que podría constituirse en una fuente de principios activos con propiedades antibacterianas.

Por lo anteriormente expuesto el objetivo general del presente trabajo de investigación fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

Las muestras de *Aloysia triphylla* (Cedrón) fueron obtenidas en el distrito de Corongo (3141 msnm), provincia de Corongo, región Ancash.

De esta manera se comprobó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón) para contribuir a validar científicamente este uso tradicional.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática:

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de enfermedades; dichas plantas eran veneradas por sus virtudes medicinales y la información sobre sus usos fue transmitida de generación en generación, se aceptaba como cierto todo aquello que se narraba pues inicialmente no se investigaba científicamente como o porque presentaban los efectos o propiedades medicinales atribuidas. Hasta los primeros años del siglo XIX se utilizaron por ensayo-error, esta práctica pasaba de generación en generación por transmisión oral constituyendo lo que se conoce como medicina tradicional; con el transcurso del tiempo se dejó de lado el uso de las plantas medicinales debido al auge de la síntesis de sustancias químicas.

La nueva tendencia en la investigación de plantas medicinales es buscar nuevas opciones para combatir las enfermedades infecciosas, debido a que las bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos sintéticos. Investigaciones científicas realizadas en diversos países refieren que algunos aceites esenciales presentan efectos antibacteriano, antimicótico y/o biocida. Actualmente, se incrementa cada vez más el interés por los recursos naturales, incluyendo la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos para diversos usos, tales como la preservación de alimentos, el desarrollo de cultivos orgánicos que proporcionen alimentos inocuos ya que no presentarán restos de insecticidas sintéticos, metales pesados, etc.^{1, 2}

Muchas especies de plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana debido a que contienen aceites esenciales, tal es el caso de *Aloysia triphylla* conocida popularmente como Cedrón. Esta planta pertenece a la familia de las *Verbenaceae* que crece de manera silvestre en Sudamérica, sobre todo en climas templados y comprende cerca de 175 géneros y 2 300 especies.³

Estudios realizados en Chile, Argentina, Brasil, Marruecos y Turquía sobre *Aloysia triphylla* mostraron que las partes aéreas de la planta contienen entre 0.2 y 1% de aceite esencial. Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Aloysia triphylla* son: citral 38-40% (neral 18% y geranial 22%) y limoneno (7-11%).³

Aloysia triphylla es una planta autóctona de América del Sur, por lo que su cultivo no presenta problemas de adaptación. Los conquistadores españoles debido a su fragancia la llevaron a Europa. Se ha dispersado a otras latitudes como Eslovenia, Egipto, Marruecos donde presentan algunos problemas de adaptación. En estos lugares actualmente se cultiva esta planta debido a un gran interés económico para su industrialización, sobre todo por su contenido de aceites esenciales.⁴

1.2 **Formulación del Problema:**

1.2.1 **Problema Principal:**

¿Qué actividad presenta el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*?

1.2.2 Problemas Secundarios:

- ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Escherichia coli*?
- ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Salmonella typhi*?
- ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Staphylococcus aureus*?
- ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Bacillus cereus*?

1.3 Objetivos de la Investigación:

1.3.1 Objetivo General:

Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Escherichia coli*.
- Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Salmonella typhi*.
- Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón sobre cepas de *Bacillus cereus*.

1.4 Hipótesis de la Investigación:

1.4.1 Hipótesis General:

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presenta actividad antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

1.4.2 Hipótesis Secundarias:

- ✓ El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli*.
- ✓ El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de *Salmonella typhi*.
- ✓ El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*
- ✓ El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de *Bacillus cereus*.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación:

1.5.1 Justificación de la Investigación:

Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas han demostrado efecto antibacteriano sobre bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas, así como contra mohos, levaduras e inclusive sobre algunos microorganismos productores de micotoxinas.

Investigaciones recientes han reportado que dichas propiedades se deben principalmente a los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y

diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes, antibacterianas y antimicóticas.

La composición química del aceite esencial es variable, depende de los denominados factores edáficos (procedencia de la planta, condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo, ciclo fenológico de la planta), así como también del método de extracción del aceite esencial, de la duración y la temperatura del proceso.

Por tales razones, el objetivo del trabajo de investigación fue comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

1.5.2 **Importancia de la Investigación:**

El presente trabajo de investigación es importante porque al comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón, se proporciona un sustento científico que valida su uso tradicional. Posteriormente puede convertirse en una alternativa para el desarrollo de cultivos orgánicos porque podría utilizarse como un biocida para el control de plagas en la agricultura. También podría ser útil en el control de bacterias típicas contaminantes de los alimentos. Además, se espera contribuir a desarrollar una cultura de cultivo de esta planta medicinal, ya que actualmente en nuestro país crece de manera silvestre, mientras que en otros ya se cultiva, para la obtención de mejores rendimientos del contenido de aceite esencial. De esta manera indirectamente se contribuiría a mejorar la calidad de vida de los campesinos que se dediquen a este cultivo.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes:

Nacionales:

En la Tesis realizada por Patricia Alexandra Aliaga Mamani; titulada “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Aloysia triphylla* “CEDRÓN” FRENTE A *Escherichia coli* ATTC 25922 Y *Staphylococcus aureus* 25923” realizada en el año 2013.⁵ En dicho trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* frente a las bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se determinó la sensibilidad antibacteriana de *E. coli* y *S. aureus*, por los métodos de: disco difusión, dilución en medio líquido y difusión en agar. Los resultados indican que el aceite esencial, presenta actividad antibacteriana significativa frente a *E. coli* y moderada frente a *S. aureus*. Así, el estudio reveló la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Escherichia coli* siendo de 3,701 mg/ml mientras que para *Staphylococcus aureus* fue 15,167 mg/ml (dosis cinco veces mayor). También se precisó la concentración mínima bactericida (CMB) de *Escherichia coli* siendo de 4,186 mg/ml, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue 16,259 mg/ml (dosis cuatro veces mayor).

En el año 2012, Juan Rojas, Olga Palacios, Sergio Ronceros; realizaron un estudio titulado “EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* Britton (Cedrón) SOBRE EL *Trypanosoma cruzi* EN RATONES”.⁶ El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad anti *Trypanosoma cruzi* in

vivo del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton cedrón en ratones. En sus resultados hallaron que el aceite esencial de cedrón produjo una reducción significativa de 85,4% del pico de parasitemia con la dosis de 250mg/kg, además produjo reducción del número de amastigotes e infiltrados inflamatorios en el corazón. Llegaron a la conclusión que el aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón) en las condiciones experimentales del estudio, tiene efecto anti-*Trypanosoma cruzi* *in vivo* en ratones.

Internacionales:

En la Facultad de Ciencias de la Salud del Colegio Mayor de Antioquia en Medellín, Colombia Claudia Yaneth Sánchez Jaramillo, Juan Carlos Bedoya Pérez, Edison Andrés Acosta Zamora en el año 2013 realizaron una investigación titulada “ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* SOBRE CEPAS *S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* Y *Pseudomonas aeruginosa*”⁷ y reportaron los siguientes resultados: el aceite esencial de *Aloysia triphylla* conocida comúnmente como Cedrón, presenta actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas típicas de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Los componentes principales como el Neral, Geranial y Limoneno que se encuentran en mayor proporción en el aceite esencial son los responsables directos del efecto antimicrobiano.

En el año 2010, en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Departamento de Microbiología e Inmunología; María de las M. Oliva, Emilia Beltramino, Nicolás Gallucci, Carina Casero, Julio Zygadlo y Mirta Demo realizaron una investigación titulada “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF

Aloysia triphylla (L`Her.) BRITTON FROM DIFFERENT REGIONS OF ARGENTINA”.⁸ Los investigadores afirman que los aceites esenciales poseen conocida actividad antimicrobiana. Esta actividad puede estar influenciada por la composición química de los aceites. El objetivo del trabajo fue estudiar la variabilidad en la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido a partir de plantas de *Aloysia triphylla* recolectada de diferentes regiones de Argentina. Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación y analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Los estudios antimicrobianos se llevaron a cabo por la técnica de difusión en disco. Los aceites esenciales presentaron componentes mayoritarios comunes y presentaron diferencias en la cantidad y calidad del resto de los componentes. La mayor relación citral/limoneno y la mejor actividad antimicrobiana fue obtenida con el aceite esencial de La Paz. Las levaduras resultaron ser los microorganismos más sensibles, seguidos por las bacterias Gram positivas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de las distintas muestras. Las diferencias en la actividad biológica de cada aceite esencial podrían ser atribuidas a la cantidad y calidad de los terpenos que lo constituyen.

En el año 2010, en el Instituto de Investigaciones, Departamento de Microbiología y Parasitología, Departamento de Bioanálisis Clínico, Cátedra de Farmacognosia, Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luís Ruiz Terán”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida – Venezuela; Luis B. Rojas, Judith Velasco, Tulia Díaz, Ricardo Gil Otaiza, Juan Carmona, Alfredo Usubillaga; realizaron la investigación titulada “COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE

ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* (L'Hér.) BRITTON CONTRA PATÓGENOS GENITO-URINARIOS".⁹ En dicho trabajo estudiaron el aceite esencial de *Aloysia triphylla* el cual obtuvieron por hidrodestilación de las partes aéreas de la planta y analizaron por cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases con espectrometría de masa (CG-EM) e identificaron 22 componentes, siendo los mayoritarios geranial (27,3%), neral (22,5%), geraniol (6,2%), biciclogermacreno (5,2%) y nerol (4,9%). La evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial la realizaron por el método de difusión en agar con discos contra aislados clínicos de infecciones del tracto urinario y de vaginosis bacteriana. Los resultados obtenidos revelaron inhibición del desarrollo de todos los aislados (*Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp.), con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10-50 µg/ml. Este es el primer reporte sobre el efecto antibacteriano de este aceite esencial contra patógenos genito-uritarios y la baja dosis observada, sugiere que este aceite podría ser usado en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por estos micro-organismos.

En 1998, Stashenko, E.; Combariza, J. y Puertas, M. realizaron una investigación titulada "ACEITES ESENCIALES: TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS. LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, UIS", 30 p.¹⁰, donde afirman que los aceite esenciales son mezclas de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas; en su composición química entran hidrocarburos del grupo de los terpenos, junto con compuestos oxigenados de bajo peso molecular (alcoholes,

aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), que son los que les dan a los aceites esenciales el aroma que los caracteriza.

2.2 Bases Teóricas:

2.2.1 *Aloysia triphylla* Cedrón:

El Cedrón es una planta cuyo nombre “Aloysia” es en honor a María Luisa de Parma (1754-1819), reina de España por su matrimonio con Carlos IV, y “triphylla” (tres hojas) por el número de hojas de cada verticilo. En la figura N° 01 se observa la planta de cedrón.

FIGURA N° 01

PLANTA DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN



Según la certificación botánica realizada por el biólogo-botánico Hamilton W. Beltrán S. (ANEXO 2) y de acuerdo al sistema de clasificación de Cronquist 1981 se ubica en las siguientes categorías:

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Verbenaceae
Género : **Aloysia**
Especie : **Aloysia triphylla** (L'Hér.) Britton

Nombres comunes:

Cedrón, Cidrón, Hierba Princesa, Hierba Luisa, María Luisa, Bella Luisa, Verbena olorosa, Lemon verbena, Verbena citronela, Verbena de tres hojas, Verbena de olor, Hierba cidrera, Hierba de las tres hojas, Hierba de la primavera, Reina Luisa.¹¹

Origen y extensión:

El "Cedrón" es una planta nativa de Sudamérica, crece de forma silvestre en los países andinos, principalmente en Perú, Colombia, Argentina, Chile, Bolivia, Brasil (Río Grande del Sur), Paraguay, Uruguay. En Ecuador se la encuentra dentro de los huertos y jardines de las casas.

Los conquistadores la introdujeron a Europa en el siglo XVII donde se cultiva en regiones templadas como por ejemplo Eslovenia. Actualmente se cultiva también en Marruecos, Turquía y Egipto por el contenido de aceite esencial.^{12, 13}

Descripción botánica:

El Cedrón es un arbusto perenne de 1,5 metros a 5 metros de alto, sus raíces son fasciculadas y fibrosas de color blanco; su tallo es leñoso de color café claro, anguloso con nudos de donde brotan nuevas ramas; las hojas son verticiladas, lanceoladas, simples, enteras, pecioladas, de 1,5 a 3 cm de ancho y de 7 a 10 cm de largo, de color verde oscuro brillantes en el haz y verde claro en el envés, reunidas en verticilos de 3 a 4 hojas que forman una roseta y con intenso olor a limón; sus flores son pequeñas de 3 a 4 mm, de color blanco violáceo o morado pálido, que en conjunto forman una inflorescencia en racimo; sus frutos son drupas pequeñas, de color verde y sus semillas son de color gris.¹⁴

Cultivo:

Se cultiva fácilmente en regiones con clima templado o cálido; se puede sembrar en huertos de suelos fértiles, profundos, con buen drenaje, además necesita sol para elaborar sus aceites esenciales; no requiere de riego abundante, se debe fertilizar regularmente con nitrógeno y fósforo, además es importante eliminar las malezas que lo rodean. Se propaga por esquejes o semillas.¹⁵

Propiedades medicinales:

Las propiedades curativas de *Aloysia triphylla* Cedrón son múltiples; se emplea para aliviar y curar los espasmos, los desórdenes nerviosos, como ataques de nervios, convulsiones, calambres, síncope y contracciones involuntarias de los músculos. Además se lo utiliza para

estimular y facilitar las evacuaciones y expulsiones de los gases intestinales, limpiando así los intestinos y renovando sus funciones. También ayuda a la digestión porque estimula la función normal del estómago, combate y calma la fiebre. Usado para curar las enfermedades y las inflamaciones de las vías respiratorias como bronquitis, asma, pulmonía, bronconeumonía, laringitis y todas las afecciones de tipo respiratorio.

Para el reumatismo se utiliza las hojas cocidas y calientes en un paño que debe colocarse sobre la zona afectada ya que calma y alivia los dolores. Es un sedante efectivo ya que reduce la acción de un órgano o de un sistema alterado, se usa también para tratar los problemas del corazón, de la presión y diabetes. Se debe tomar ya sea en infusión o tisana, varias tazas de agua de cedrón por día, para obtener todos sus beneficios. Para elaborar una infusión o tisana es necesario colocar las hojas y flores del Cedrón en agua hirviendo, importante dejar reposar la preparación tapada para que sus ingredientes activos se puedan extraer, la cantidad de Cedrón es de 15 gr por cada dos tazas de agua, se debe tomar caliente después de cada comida.

2.2.2 Composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla*

Cedrón:

La composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla* es compleja y varía en función del órgano o parte de la planta estudiados, múltiples estudios reflejan que la variabilidad se puede atribuir en gran medida a factores intrínsecos de quimio tipo (estado de desarrollo fenológico de la especie, parte de la planta estudiada, etc.), y a

factores de naturaleza extrínseca (condiciones climáticas, labores culturales, tratamiento de pos cosecha, etc.) además de los métodos y condiciones de extracción usados. Entre los principales componentes encontrados en el aceite esencial del cedrón tenemos: citral (geranial y neral) y limoneno.¹⁶

Citral:

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

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

Este compuesto, además de su aroma característico, tiene propiedad de ser: antibacterial, antihistamínico, fungicida, expectorante y anticancerígeno.^{17, 18, 19}

Limoneno:

El limoneno es el otro componente abundante en el aceite esencial de *Aloysia triphylla* (7-11%), es un mono terpeno de fórmula C₁₀H₁₆, presenta dos isómeros ópticos, el R-(+)-limoneno y el S-(-)-limoneno.

Tiene una gran importancia en la industria, se emplea en la producción de *p-cimeno*, como disolvente de resinas, pigmentos, tintas, en la fabricación de adhesivos y en la obtención de carvona. Este compuesto tiene propiedades antibacterianas, anticancerígenas, antiespasmódicas y expectorantes.^{18, 19}

Otros componentes:

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

- ✓ **Linalol** : antibacterial
- ✓ **Canfeno** : antioxidante
- ✓ **α -Terpineol** : antibacterial
- ✓ **trans- β -Cariofileno** : antibacterial

2.2.3 Aplicaciones del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón:

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón puede ser empleado como materia prima en diferentes tipos de industria como: cosmética, perfumería, alimentaria, bebidas, agricultura, etc.

En otras industrias, como la farmacéutica, se lo encuentra integrando numerosas tisanas, incluso comprimidos, estomacales, digestivos y colagogos en porcentajes que varían entre el 5 y 10%; también se le encuentra en otro grupo el de "otros hipnóticos y sedantes", en preparados que contienen una proporción del 20%.

Las principales aplicaciones del aceite esencial de Cedrón se presentan en el Cuadro N° 01.

CUADRO N° 01

APLICACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

INDUSTRIAS	APLICACIONES
Farmacéutica	Carminativos, colagogas, hipnóticos y sedantes.
Productos industriales	Agroquímicos: Bioinsecticidas (repelentes de plagas)
Productos Alimenticios	Aromatizante: queques, rellenos, dulces y frutas; Saborizante: platos de pescados, aves, budines, masas, tortas, canapés, ensaladas y pasteles.
	Bebidas: infusiones, combinación de cócteles, sorbetes o bebidas frías, a las que aporta un toque exótico.
Cuidado Personal	Cosmético: lociones y colonias.

Fuente: Elaboración propia

2.2.4 Aceites esenciales:

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta.

El término aceite, probablemente, se origina del hecho de que el aroma de una planta se encuentra en las glándulas o entre las células en forma líquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. La palabra esencial fue derivada del latín “quinta essentia” que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos.¹⁸

Los aceites esenciales se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las

plantas; por ejemplo, se biosintetizan en los tricomas glandulares (hojas) o en glándulas (cáscaras). En las plantas se pueden ubicar en general, en pelos glandulares del tallo y hojas (menta, lavanda, salvia), en las células modificadas del parénquima como en las piperáceas (pimienta), en tubos oleíferos (canela), en tubos esquizógenos (anís, hinojo), o canales lisígenos (pino), entre otros.^{21, 16}

Los aceites esenciales agrupan sustancias volátiles obtenidas mediante procesos físicos a partir de especies vegetales aromáticas caracterizadas por una composición compleja, en la que predominan derivados terpénicos (mono- y sesquiterpénicos) y fenilpropánicos; pueden ser considerados como el grupo fitoquímico más importante dentro de aquellos que confieren olor a las especies vegetales que los contienen.²²

Debido a su aspecto oleoso y a la capacidad de evaporarse cuando se exponen al aire a temperatura ambiente, se denominan también *aceites volátiles*, siendo arrastrables en corriente de vapor de agua. Son líquidos solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Por lo general, reciben el nombre de la especie de la que proceden, como aceite esencial de cedrón, aceite esencial de salvia, etc.²²

Características generales:

Propiedades fisicoquímicas:

Pese a las diferencias de composición entre los distintos aceites esenciales, se afirma que presentan una serie de propiedades físicas comunes: son líquidos a temperatura ambiente, generan diversos

aromas agradables y perceptibles al ser humano, volátiles y arrastrables en corriente de vapor de agua, poseen un color en la gama del amarillo hasta ser transparentes en algunos casos y tienen sabor cáustico, acre e irritante y a veces aromático, dulce y delicado.¹⁹

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

A condiciones ambientales, los aceites esenciales son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella.

Presentan índices de refracción elevados y muchos de ellos son ópticamente activos.

Son solubles en los disolventes orgánicos comunes (alcohol, éter, etc).

Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco).^{23,}

24

Composición química:

Los metabolitos secundarios volátiles que componen los aceites esenciales se pueden clasificar en base a los grupos funcionales que contienen sus moléculas, como se muestra en el cuadro N° 02.²¹

CUADRO N° 02

GRUPOS FUNCIONALES DE LAS MOLÉCULAS CONSTITUYENTES DE LOS ACEITES
ESENCIALES

GRUPO FUNCIONAL	NATURALEZA QUÍMICA	EJEMPLO
HIDROCARBUROS	Terpénicos	Limoneno, α -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, p -cimeno
	Sesquiterpénicos	trans- β -Cariofileno
ALDEHÍDOS	Monoterpénicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, octadenal
	Aromáticos	Cinamaldehido
ALCOHOLES	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-Decanol
	Sesquiterpénicos	Espatulenol, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
FENOLES	Aromáticos	Timol, carvacrol

Fuente: Díaz, 2007.

Aplicaciones de los aceites esenciales:

Los aceites esenciales tienen un amplio rango de aplicación en la industria.

Pueden ser empleados como materia prima en diferentes tipos de industria en general, cosmética, alimenticia, bebidas, textil, etc.; mientras que en otras industrias, como la farmacéutica, se pueden usar productos aislados de las mismas esencias.²¹

Las principales áreas de aplicación de los aceites esenciales se presentan en el Cuadro N° 03.

CUADRO N° 03

PRINCIPALES ÁREAS DE APLICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

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

Fuente: Díaz, O., Vargas, A. y Bottia, E.

Distribución en la naturaleza:

Los aceites esenciales son elaborados por los vegetales superiores pertenecientes, en su gran mayoría, a un número relativamente restringido de familias entre las que destacan las Lamiáceas, Asteráceas, Rutáceas, Lauráceas, Magnonoliáceas y Mirtáceas.

Si bien las hojas y las flores de las especies aromáticas son los órganos que preferentemente presentan una mayor riqueza en aceites esenciales, estos pueden encontrarse almacenados en cualquier

órgano del vegetal, tal como raíces, rizomas, cortezas, leños, frutos, semillas y sumidades floridas.

Los aceites esenciales suelen encontrarse en formaciones secretoras especializadas tales como pelos glandulosos (Lamiáceas), canales secretores (Asteráceas), canales lisígenos o esquizógenos (Rutáceas), que en términos generales se localizan en la superficie del vegetal o cerca de la misma.

El papel que desempeñan los aceites esenciales en el vegetal no está totalmente esclarecido. Tan sólo existen bases experimentales con respecto a los derivados terpénicos, para los cuales está demostrado que ejercen un papel de defensa frente al ataque de bacterias y hongos, al tiempo que juegan un importante papel en el proceso reproductor del vegetal, al atraer a los insectos que actúan como agentes polinizantes.²²

Toxicidad de los aceites esenciales:

En los aceites esenciales han sido valorados experimentalmente los efectos cancerígenos presentados por algunos de sus componentes, determinados derivados del fenilpropano tales como asarona, safrol y estragol, se metabolizan sufriendo un proceso de hidroxilación, siendo los 1-hidroxiderivados los metabolitos responsables de los efectos cancerígenos, por formación de enlaces cruzados en la molécula de ADN.

La toxicidad aguda de los aceites esenciales se manifiesta fundamentalmente a nivel del sistema nervioso central SNC, aparatos

respiratorio y cardiovascular; a esto se añade que en algunos casos se puedan observar efectos teratogénicos y abortivos.

Algunos componentes de los aceites esenciales son susceptibles de atravesar la barrera placentaria y originar efectos tóxicos en el feto, tal y como ocurre con el acetato de sabinilo que proviene de la salvia española. Muchos aceites esenciales han sido considerados abortivos, destacando los de ruda, menta poleo, enebro, etc.²²

2.2.5 Métodos para la obtención de aceites esenciales:

Los métodos más frecuentemente utilizados para la obtención de los aceites esenciales son: Prensado en frío e hidrodestilación o arrastre de vapor.

Prensado en frío:

El proceso de prensado en frío para la extracción de aceite comienza con la elección de las semillas (por ejemplo, de girasol, lino, cáñamo, colza o sésamo, entre otros). Con el prensado en frío se obtiene menos aceite que con otros métodos, por eso es un proceso que solo usan pequeñas empresas especializadas. Los grandes fabricantes de aceite vegetal suelen usar disolventes y prensas de gran presión y velocidad, por lo que producen mucho más pero también generan más calor, oscureciendo el aceite y disminuyendo su aroma y su valor nutritivo.

Las semillas, con cáscara incluida, pasan por una prensa de baja presión cuya temperatura interior se mantiene por debajo de los 40°C

(de ahí el nombre de prensado en frío). El operador de la prensa debe controlar y ajustar cuidadosamente la velocidad, la presión y la temperatura. Mantener una prensa fría no es tarea fácil debido al calor que generan las semillas al ser aplastadas. El mecanismo de presión está formado por varias secciones y se puede acortar o alargar según el tipo de semillas que pasen por la prensa. Los residuos de las semillas se venderán más tarde para elaborar comida para animales. En este momento es fundamental controlar la temperatura, ya que si las semillas están demasiado calientes significa que se está acumulando calor y se debe abrir más la salida para reducir la presión en el interior. En la figura N° 02 se observa la máquina para el prensado en frío.

FIGURA N° 02

MÁQUINA PARA HACER PENSADO EN FRIO



Una vez que se ha extraído el aceite, se bombea a través de un sistema de filtración. El uso de filtros de tela permite el paso del aceite

pero impide que se cuelen restos de semillas. El aceite pasa a través de los filtros varias veces hasta que obtiene un color claro.

Para dominar el arte del prensado en frío hace falta mucha experiencia, pero el resultado es un aceite mucho más sano y con más sabor. Los aceites de prensado en frío elaborados con otras semillas plantean retos de producción diferentes. Las semillas de lino y cáñamo son extremadamente sensibles al calor, así que los operarios tienen que enfriar la prensa durante el proceso para compensar el calor que se genera durante el prensado. En cambio, la colza no es especialmente sensible al calor, ni tampoco el sésamo. Los aceites naturales y sin conservantes como estos deben manipularse con cuidado, puesto que la exposición al aire los estropea prematuramente. El plástico es translúcido, por tanto estos aceites se embotellan en vidrio oscuro ya que los aceites también son sensibles a la luz. Las botellas se sellan con un tapón dosificador. Sin conservantes, los aceites de girasol, colza y sésamo tienen una caducidad de 18 meses. Los aceites de semilla de lino y cáñamo tienen que estar refrigerados e incluso así apenas duran unos meses, pero valen la pena, porque saben mejor que los aceites elaborados al por mayor.²⁵

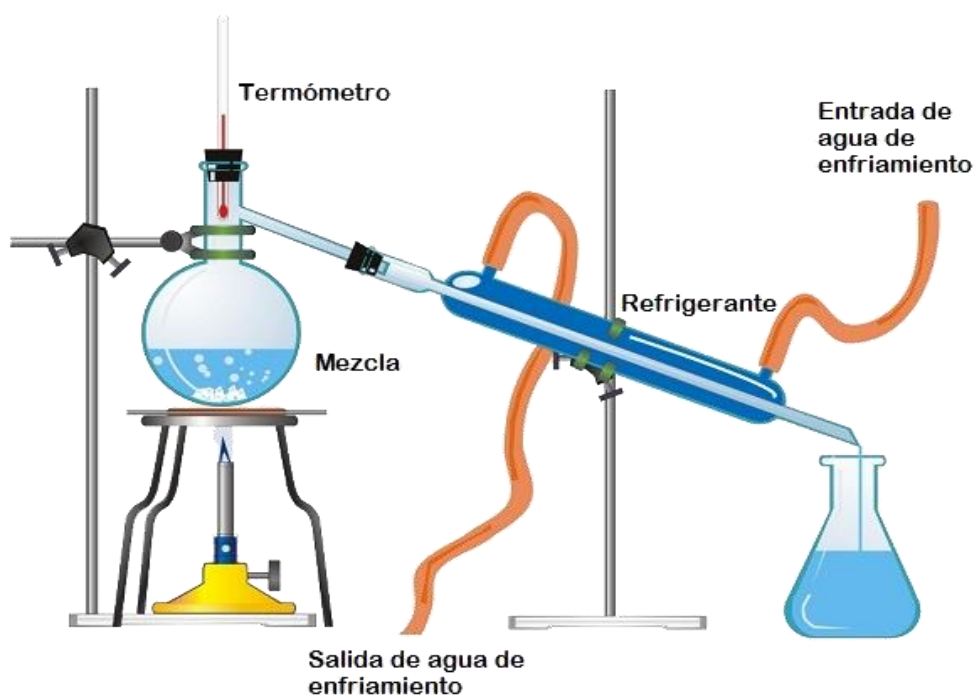
Hidrodestilación o Extracción por arrastre de vapor:

Es la forma más habitual de obtención de los aceites esenciales, basada en las propiedades de volatilidad y de ser arrastrables en corriente de vapor de agua que poseen. La materia prima vegetal

(molido, cortado, entero) es cargada de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno y próximo a su base. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia vegetal se calienta y va liberando el aceite esencial, el cual debido a su alta volatilidad se evapora y al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador mediante una prolongación curvada del conducto de salida del destilador. En el condensador, la mezcla es enfriada hasta la temperatura ambiental, a su salida, se obtiene una emulsión agua-aceite, la cual es separada en un embudo de decantación o pera de bromo debido a la diferencia de densidades.²⁶ Posteriormente se adiciona cristales de sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua. En la figura N° 03 se observa el equipo para hidrodestilación.

FIGURA N° 03

MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN



2.2.6 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales:

La diversidad de componentes dotados de actividad antimicrobiana que forman parte de los aceites esenciales, contribuye a que se muestren activos frente a bacterias patógenas variadas e incluso frente a distintos hongos y levaduras responsables de la aparición de micosis; presentando en conjunto un amplio espectro de actuación.

Se ha sugerido la posibilidad de que los aceites esenciales inhiban con más facilidad a los microorganismos Gram positivos que a los Gram negativos.

Por ejemplo los aceites esenciales de distintas especies de *Thymus* (tomillo) poseen actividad frente a Gram negativos como *Pseudomonas fluorescens*.

Existen aceites esenciales con actividad antimicrobiana comprobada, tales como los de canela, clavo, lavanda, hinojo, etc.

Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados, representados en primer lugar por los derivados fenólicos, timol y carvacrol; los cuales se unen a los grupos amino e hidroxilamino de las proteínas de la membrana bacteriana, lo que conduce a la modificación de su permeabilidad y origina la muerte de la bacteria.

Los derivados alcohólicos y cetónicos, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor, etc.; poseen igualmente propiedades antibacterianas, si bien menos marcadas que las de timol y carvacrol.²²

En la actualidad, para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos. Existen dos técnicas básicas usadas, el método de difusión en agar y el método de diluciones.

Pared celular bacteriana:

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

Pared celular de bacterias Gram negativas:

Éste grupo heterogéneo de bacterias poseen una envoltura celular compleja (tipo Gram negativa) y es debido a que presentan tres capas principales las que son:

la membrana citoplasmática,

el peptidoglicano y

la capa externa o capa L (Lipopolisacárido).

La membrana citoplasmática, rodea el citoplasma de la célula y contiene proteínas y fosfolípidos. La membrana citoplasmática sirve como una barrera de permeabilidad selectiva para las sustancias que entran o salen de la célula, también se considera el sitio donde se

produce la energía de la célula. Dentro del citoplasma celular también se encuentran los cromosomas, ribosomas y otras estructuras internas.

El peptidoglicano, es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina entrelazados; esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular, y es responsable de mantener la forma del organismo, y está localizada dentro del espacio periplásmico.

El espacio periplásmico, localizado entre la membrana externa y la membrana citoplasmática contiene proteínas periplásmicas que incluyen: proteínas de enlace para sustratos específicos, enzimas hidrolíticas y enzimas detoxificantes.

La capa externa o capa L (Lipopolisacárido), representa una segunda bicapa lipídica; sin embargo, hay que destacar que no consta solamente de fosfolípidos como la membrana citoplasmática, sino que contiene polisacáridos y proteínas, lo que justifica su nombre. También sirve como una barrera de permeabilidad de la célula, ya que ayuda a retener proteínas en el espacio periplasmático.

Contiene proteínas embebidas, llamadas porinas, estos canales llenos de agua facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos.

Los polisacáridos; localizados en la superficie de la célula, son los componentes esenciales de las endotoxinas (estos contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad), y son la causa de la carga neta de las bacterias Gram negativas.

Pared celular de bacterias Gram positivas:

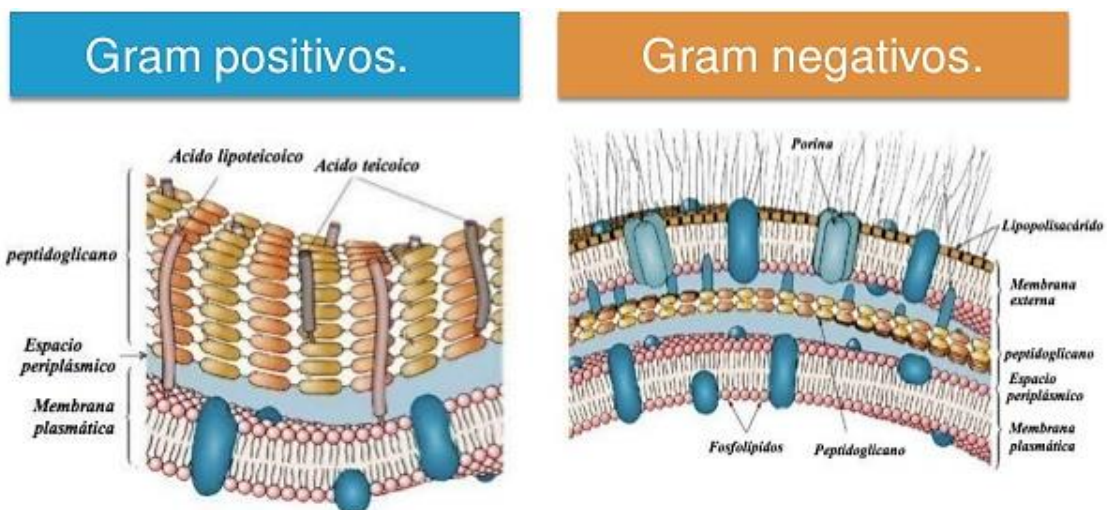
Las bacterias Gram positivas presentan paredes celulares menos complejas debido a que únicamente contienen dos capas: membrana citoplasmática y capa de péptidoglicano.

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

La capa de peptidoglicano, es mucho más gruesa que en las bacterias Gram negativas, y es la responsable de mantener la forma de los microorganismo por lo que se conoce como la pared celular. Dentro de la capa de mureína se encuentran los ácidos teicoicos, que son polímeros que están entrelazados en la capa de péptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células Gram positivas. Estos son también antígenos importantes de superficie en aquellos organismos que los poseen. La diferencia estructural entre bacterias G positivas y negativas se observa en la figura N° 04

FIGURA N° 04

DIFERENCIA ESTRUCTURAL ENTRE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS



2.2.7 **Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales:**

La mayoría de los métodos *in vitro* consisten en añadir un volumen conocido del aceite esencial diluido (principalmente en etanol o metanol) o no, directamente en un tubo o en una placa petri que contenga el medio adecuado para el microorganismo en prueba, o bien tener el medio estéril y después inocular el microorganismo de interés.²⁶

El problema de utilizar un método u otro es la dificultad para comparar los resultados de diferentes investigaciones, lo cual, a menudo hace difícil determinar el éxito potencial de los aceites esenciales como agentes antibacterianos.

Debido a la insolubilidad en agua y volatilidad de los aceites esenciales, su evaluación es compleja, ya que sus propiedades pueden reducir la capacidad de dilución o causar separación de fases en los medios en los que se requiere evaluar.²⁷

La efectividad de cada método puede ser afectada por diferentes factores tales como el origen del aceite esencial, el volumen del inóculo, la fase de crecimiento del microorganismo, el medio de cultivo utilizado, el tiempo de incubación, la temperatura entre otros factores.²⁸

A continuación se describen los métodos mayormente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Dilución en agar:

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el aceite esencial es letal contra un microorganismo,

además se usa con microorganismos aeróbicos o microaerofílicos con una velocidad variable de crecimiento.

Para esta técnica, se preparan diferentes diluciones de los aceites esenciales; posteriormente, las diluciones se añaden a los agares y estos son puestos en placas Petri para su solidificación.

Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (de 16-24 horas).

Entre las principales ventajas se incluyen la posibilidad de evaluar muchos microorganismos a la vez, la facilidad para detectar contaminación y el hecho de que el agar puede contener materiales opacos sin afectar los resultados, a diferencia de otros métodos que evalúan mediante turbidez o lectura de absorbancia.^{26, 27}

Dilución y micro-dilución en caldo:

El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de aceite esencial diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas.

El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (cuando se utilizan tubos con un volumen total de 1-10 ml) o de microdilución (si se realiza en placas de pocillos usando un máximo de 500 µl por pocillo). Posterior a la incubación (16-24 horas dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo.^{26, 27, 29}

Difusión en agar (Prueba de susceptibilidad antimicrobiana):

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar in vitro la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias fastidiosas patógenas.

El método estandarizado es el de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS está basado en el método originalmente descrito por Bauer et al. (Método de Kirby Bauer).

Para este método se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.³⁰

Fundamento:

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C.

Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio.

El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).³¹

Grupos de antimicrobianos aprobados por la FDA para el ensayo e informe selectivo y de rutina:

Los agentes del **Grupo A** se consideran apropiados para ensayar e informar en las pruebas de rutina para cada grupo de microorganismos.

El **Grupo B** comprende agentes que son de importancia clínica particularmente para infecciones hospitalarias y se deberán incluir en el panel primario.

Sin embargo, ellos se deben de informar selectivamente en el caso en que el microorganismo en estudio sea resistente a los agentes de la misma familia de Grupo A.

Otro ejemplo en donde se debe informar la sensibilidad a los agentes de este grupo, sería cuando el foco de infección lo justifique (por ejemplo: trimetoprima-sulfametoxazol para aislamientos del tracto urinario o una cefalosporina de tercera generación para bacilos Gram negativos entéricos aislados de líquido cefalorraquídeo).

También se deberán informar en caso de infecciones polimicrobianas, infecciones que involucren múltiples sitios del organismo, alergia, intolerancia o falla de respuesta a los antibióticos del Grupo A o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El **Grupo C**: Está compuesto por agentes antimicrobianos alternativos o suplementarios que se deben de probar en el caso de instituciones donde se aíslan cepas endémicas o epidémicas resistentes a varias de las drogas primarias (especialmente en la misma familia, por ejemplo β -lactámicos o aminoglucósidos), para el tratamiento de pacientes alérgicos a las drogas primarias, así como también para el tratamiento de microorganismos inusuales (por ejemplo: cloranfenicol para aislamientos extraintestinales de *Salmonella sp.*) o como ayuda epidemiológica en el control de infecciones.

El **Grupo U** (“Orina”), enumera ciertos antimicrobianos, cuyo uso se limita a las infecciones del tracto urinario (p. ej. nitrofurantoina y ciertas quinolonas).

Estos agentes no se deben informar en caso de infecciones que se encuentren en otra localización que no sea la vía urinaria.

En este grupo se pueden incluir otras drogas con indicaciones más amplias para algunos patógenos urinarios específicos (Ej. *P. aeruginosa* y ofloxacina).³²

En la Tabla N° 01 se presentan los criterios para la interpretación del método Kirby Bauer según el NCCLS.

TABLA N° 01

INTERPRETACIÓN DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER

Agente antimicrobiano	Contenido del Disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
BETALACTÁMICOS, PENICILINAS				
Ampicilina <i>Enterobacteriaceae</i>	10 µg	13	14-16	17
Ampicilina Estafilococos	10 µg	28	---	29
Ampicilina Enterococos	10 µg	16	---	17
Ampicilina Estreptococos β hemolíticos	10 µg	18	19-25	26
Mezlocilina <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75 µg	15	---	16
Mezlocilina <i>Enterobacteriaceae</i>	75 µg	17	18-20	21
Oxacilina Estafilococos	1 µg	10	11-12	13
Penicilina G Estafilococos	10 U	28	---	29
Penicilina Enterococos	10 U	14	---	15
Penicilina Estreptococos β hemolíticos	10 U	19	20-27	28
COMBIN. CON INHIBIDORES B-LACTAMASA				
Amoxicilina / Acido Clavulánico Estafilococos	20/10 µg	19	---	20
Amoxicilina / <i>Enterobacteriaceae</i>	20/10 µg	13	14-17	18
Ampicilina / Sulbactama	10/10 µg	11	12-14	15
Piperacilina / <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100/10 µg	17	---	18
Piperacilina / Esfafilococos meticilina S	100/10 µg	17	---	18
AMINOGLUCÓSIDOS				
Amikacina	30 µg	14	15-16	17
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Kanamicina	30 µg	13	14-17	18
Netilmicina	30 µg	12	13-14	15

Fuente: Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards).

Reactivos para la prueba de difusión por disco:

Agar Mueller Hinton:

El agar Mueller Hinton se considera el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina por las siguientes razones:

- Demuestra buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad.
- Tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina.
- Es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen muchos datos y experiencia recopilados que avalan las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Discos de Antimicrobianos:

Información de los Discos:

Los discos se deben adquirir a proveedores confiables y se debe solicitar un certificado de análisis que garantice la carga de los discos, el número de lote y que son aptos de acuerdo a los parámetros establecidos para los distintos microorganismos recomendados para el control de calidad.³²

Almacenamiento de los discos de antibióticos:

Los envases comerciales están generalmente diseñados para proteger de la humedad a los discos de papel para pruebas de sensibilidad.³²

Los discos de antibióticos se deberán almacenar de la siguiente manera:

- Mantenerlos refrigerados a 8°C o a una temperatura de -14°C o menos. Los discos que contienen drogas de la familia de antibióticos β -lactámicos deben mantenerse congelados para mantener su potencia, dejando en la heladera (no más de una semana) sólo el envase que está siendo utilizado en las pruebas de sensibilidad de rutina. Las drogas más inestables (Ejm. imipenem, cefaclor, combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas) se deben mantener congelados hasta el día de uso.
- Los cartuchos herméticos de discos se deben sacar del refrigerador o freezer 1 ó 2 horas antes a fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos. Este proceso minimiza la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos.
- Una vez que se abrió un cartucho, se debe colocar en un contenedor hermético que contenga una sustancia desecante apropiada. Cuando se utilizan dispensadores de discos se deben mantener cerrados con una cubierta hermética con el desecante apropiado. Los dispensadores deben alcanzar la temperatura ambiente antes de abrirse. Cuando el indicador del desecador usado cambia de color se debe interpretar como un exceso de humedad y se debe reemplazar el desecador.
- Los dispensadores que contienen los discos deben mantenerse refrigerados.

- Use solo los discos que no han alcanzado la fecha de vencimiento indicada por sus fabricantes.

Turbidez estándar para la preparación del inóculo:

Para estandarizar la densidad del inóculo se utiliza el tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (1 a 2×10^8 UFC/ml).³³

Preparación del inóculo:

Método directo de inoculación a partir de colonia aislada:

Es el método más conveniente para la preparación del inóculo. Se puede usar para la mayoría de los microorganismos y es el método recomendado para microorganismos fastidiosos como *Haemophilus spp*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp* potencialmente meticilino resistentes.³²

2.3 Definición de Términos Básicos:

- ❖ **Acre:** Penetrante o picante, amargo y desagradable para el olfato o para el gusto.
- ❖ **Amastigote:** Es la fase esférica con un flagelo tan corto que a veces ni sale. Es la forma de la fase definitiva de Leishmania.
- ❖ **Antígeno:** Sustancia generalmente proteica que da lugar a la síntesis de un anticuerpo y reacciona específicamente con el mismo.
- ❖ **Biocidas:** Son sustancias químicas, sintéticas, de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de cualquier organismo considerado nocivo para el hombre. Éstos actúan a nivel de la membrana

celular del microorganismo, penetrándola y destruyendo los sistemas que le permiten vivir.

- ❖ **Caustico:** Que ejerce un efecto quemante o corrosivo.
- ❖ **Concentración mínima bactericida:** Es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.
- ❖ **Concentración mínima inhibitoria:** Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.
- ❖ **Cromatografía de gases:** Es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC).
- ❖ **Cepa:** Subgrupo taxonómico de una especie. Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.
- ❖ **Colagogos:** Fármacos que estimula el flujo de bilis.
- ❖ **Espectrometría de Masas:** Es una técnica de análisis que permite la medición de moléculas. Está basada en la obtención de iones a partir de

moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

- ❖ **Esqueje:** Fragmento de raíz, tallo u hoja capaz de reproducir asexualmente toda la planta.
- ❖ **Factores edáficos:** Son las características físicoquímicas que interactúan entre sí para conferirle al suelo sus propiedades. Estos factores influyen decisivamente sobre el uso posterior que se haga sobre la tierra, así como sobre las necesidades de manejo que haya que implementar.
- ❖ **Micotoxinas:** Venenos producidos por hongos dañinos para otros organismos.
- ❖ **Monoterpenos:** Consisten en 2 unidades isopreno y tienen la fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. El alcohol monoterpénico es también conocido como geraniol, el prefijo geranil indica 2 unidades isopreno.
- ❖ **Mureina:** Peptidoglicano propio de las bacterias. Es un heteropolímero formado por una secuencia alternante de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetilmuránico unido mediante enlaces β -1,4. La cadena es recta y no ramificada, constituyendo la estructura básica de la pared celular.
- ❖ **Oleoresina:** Cualquiera de las combinaciones naturales de la resina y un aceite volátil, como la que proviene de los pinos y otros vegetales.
- ❖ **Parénquima:** Tejido funcional o células de un órgano o glándula a diferencia de las que forman el tejido de sostén o conectivo.

- ❖ **Piperáceas:** Son una familia de Angiospermas del orden Piperales. Constan de 13 géneros y unas 1919 especies, que se distribuyen por las regiones tropicales del planeta.
- ❖ **Reumatismo:** Cualquiera de un gran número de proceso inflamatorios de las bolsas, articulaciones, ligamentos o músculos; caracterizados por dolor, limitación de los movimientos y degeneración estructural de partes aisladas o múltiples del sistema músculo esqueléticos.
- ❖ **Síncope:** Breve pérdida de consciencia provocada por una hipoxia cerebral transitoria. Puede deberse a múltiples factores diferentes como: estrés emocional, estimulación vagal, acumulación de sangre en las piernas, etc.
- ❖ **Tisanas:** Infusión o bebida ligera, parecida al té, de una hierba comestible que se consume por su supuesto efecto medicinal.
- ❖ **Tricomas glandulares:** Este tipo tricomas secretan algunas sustancias entre las cuales pueden estar sales, azúcares, alcaloides, terpenos, etc.
- ❖ **Escala de Mc. Farland:** Es el estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.
- ❖ **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferido a un medio de cultivo.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de Investigación:

3.1.1 Método:

- Científico: Porque se seguirán todos los pasos que exige dicho método.
- Inductivo-deductivo: Porque se analizaron varias investigaciones, se partió de datos generales para obtener datos específicos y conclusiones sobre el tema desarrollado.
- Descriptivo: Porque se realizó un proceso metódico, sistemático, controlado y empírico.
- Explicativo: Porque se estudió la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre las cepas de microorganismos que frecuentemente contaminan los alimentos.
- Transversal: Porque se trabajó en un periodo corto de tiempo (junio-octubre).

3.1.2 Técnica:

Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Aloysia triphylla* Cedrón. La técnica de extracción del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón fue la hidrodestilación o arrastre de vapor.

La técnica utilizada para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón fue el método de difusión en agar (método Kirby Bauer). Se utilizaron cepas Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 6539 y Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 15008 y *Bacillus cereus* ATCC

11778. Se realizó por cuadruplicado para cada una de las cepas estudiadas.

3.1.3 Diseño:

Es experimental, porque se realizó la marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Aloysia triphylla* Cedrón, se extrajo el aceite esencial del Cedrón y se determinó su actividad antibacteriana.

3.2 Población y Muestreo de la Investigación:

3.2.1 Población:

Parte aérea de *Aloysia triphylla* Cedrón proveniente del distrito de Corongo (3141 msnm), provincia de Corongo, región Ancash.

3.2.2 Muestra:

15 ml de aceite esencial obtenido de la parte aérea de 5 Kg de *Aloysia triphylla* Cedrón proveniente del distrito de Corongo (3141 msnm), provincia de Corongo, región Ancash.

3.3 Variables e Indicadores:

VARIABLE INDEPENDIENTE (X)	INDICADORES
<i>Aloysia triphylla</i> Cedrón	Metabolitos primarios y secundarios.

VARIABLE DEPENDIENTE (Y)	INDICADORES
Aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón	Actividad antibacteriana. Tamaño del halo de inhibición.

3.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos:

3.4.1 Técnicas e Instrumentos:

Ficha de recolección de datos experimentales. (ANEXO N° 03)

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados:

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón estudiado en el trabajo de investigación presentó las características organolépticas mostradas en el CUADRO N° 04.

CUADRO N° 04

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Color	Amarillo intenso
Sabor	Picante, aromático
Consistencia	Fluida
Olor	Penetrante, característico del cedrón

Fuente: Elaboración propia

La marcha de solubilidad del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón mostró que fue insoluble en Cloroformo y Ciclohexano, mientras que fue soluble en Benzaldehído y Etanol 96°, como se observa en el Cuadro N° 05

CUADRO N° 05

SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

SOLVENTE	RESULTADOS
Cloroformo	Insoluble
Ciclohexano	Insoluble
Benzaldehído	Soluble
Etanol 96°	Soluble

Fuente: Elaboración propia

En la marcha fitoquímica realizada al extracto etanólico de la parte aérea de *Aloysia triphylla* Cedrón se determinó que contiene carbohidratos, compuestos fenólicos como taninos, flavonoides y naftoantraquinonas, trazas de alcaloides, como se muestra en el Cuadro N° 06.

CUADRO N° 06

MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Aloysia triphylla*
CEDRÓN

METABOLITOS	REACTIVOS	RESULTADOS
Carbohidratos	Molish	++
	Antrona 2%	++
Azúcares reductores	Fehling	-
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	++
Taninos	Gelatina	++
Flavonoides	Shinoda	+++
Naftoantraquinonas	Bortranger	+
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+

Leyenda:

Ausencia	(-)
Escasa cantidad	(+)
Moderada cantidad	(++)
Abundante cantidad	(+++)

Fuente: Elaboración propia

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón se realizó según el método de Kirby Bauer, para la interpretación de los resultados se utilizó las tablas publicadas por el NCCLS.

Los halos de inhibición para *S. aureus* fueron: para 5 µl 11mm, para 10 µl 14 mm, para 15 µl 13 mm y para 20 µl 23 mm. Para *B. cereus* se observó inhibición total del desarrollo bacteriano para todos los volúmenes utilizados. Para *E. coli* fueron: para 5 µl 8 mm, para 10 µl 13 mm, para 15 µl 15 mm y para 20 µl 17 mm y para *Salmonella typhi* fueron: para 5 µl 8 mm, para 10 µl 11 mm, para 15 µl 13 mm y para 20 µl 15 mm, como se muestra en la Tabla N° 02.

TABLA N° 02

RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

Aceite esencial (µl)	5	10	15	20	ATB
	\bar{X}				
	Diámetro de Halos de inhibición (mm)				
Cepas Gram negativas					Amikacina 30 µg
<i>Escherichia coli</i>	8 R	13 R	15 I	17 S	21
<i>Salmonella typhi</i>	8 R	11 R	13 R	15 I	16
Cepas Gram positivas					Amox. + Ác.clav. 20/10 µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 R	13 R	14 R	23 S	21
<i>Bacillus cereus</i>	I.T.	I.T.	I.T.	I.T.	I.T.

Leyenda:

\bar{X} : Tamaño promedio en mm

I.T. : Inhibición Total (No presentó desarrollo bacteriano)

R : Resistente ≤ 19

I : Intermedio 19.1-19.9

S : Sensible ≥ 20

Amox. + Ác.clav. (20/10 µg)

R : Resistente ≤ 14

I : Intermedio 15-16

S : Sensible ≥ 17

Fuente: Elaboración propia

DISCUSIÓN

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón, posee características organolépticas similares a otros aceites esenciales, ya que es líquido a temperatura ambiente, genera un aroma agradable y perceptible al ser humano, es volátil, posee un color amarillo intenso, sabor ligeramente picante y aromático, olor agradable característico del mismo.

La marcha fitoquímica realizada al extracto etanólico de *Aloysia triphylla* Cedrón, mostró presencia de flavonoides, carbohidratos, taninos, trazas de alcaloides y naftoantraquinonas. Estos metabolitos serían los responsables de las propiedades medicinales de dicha planta.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón se determinó según el método de Kirby Bauer, para la interpretación de los resultados se utilizó las tablas publicadas por el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (NCCLS).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón mostraron que a volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ l del aceite *Escherichia coli* presentó halos de inhibición de 8, 13, 15 y 17 mm respectivamente, considerándose según las tablas del Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (NCCLS) resistente los dos primeros, medianamente sensible el tercero y sensible el último.

Estos resultados son semejantes a lo reportado en el trabajo realizado por Claudia Sánchez Jaramillo y col. que hallaron que a volúmenes de 10, 15 y

20 µl del aceite, *Escherichia coli* presentó halos de inhibición de 8, 11 y 8 mm respectivamente.

Para *Salmonella typhi*, en la presente investigación se observó que a volúmenes de 5, 10, 15 y 20 µl de aceite presentó halos de inhibición de 8, 11, 13 y 15 mm respectivamente, considerándose según las tablas del Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (NCCLS) resistente. Estos resultados coinciden con lo reportado en el trabajo de investigación de Claudia Sánchez Jaramillo y col. que observó que no había inhibición del desarrollo bacteriano.

Para *Staphylococcus aureus* a volúmenes de 5, 10 y 15 µl en la presente investigación se observó una mayor resistencia con halos de inhibición de crecimiento bacteriano de 11, 14 y 13 mm, mientras que a volumen de 20 µl presentó mayor sensibilidad con un halo de inhibición de 23 mm. Estos resultados coinciden con los reportados por Patricia Aliaga Mamani en el año 2013 que demostró que a volúmenes menores de 15 µl del aceite esencial presentaba una mayor resistencia y a volúmenes mayores de 20 µl una mayor sensibilidad. Mientras que en el estudio realizado en el año 2013 por Claudia Sánchez Jaramillo y colaboradores hallaron que a volúmenes menores de 20 µl del aceite esencial presentaron resistencia.

En la presente investigación se observó inhibición total del desarrollo microbiano a partir de 5 µl del aceite esencial para *Bacillus cereus*, por lo tanto presentó sensibilidad, lo que coincide con lo reportado en el trabajo de investigación de Claudia Sánchez Jaramillo y col. que también hallaron que a

volúmenes mayores de 10 µl presentaba inhibición total y por lo tanto sensibilidad al aceite esencial.

Cabe destacar también los resultados obtenidos por María de las M. Oliva, Emilia Beltramino, Nicolás Gallucci, Carina Casero, Julio Zygodlo y Mirta Demo en la investigación titulada “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF *Aloysia triphylla* (L`Her.) BRITTON FROM DIFFERENT REGIONS OF ARGENTINA”, dichos investigadores observaron que las levaduras eran los microorganismos más sensibles, seguidos por las bacterias Gram positivas; esto coincide con lo hallado en la presente investigación puesto que se observó que el desarrollo de *Bacillus cereus* fue inhibido totalmente a partir de 5 µl del aceite esencial. En el caso de *Staphylococcus aureus* se observó que presentó halos de inhibición del crecimiento de 11, 13, 14 y 23 mm frente a 20 µl del aceite esencial.

En la investigación titulada “COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* (L`Hér.) BRITTON CONTRA PATÓGENOS GENITO-URINARIOS” realizada por Luis B. Rojas, Judith Velasco, Tulia Díaz, Ricardo Gil Otaiza, Juan Carmona, Alfredo Usubillaga; reportaron que el desarrollo de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron inhibidos por el aceite esencial del Cedrón. Estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, ya que *Escherichia coli* presentó halos de inhibición de 8, 13, 15 y 17 mm; mientras que *Staphylococcus aureus* presentó halos de inhibición de 11, 13, 14 y 23 mm.

TABLA N° 03

RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

VOLÚMENES EN μ l	5	10	15	20	
Cepas Gram negativas Amikacina 30 μg	HALOS DE INHIBICIÓN EN MM				FUENTES
<i>Escherichia coli</i>	21.33	44.41	I.T.	I.T.	TESIS DE ALIAGA MAMANI
	N.R.	8	11	8	TESIS SANCHEZ JARAMILLO
	8	13	15	17	TESIS MAMANI CURAZI
<i>Salmonella typhi</i>	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	TESIS DE ALIAGA MAMANI
	N.R.	N.I.	6	N.I.	TESIS SANCHEZ JARAMILLO
	8	11	13	15	TESIS MAMANI CURAZI
Cepas Gram positivas Amox. + Ác.clav. 20/10 μg	HALOS DE INHIBICIÓN EN MM				FUENTES
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.62	10.77	13.73	53.86	TESIS DE ALIAGA MAMANI
	N.R.	9	12	10	TESIS SANCHEZ JARAMILLO
	11	13	14	23	TESIS MAMANI CURAZI
<i>Bacillus cereus</i>	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	TESIS DE ALIAGA MAMANI
	N.R.	I.T.	I.T.	I.T.	TESIS SANCHEZ JARAMILLO
	I. T.	I.T.	I.T.	I.T.	TESIS MAMANI CURAZI

Leyenda:

- I.T. : Inhibición Total (No presentó desarrollo bacteriano)
 N.R. : No Realizado
 N. I. : No Inhibición

Fuente: Elaboración propia

El mecanismo de acción del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón se fundamenta en la destrucción de la pared celular y la membrana citoplasmática, lo que llevaría al rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma. Los derivados fenólicos se unen a los grupos amino e hidroxilamino de las proteínas de la membrana bacteriana, lo que conduce a la modificación de su permeabilidad y origina la muerte de la bacteria.⁵

El aceite esencial también inhibe la síntesis de ADN y ARN, proteínas y polisacáridos de las bacterias. Esta actividad biológica se debería a la presencia de fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes.⁵

CONCLUSIONES

Al finalizar la presente investigación sobre la “Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón)” sobre algunos microorganismos patógenos se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1) El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Escherichia coli* con halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 8, 13, 15 y 17 mm para volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ l respectivamente.
- 2) El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Salmonella typhi* con halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 8, 11, 13 y 15 mm para volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ l respectivamente.
- 3) El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 11, 13, 14 y 23 mm para volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ l respectivamente.
- 4) El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de *Bacillus cereus* con inhibición total del desarrollo bacteriano para volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ l.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más pruebas experimentales *in vitro* de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón, frente a otros microorganismos de importancia clínica y alimentaria.

Se debe realizar el proceso de recolección de la muestra de la planta de Cedrón tomando en cuenta dos aspectos: el lugar de crecimiento y el periodo fenológico, debido a que estos factores influyen directamente en la concentración de los metabolitos y la composición química de su aceite esencial.

Continuar desarrollando trabajos de investigación sobre el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Cedrón obtenidos de plantas de diferentes regiones del país para comparar su efecto antimicrobiano y el porcentaje de rendimiento.

Estos trabajos de investigación podrían servir de sustento para la elaboración de fitofármacos elaborados con el aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón).

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Schelz, Z.; Molnar, J.; Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. 2006. *Fitoterapia* 77:279–285.
2. Teixeira Duarte, M.C.; Leme, E.E.; Delarmelina C.; Soares A.A.; Figueira, G.M. y Sartoratto, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. 2007. *J. Ethnopharm.* 11: 197–201.
3. Stashenko, E.E.; Díaz, O.L.; Duran G, D.C.; Martínez, J.R. Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* L'Her Britton cultivada en diferentes regiones de Colombia. 2007. *Scientia et Technica* Año XIII, N° 33.
4. Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E. y Martínez, J.R. Comparacion de la composición química y de la actividad antioxidante In Vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Vervenaceae. *Rev. Academia colombiana de ciencias.* 2003. Vol. 27 N° 105.
5. Aliaga Mamani, Patricia Alexandra. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* “Cedrón” frente a *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923. Tesis de grado N° 196. Tacna: Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2013.
6. Rojas, Juan; Palacios, Olga; Ronceros, Sergio; *Revista Perú Médica Experimental.* EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* BRITTON (CEDRÓN) SOBRE EL *Trypanosoma cruzi* EN RATONES. 2012; 29(1): 61-68. <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v29n1/a09v29n1.pdf>. (último acceso 12 de junio de 2015).
7. Sánchez Jaramillo, Claudia Yaneth; Bedoya Pérez, Juan Carlos; Acosta Zamora, Edison Andrés. Estudio del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial

- de *Aloysia triphylla* sobre cepas *S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Grupo de Investigación en Biociencias 2013. <http://aiquruguay.org/congreso/download/TL18.pdf>. (último acceso 12 de junio de 2015).
8. Oliva, María de las M.; Beltramino, Emilia; Gallucci, Nicolás; Casero, Carina; Zygadlo, Julio y Demo, Mirta. Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L`Her.) Britton from different regions of Argentina". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Enero del 2010; vol. 9, núm. 1, pp. 29-37. <http://www.redalyc.org/pdf/856/85612108005.pdf> (último acceso 12 de junio de 2015).
 9. Rojas, Luis B.; Velasco, Judith; Díaz, Tulia; Otaiza, Ricardo Gil; Carmona, Juan; Usubillaga, Alfredo. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinarios. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Enero del 2010; vol. 9, núm. 1, pp. 56-62. <http://www.redalyc.org/pdf/856/85612108007.pdf> (último acceso 15 de julio de 2015).
 10. Stashenko, E.; Combariza, J. y Puertas, M. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Cromatografía, UIS. 1998. 30 p.
 11. Muñoz, L. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. 4ta Ed. Madrid-España. Ed. Mundi-Prensa; 2002.
 12. Pomilio, A.; Seldes, A.; Burton, G. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografías OEA. Washington, D.C, 1985, 54 (30); 1985.
 13. Cordero, Luis. Enumeración botánica de las principales plantas, así útiles como nocivas, indígenas o aclimatadas, que se dan en las provincias del Azuay y

- Cañar de la república del Ecuador. Madrid, AFRODISIO AGUADO, S. A., pp. 12-15, 23, 134, 136, 162-164; 1950.
14. Quezada, Alberto *et al.* La práctica médica tradicional. Cuenca, Publicaciones del IDICSA. pp. 390-392, 420-422; 1992.
15. Della, María. El gran libro de las hierbas. España, Editorial Planeta, S. A. pg. 145; 2003
16. Vargas, A. y Bottia, E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia; 2008.
17. Ijima, Y.; Wang, G.; Friedman, E. P. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Arch. Biochem Biophys*; 2006.
18. Masuda, H.; Ueno, T. y Muranishi, S. Inhibition of citral deterioration. ACS Symp. Ser. Free radicals in Food Chemistry, Nutrition and Health Effects, 807; 2002.
19. Rodríguez, C. J; Fuentes, L.; Pardo, R. Z. Estabilidad de extractos fluidos al 70% de *Cymbopogon citratus*. *Rev. Cub. Plant. Med*; 2003.
20. Cano C. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis para optar el Grado de Magister. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; 2007.
21. Díaz, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en tres regiones de Colombia. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia; 2007.
22. Villar del Fresno, Ángel M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis S.A. Impreso en España – Madrid; 1999.

23. Albarracín, G. y Gallo, S. Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia; 2003.
24. Cerpa, M. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Universidad de Valladolid; 2007.
25. López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R. y Nerín, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(17): 6939-6946.
26. Reyes-Jurado, F.; Palou, E. y López-Malo, A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. México. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(1): pg. 68–78. 2014. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf> (último acceso 16 de julio de 2015).
27. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94(3): 223–253.
28. Wiegand, I.; Hilpert, K. y Hancock, R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (mic) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008; 3(2): 163-175.
29. Prensado en frío.
http://www.plantasaceiteras.com/prensado_en_frio_extraccion_aceite.html
(último acceso 01 de agosto de 2015).
30. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.
http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_suscep.pdf. (último acceso 03 de agosto de 2015).

31. Pedrique de Aulacio, Magaly. Trabajo Práctico N° 3: Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Antibiograma). LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. Febrero 2002.
- http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf (último acceso 03 de agosto de 2015).
32. Servicio Antimicrobianos - INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión. 2012.
- <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION 2012.pdf> (último acceso 03 de agosto de 2015).
33. Manual de Procedimientos y Control de Calidad. 2001.
- http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Level/ManualProcedimientos_controldeCalidad_2001.pdf (último acceso 03 de agosto de 2015).
34. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN. Lima-Perú. Serie de Normas Técnicas N° 30. 2012. http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf (último acceso 05 de septiembre de 2015).
35. Diccionario MOSBY POCKET de medicina, enfermería y ciencias de la salud. 4ta edición. Impreso en Madrid-España; 2006.
36. Diccionario de la LENGUA ESPAÑOLA. EDITORIAL GRUPO OCÉANO S.A. Impreso en Barcelona-España. 1997.

ANEXOS

ANEXO N° 01

MATRIZ DE CONSISTENCIA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	VARIABLES
<u>Problema Principal</u>	<u>Objetivo General</u>	<u>Hipótesis General</u>			<u>Variable (X) Independiente</u>
¿Qué actividad presenta el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i> .	El aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón presenta actividad antibacteriana sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i> .	<u>Tipo de Investigación:</u>	<u>Método de Investigación:</u>	<i>Aloysia triphylla</i> Cedrón Indicadores: Metabolitos primarios y secundarios
<u>Problemas Secundarios</u>	<u>Objetivos Específicos</u>	<u>Hipótesis Secundarias</u>	Observacional Descriptiva	Científico Inductivo-deductivo	<u>Variable (Y) Dependiente</u>
1) ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ? 2) ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> ? 3) ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ? 4) ¿Qué actividad tiene el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Bacillus cereus</i> ?	1) Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> . 2) Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> . 3) Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . 4) Comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón sobre cepas de <i>Bacillus cereus</i> .	1) El aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> . 2) El aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> . 3) El aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> . 4) El aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón posee actividad antibacteriana sobre cepas de <i>Bacillus cereus</i> .	<u>Nivel de Investigación:</u>	<u>Diseño de Investigación:</u>	Aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> Cedrón Indicadores: Actividad antibacteriana Tamaño del halo de inhibición

ANEXO N° 02

FIGURA N° 05

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la muestra botánica conocida como "CEDRON" proporcionada por Bach. MAMANI CURAZI EDWIN DANIEL, Tesista de la Universidad Alas Peruanas, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Aloysia triphylla* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: PLANTAE
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Verbenaceae
Género: *Aloysia*
Especie: *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton

Se expide la presente certificación a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Lima, 20 octubre 2015

Blgo. Hamilton Beltrán

Hamilton W. Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
C.B.P. 2719

ANEXO N° 03

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES

16 placas petri con Agar Müeller Hinton, cada uno con 4 discos de papel Whatman N° 40 embebidos con aceite esencial de *Aloysia triphylla* (Cedrón) de 5 µl, 10 µl, 15 µl y 20 µl, como control positivo discos de antibióticos (Amikacina y Amoxicilina + Ácido Clavulánico).

La medición de los halos de inhibición es milímetros (mm).

Cepas		Placas petri	Volúmenes				Disco de ATB
			1 (5 µl)	2 (10 µl)	3 (15 µl)	4 (20 µl)	5
<i>Escherichia coli</i>	(Amikacina 30 µg)	1					
		2					
		3					
		4					
<i>Salmonella typhi</i>		5					
		6					
		7					
		8					
<i>Staphylococcus aureus</i>	(Amoxicilina + Ácido Clavulánico 20/10 µg)	9					
		10					
		11					
		12					
<i>Bacillus cereus</i>		13					
		14					
		15					
		16					

ANEXO N° 04

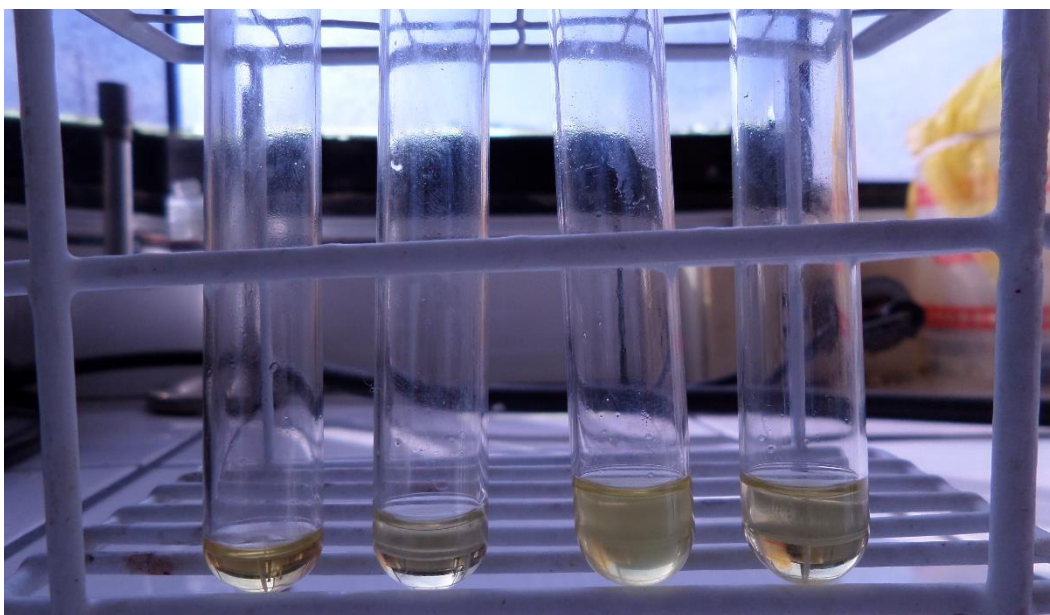
FIGURA N° 06

MARCHA FITOQUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN



FIGURA N° 07

**MARCHA DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla*
CEDRÓN**



ANEXO N° 05

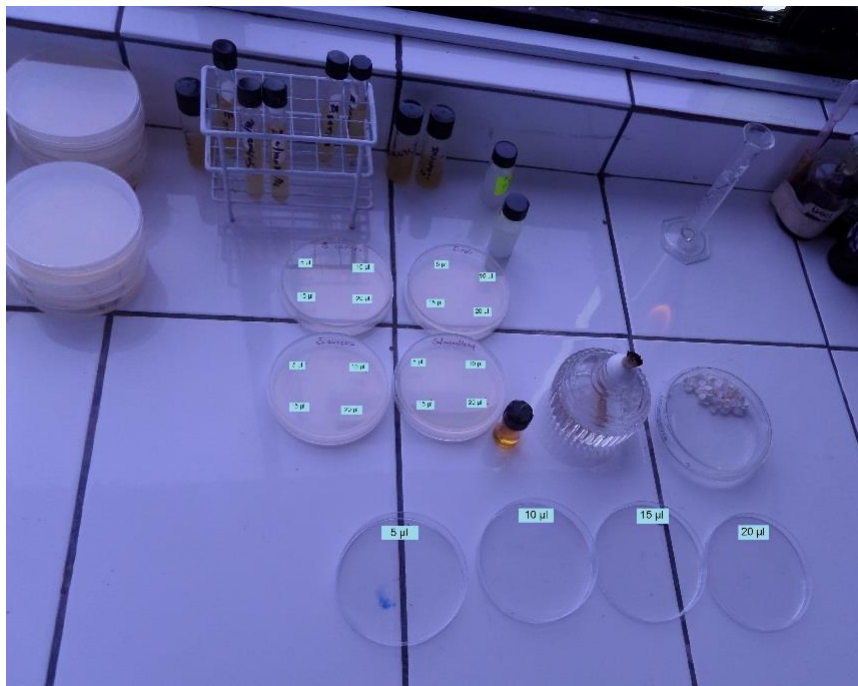
FIGURA N° 08

ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* CEDRÓN



FIGURA N° 09

MESA DE TRABAJO



ANEXO N° 06

FIGURA N° 10

PLACAS PETRI CON LAS CEPAS BACTERIANAS

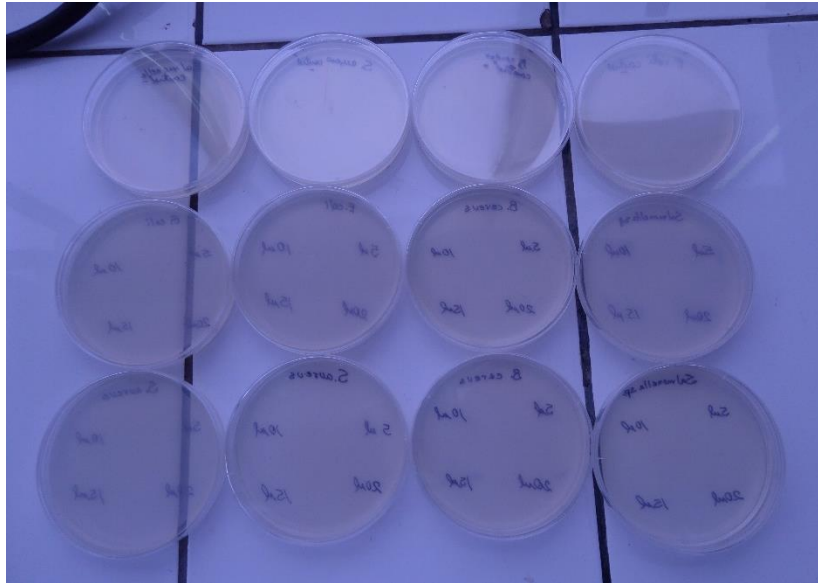


FIGURA N° 11

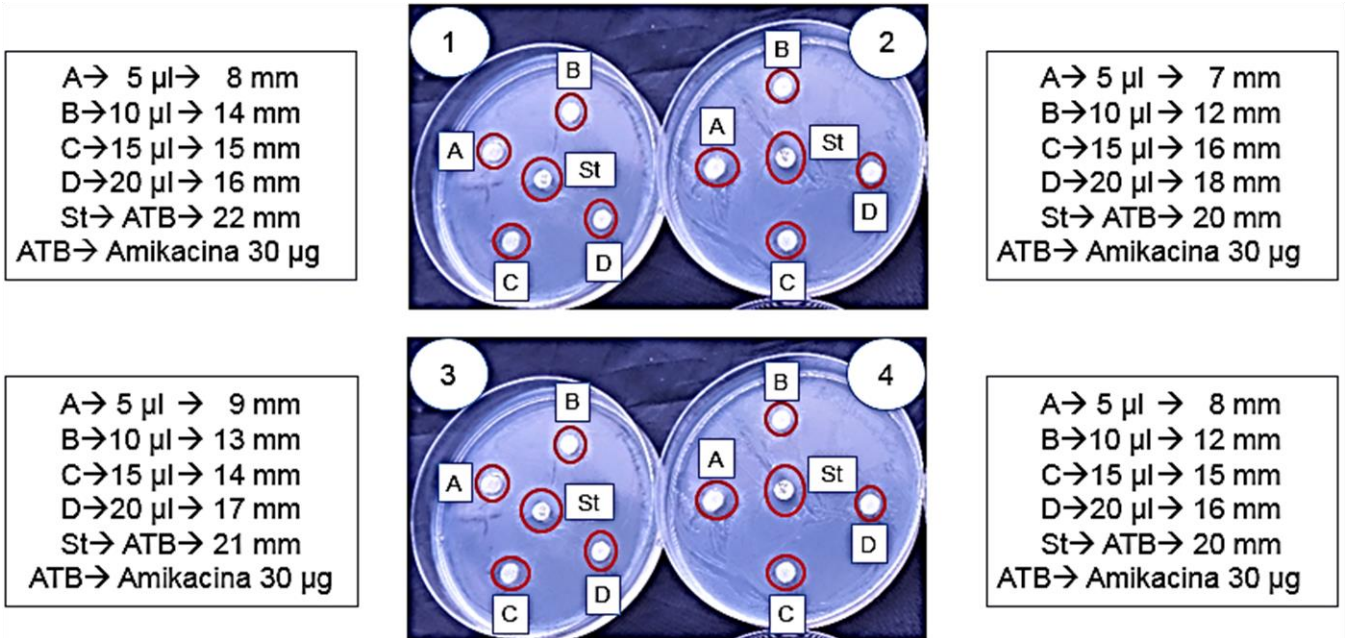
COLOCACIÓN DE LOS DISCOS EN LAS PLACAS PETRI



ANEXO N° 07

FIGURA N° 12

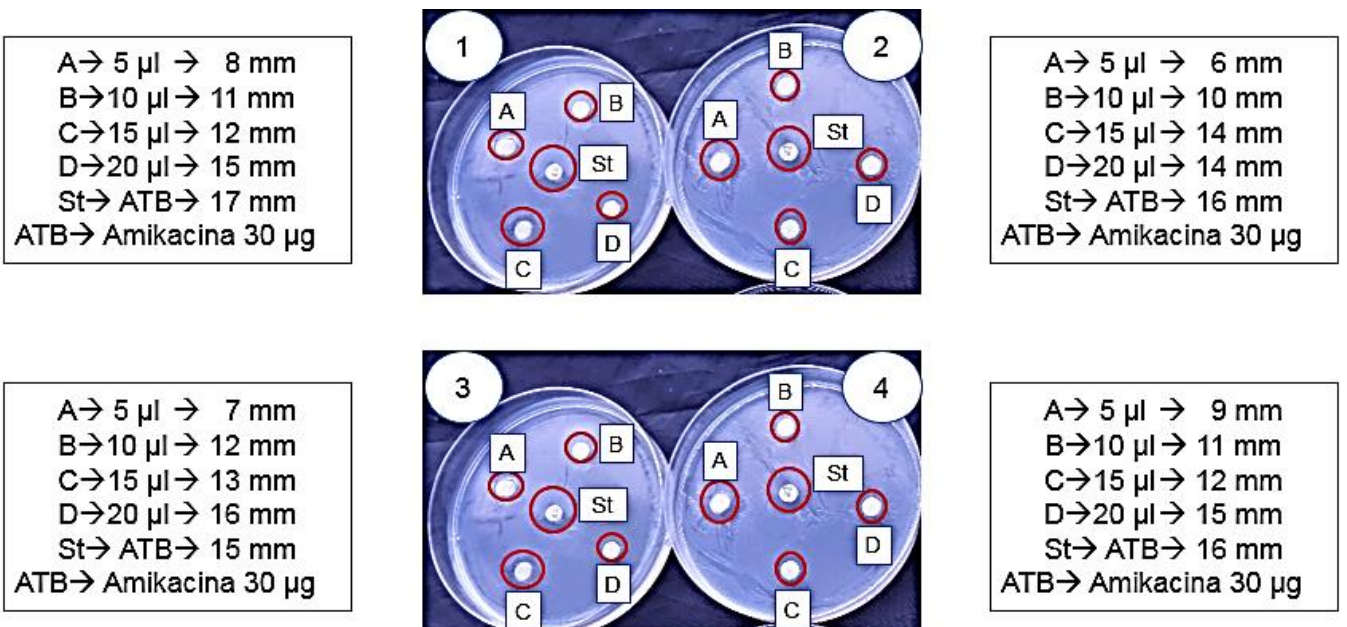
HALOS DE INHIBICIÓN PARA *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

FIGURA N° 13

HALOS DE INHIBICIÓN PARA *Salmonella typhi*

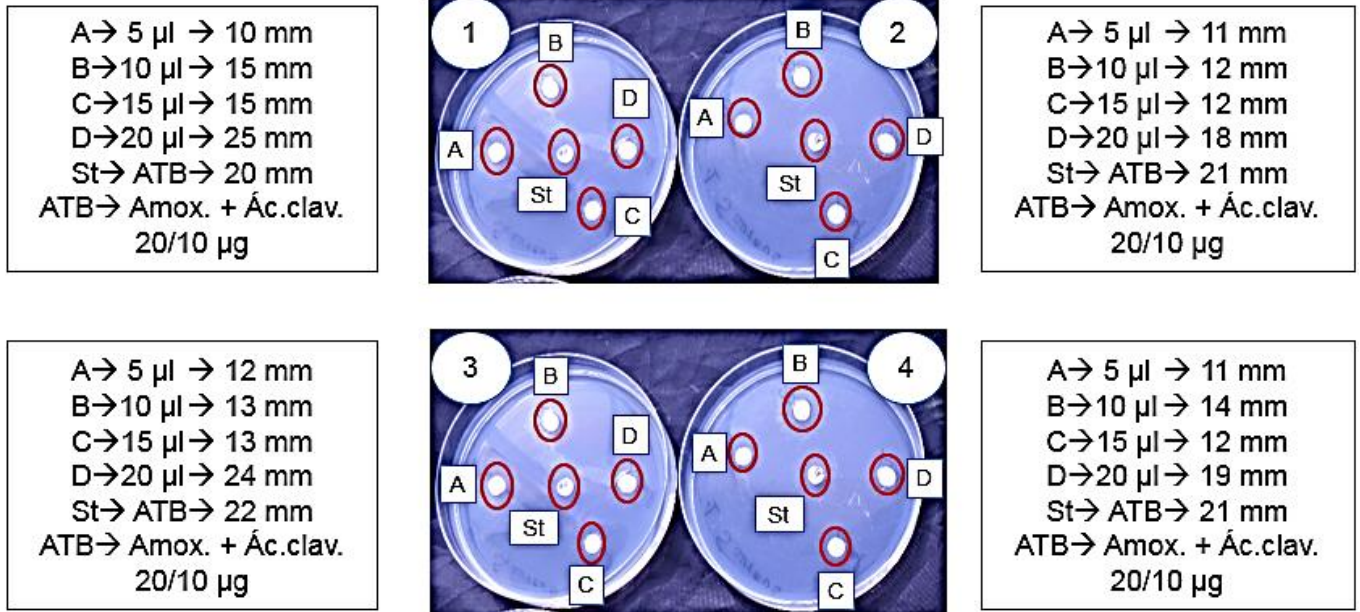


Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 08

FIGURA N° 14

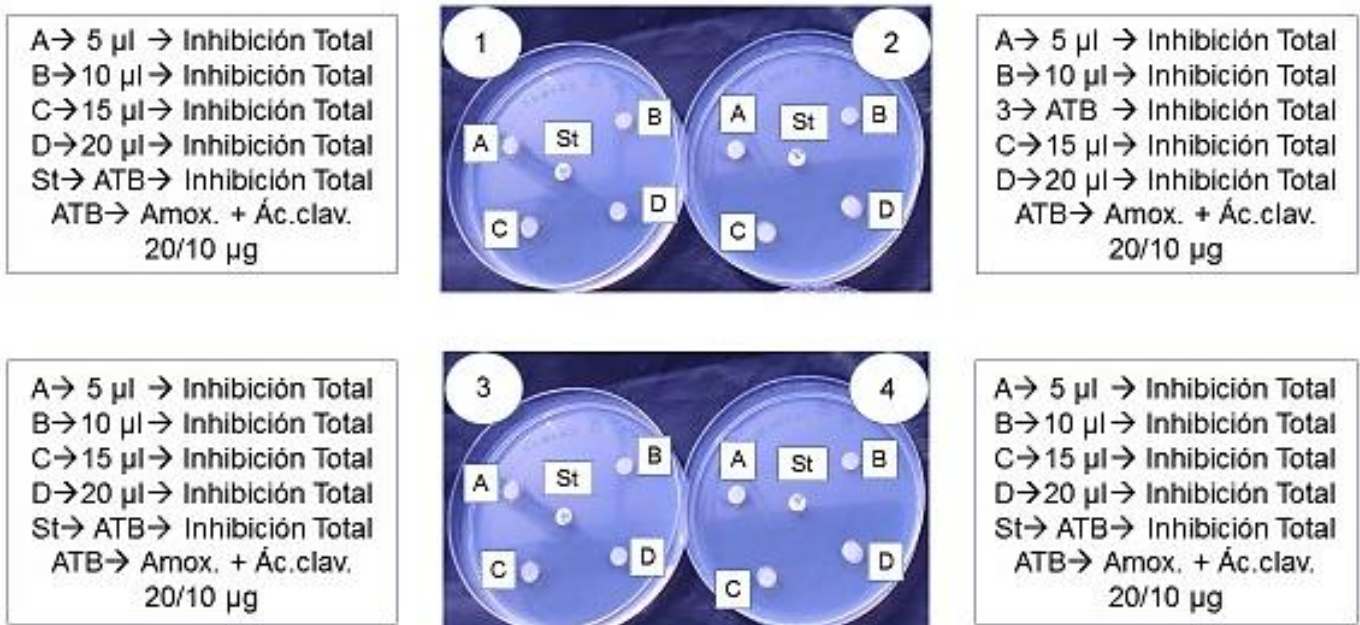
HALOS DE INHIBICIÓN PARA *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia

FIGURA N° 15

HALOS DE INHIBICIÓN PARA *Bacillus cereus*



Fuente: Elaboración propia