

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS DE *Staphylococcus aureus.*”

Tesis para optar el Título Profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO

TESISTAS:

BACH: GOMEZ CALLUPE, CECILIA EDITH

BACH: GODOY QUISPE, EUSEBIA

ASESOR:

Dra. QF. MARITZA RUIZ SANCHEZ

LIMA – PERÚ

2018

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lepechinia meyenii (pacha salvia) EN CULTIVOS
MICROBIOLÓGICOS DE *Staphylococcus aureus*.”**

DEDICATORIA

A:

Dedico esta tesis a Dios por brindarme salud y mucha fortaleza para poder realizar uno de mis propósitos que es ser Químico Farmacéutico y agradecer a mis padres, Vidal y Gregoria por el apoyo que siempre me dan y las fuerzas para seguir adelante y a mi Querido esposo por su amor y comprensión, y a toda mi familia por darme su apoyo, comprensión durante mis estudios quienes me aconsejan a cumplir mis metas y encontrar el éxito profesional.

Cecilia Gómez Callupe

A:

Dedico esta tesis a Dios por darme su bendición, fortaleza en el día a día. A mis padres con mucho cariño y amor que me educaron y me apoyaron en todo momento al igual que mis hermanos. A mi novio por estar en esta etapa de mi vida maravillosa, por sus consejos y su apoyo incondicional. Todos ellos me motivaron para lograr que con esfuerzo y actitud positiva logras a cumplir tus metas y a seguir trascendiendo en el día a día que me hace sentir feliz y orgullosa de mi carrera profesional como Químico Farmacéutico.

Eusebia Godoy Quispe

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a todos los asesores que nos ayudaron con las inquietudes durante todo el desarrollo de nuestra tesis por la información necesaria para hacer posible este proyecto de investigación.

Agradecemos al Dr. Mario Carhuapoma Yance y a la Dra. Maritza Ruiz por su tiempo y dedicación, ya que con su ayuda nos fortaleció en cada momento que requeríamos de sus conocimientos para brindarnos un mejor aporte para poder culminar con nuestra tesis, y así obtener el título profesional de nuestra alma mater UIGV.

Cecilia Gomez Callupe

Y

Eusebia Godoy Quispe

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| Carátula | |
| Dedicatoria | |
| Agradecimiento | |
| Índice | |
| Índice de Anexos | |
| Índice de Tablas | |
| Índice de Figuras | |
| Resumen | |
| Abstract | |
| Introducción..... | 1 |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| 1.1. Descripción de la realidad problemática..... | 2 |
| 1.2. Identificación y formulación del problema..... | 3 |
| 1.2.1. Problema general..... | 3 |
| 1.2.2. Problemas específicos..... | 3 |
| 1.3. Objetivos..... | 3 |
| 1.3.1. Objetivo General..... | 3 |
| 1.3.2. Objetivos específicos..... | 3 |
| 1.4. Justificación de la investigación..... | 4 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 2.1. Antecedentes de investigación..... | 5 |
| 2.1.1. Antecedentes Nacionales..... | 5 |
| 2.1.2. Antecedentes Extranjeros..... | 6 |
| 2.2. Bases teóricas..... | 7 |
| 2.2.1. Los Aceites Esenciales..... | 7 |
| 2.2.1.1. Estructura y clasificación..... | 8 |
| 2.2.1.2. Aplicaciones y usos..... | 9 |
| 2.2.2. Extracción por arrastre con vapor..... | 9 |
| 2.2.3. Los extractos..... | 10 |
| 2.2.3.1. Los extractos fluidos..... | 10 |
| 2.2.3.2. Los extractos secos..... | 10 |

| | | |
|---------------------------------------|--|-----------|
| 2.2.3.3. | Los extractos blandos..... | 11 |
| 2.2.4. | <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) Epl..... | 11 |
| 2.2.4.1. | Taxonomía..... | 11 |
| 2.2.4.2. | Hábitat y Distribución geográfica..... | 11 |
| 2.2.4.3. | Descripción botánica..... | 12 |
| 2.2.4.4. | Principios activos..... | 13 |
| 2.2.4.5. | Propiedades Medicinales de <i>Lepechinia meyenii</i> | 14 |
| 2.2.5. | Metabolitos secundarios y rutas metabólicas..... | 14 |
| 2.2.5.1. | Tipos de metabolitos secundarios..... | 15 |
| 2.2.5.2. | Compuestos fenólicos..... | 17 |
| 2.2.6. | <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |
| 2.2.6.1. | Generalidades..... | 18 |
| 2.2.6.2. | Tipificación genética de <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 2.2.6.3. | Antibióticos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |
| 2.2.6.4. | Gentamicina..... | 23 |
| 2.3. | Hipótesis | 25 |
| 2.3.1. | Hipótesis general..... | 25 |
| 2.3.2. | Hipótesis específicas..... | 25 |
| 2.4. | Definición de términos básicos..... | 26 |
| CAPÍTULO III: METODOLOGÍA..... | | 27 |
| 3.1. | Tipo | 27 |
| 3.2. | Población y muestra..... | 27 |
| 3.3. | Equipos, materiales y reactivos..... | 27 |
| 3.4. | Procedimiento..... | 28 |
| 3.5. | Procesamiento de datos..... | 34 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS..... | | 35 |
| 4.1. | Presentación..... | 35 |
| 4.2. | Discusión..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 48 |
| 5.1. Conclusiones..... | 48 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 49 |
| | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|-------------|------------------------|----|
| Anexo N° 1: | Matriz de consistencia | 56 |
| Anexo N° 2: | Variables | 57 |
| Anexo N° 3: | Testimonio fotográfico | 58 |
| Anexo N° 4: | Taxonomía | 64 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabla N° 1: Composición química del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) determinado por CG-EM. | 35 |
| Tabla N° 2: Halos de Inhibición del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) a tres concentraciones frente al <i>Staphylococcus aureus</i> | 36 |
| Tabla N° 3: Prueba T en cepa enfrentada de <i>Staphylococcus aureus</i> con el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) a 10 % de concentración | 37 |
| Tabla N° 4: Prueba T en cepa enfrentada de <i>Staphylococcus aureus</i> con el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) a 15 % de concentración | 38 |
| Tabla N° 5: Prueba T en cepa enfrentada de <i>Staphylococcus aureus</i> con el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) a 25 % de concentración. | 39 |
| Tabla N° 6: Estadísticos de grupo cepa enfrentada de <i>Staphylococcus aureus</i> con el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) | 40 |
| Tabla N° 7: Prueba T para la igualdad de medias de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> enfrentada con el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) (pacha salvia) frente a la gentamicina | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura N° 1. Ruta metabólica de los terpenos y aceites esenciales | 16 |
| Figura N° 2. Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios | 18 |
| Figura N° 3. Microfotografía de <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |
| Figura N° 4. Estructura molecular del aminoglucósido gentamicina | 24 |
| Figura N° 5. Mecanismo de acción de los antibióticos antimicrobianos | 24 |
| Figura N° 6. Mecanismo de resistencia a los antibióticos | 25 |
| Figura N° 7. Cromatograma de los componentes principales del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) por cromatografía de gases. | 36 |
| Figura N° 8. Recolección y desecación de las hojas de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) | 58 |
| Figura N° 9. Hojas de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) envueltas en papel y frasco | 59 |
| Figura N° 10. Extracción del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) | 60 |
| Figura N° 11. Cultivo de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> . | 61 |
| Figura N° 12. Crecimiento de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> . | 62 |
| Figura N° 13. Resultados Halos de inhibición del aceite esencial de la <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) contra la cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> comparado con la gentamicina. | 63 |

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antimicrobiano de la *Lepechinia meyenii*; (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus*, para lo cual se obtuvo el aceite esencial por el método de destilación de arrastre con vapor de agua; el análisis de los componentes fitoquímicos se realizaron por el método de cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) mientras que en *in vitro* se midió la actividad antimicrobiana con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por el método de difusión disco (Kirby Bauer) usando discos comerciales de marca OXOID, gentamicina 10 ug como estándar. En el aceite esencial se encuentran 15 componentes fitoquímicos que en su mayoría fueron α -pineno (21.37 por ciento) D-limoneno (15,43 por ciento), eucaliptol (18.80 por ciento). Los otros compuestos se encuentran aproximadamente al 1 por ciento de concentración. En el caso de la actividad antimicrobiana se observó el mayor efecto antibacteriano al 25 por ciento de concentración, sin embargo, la sensibilidad a la gentamicina fue mayor. Se encuentran los componentes terpénicos de aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) que podrían ser responsables en su actividad antimicrobiana y potencialmente aplicables en la fitoterapia complementaria o alternativa.

Palabra clave: aceite esencial, *Lepechinia meyenii*, actividad antimicrobiana, plantas aromáticas.

ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the antimicrobial effect of *Lepechinia meyenii*; (pacha salvia) in microbiological cultures of *Staphylococcus aureus*. For which the essential oil was obtained by the method of steam distillation; the analysis of the phytochemical components was carried out by the gas chromatography and mass spectrometry method (GC-SM) while in vitro the antimicrobial activity was measured with strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 by the disc diffusion method (Kirby Bauer) using OXOID commercial discs, gentamicin 10 ug as standard. In the essential oil, 15 phytochemical components were found, most of which were α -pinene (21.37 percent), eucalyptol (18.80 percent) and D-limonene (15.43 percent). The others components are approximately 1 percent in concentration. In the case of antimicrobial activity, it was observed that the highest antibacterial effect 25 percent concentration, however, the sensitivity to gentamicin was higher. The terpenic components of essential oil of *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) are found that could be responsible for their antimicrobial activity and potentially applicable in complementary or alternative herbal medicine.

Keyword: essential oil, *Lepechinia meyenii*, antimicrobial activity, aromatic plants.

INTRODUCCIÓN

Los seres humanos y los animales están expuestos a un sin número de agentes infecciosos de tipo bacteriano, como es el caso de *Staphylococcus aureus*.

Los patógenos involucrados en las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, son patógenos oportunistas, en personas inmunocomprometidas (son aquellos que presentan un gran potencial de formar biopelículas en la piel y en superficies mucosas) los cuales pueden ser introducidos a los tejidos durante la implantación de dispositivos médicos.

El Staphylococcus aureus es el microorganismo de mayor frecuencia en patología humana y agente causal de infecciones de la piel, neumonía, artritis séptica, osteomielitis e infecciones asociadas a cuerpos extraños. Además de ser muy resistente a las penicilinas, clindamicina, eritromicina y rifampicina con excepción a las ceftarolinas.

Por ello el trabajo de tesis busca determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* siendo necesario buscar un tratamiento natural.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

El *Staphylococcus aureus*, se encuentra presente en la nariz y piel de personas sanas en un 20 y 30 por ciento a diferencia de pacientes hospitalizados donde el porcentaje es mayor sin embargo no presentan síntomas por lo que se les denominan portadores en personas inmunodepresivas o que padecen de Diabetes mellitus o que reciben tratamiento de hemodiálisis.⁽¹⁾

Existen fármacos antibacterianos para combatir las infecciones de *Staphylococcus aureus*, pero presentan problemas de toxicidad hepática y reacciones adversas e interacciones farmacológicas.

Además de ser una terapia de elevado costo y en muchas ocasiones genera el fracaso del tratamiento con consecuencias de hospitalización prolongada y complicaciones.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) actualmente un 80 por ciento de población utiliza los recursos de la medicina tradicional y complementaria para satisfacer sus necesidades de asistencia médica. Este tratamiento va a emplear plantas medicinales. A veces con carencia del aval científico, algunas podrían representar riesgos en la salud humana de no ser científicamente demostradas sus efectos farmacológicos.^(2,3)

En nuestro país existen muchas variedades de flora nacional, La *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) (Walp.), es una planta nativa de los

andes peruanos, cuyos estudios, se enfocan por su posible actividad antioxidante además de conocer el uso de la medicina tradicional para combatir los cólicos gastrointestinales, fiebre tifoidea, artritis, afecciones hepáticas y malaria, por ello se consideró realizar el presente estudio debido a que se conoce que el *Staphylococcus aureus* produce artritis séptica y que el aceite esencial de esta planta si comprende su efecto antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus*, se lograría tratar la artritis séptica con productos naturales.

1.2. Identificación y formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Tendrá efecto antibacteriano el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus*?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Qué tipo de metabolitos secundarios contiene el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia)?
2. ¿A qué concentración el aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus*.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Determinar cuáles son los tipos de metabolitos secundarios presentes en la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia).
2. Determinar la concentración del aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) que tendrá efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

1.4. Justificación de la investigación

Tomando en cuenta que los problemas de la salud son las infecciones bacterianas, siendo las más comunes las ocasionadas por *Staphylococcus aureus* y que pueden llegar a causar severos problemas de salud, y que es responsable de las infecciones bacterianas en diferentes zonas del cuerpo, además puede causar afecciones en la vía gastrointestinal entre otros.

Se propone realizar este trabajo para contribuir a la investigación de nuestros recursos vegetales y de esta forma validar científicamente el uso tradicional de nuestra biodiversidad.

De comprobarse que el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) podría ser una buena alternativa natural, y reducir la automedicación de fármacos antibacterianos ya que producen hepatotoxicidad.

Importante porque permite revalorar los recursos vegetales terapéuticos de la biodiversidad peruana fomentando la eficacia segura para el consumo humano y así obtener un Fito medicamento con posteriores estudios de farmacotecnia y formulaciones galénicas obteniendo buenos resultados para el tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*. y el desarrollo del cultivo para mejorar las condiciones de vida de los pobladores andinos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Estado de arte

2.1.1. Antecedentes Nacionales

Alzamora *et al.*,⁴ 2001, realizó el estudio de los aceites esenciales antimicrobianos de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus*, *Tagetes pusilla*, *Senecio tephrosioides* y ***Lepechinia meyenii*** (Walp) Epling. Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron a *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P y *Candida albicans* ATCC 10231. Se empleó discos de antibióticos amoxicilina como controles. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*.

Castillo⁵ (2011), determinó en su estudio que el extracto etanólico de *Lepechinia meyenii* (Walp.) tiene actividad antimicrobiana y actividad antioxidante se han explicado por los compuestos que se han aislado el ácido 2-hidroxicafeico, el ácido cafeico y los ésteres metílico y etílico y el carnosol. Siendo que el ácido 2-hidroxicafeico presenta mayor actividad antioxidante, superior al de rutina y quercetina.

Esta actividad antioxidante puede atribuirse a derivados del ácido caféico. Destacando que estos compuestos son conocidos y que el ácido cafeico no a sido reportado antes en especies del género *Lepechinia*.

2.1.2. Antecedentes Extranjeros

Bravo *et al.* ⁶ (2004), realizó en su estudio de *Minthostachys mollis* Griseb. y *Lepechinia meyenii* (Walp) recolectados en los Departamentos Amboto y Ancasti en diciembre de 2000 y febrero del 2001, con la finalidad de estudiar flavonoides mayoritarios lo cual en ambas especies se determino la actividad antimicrobiana del extracto para darle el sustento científico en la medicina popular. Siendo flavonoles 3i- 4i dihidroxilados y 4i- OH monohidroxildos y los glicosilados de C7 y se caracteriza positiva de 6-OH de flavonoles, diosmetina en baja proporción. En la *Lepechinia Minthostachys*, también presentó similares resultados.

Rojas *et al.* ⁷(2003), realizó en su estudio la actividad antimicrobiana de 36 extractos etanólicos de 24 plantas para el tratamiento de varios trastornos infecciosos e inflamatorios, contra cuatro bacterias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) de los cuales 25 extractos mostraron algún grado de actividad antimicrobiana contra al menos un microorganismo. Las plantas con mayor actividad antimicrobiana fueron *Cestrum auriculatum* L. Heritier (Solanaceae), *Iryanthera lancifolia* Ducke Suesseng (Myristicaceae), ***Lepechinia meyenii*** (Walp.) Epling (Lamiaceae) y *Ophryosporus peruvianus* (Gmelin) King & H. Rob. (Asteraceae).

Morocho *et al.*⁸ (2017), realizó en su estudio que el aceite esencial (EO) por hidrodestilación de las partes aéreas de *Lepechinia radula* Benth Epling (Lamiaceae) de Ecuador, identificando 34 compuestos. Hayando δ -3-careno (19,9 por ciento), β -pineno (17 por ciento), (E) - β - cariofileno (9,7 por ciento) y (E - E) alpha- farneseno (9, 4 por ciento). Concluyendo que el aceite esencial de *L. rádula* tiene *un* fuerte efecto antifúngico.

Acevedo *et al.*⁹ (2005), realizó su estudio de la ***Lepechinia caulescens***, que es una especie empleada por la Purepecha para tratar enfermedades gastrointestinales infecciosas. El aceite esencial de esta especie es activo contra algunas cepas de *Vibrio cholerae* con 4 μ L/ mL de MIC y 6 μ L/ mL de MBC. Los principales componentes del aceite determinado por GC-EM fueron borneol, alcanfor y trans-cariofileno.

Velasco-Negueruela *et al.*¹⁰ (1994), realizó en su estudio el aceite hidrodestilado de *Lepechinia floribunda* (Benth.) hayando componentes. entre ellos fueron borneol (21,44 por ciento), β -cariofileno (15,14 por ciento), aromadendreno (5,50 por ciento) y acetato de ledilo (16,86 por ciento).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales conteniendo un aroma agradable. se denominan aceites esenciales a los productos que se pueden obtenerse por arrastre de vapor o por expresión del pericarpio de diferentes frutos. Habitualmente, también se denomina esencias¹¹⁻¹³ (Bonilla *et al.*,2008; Jara, 2015, Figueroa (2016).

Son generalmente líquidos a temperatura ambiente, que se solidifican a baja temperatura, ejemplo: la esencia de *Lepechinia meyenii*, son prácticamente transparentes, incoloros y ligeramente coloreado amarillento de sabor insípido y de olor aromático ¹⁴.

Son menos densos que el agua, también hay excepciones de clavo y canela, que son más densas son insolubles en agua. Los lipófilos son solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico.) Se oxidan con mucha facilidad polimerizando a productos resinosos ¹⁴(Carhuapoma, 2011). Se debe tener en cuenta que algunos aceites esenciales a dosis elevadas pueden ser tóxicos a nivel del sistema nervioso central ¹⁴.

2.2.1.1. Estructura y Clasificación

Los aceites esenciales son generalmente mezclas complejas de varias sustancias. La composición química de los aceites esenciales va a depender de diferentes factores: origen botánico y ciclo vegetal.

Por las condiciones ambientales y características de cultivo (suelo, riego, abonos, etc) este procedimiento es obtenido para que no se pueda alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal ¹⁵.

Los compuestos presentes en los aceites esenciales se pueden clasificar en: terpenoides y no terpenoides

- Hidrocarburo : terpénico-limoneno
- Aldehído : monoterpeno-citral
- Alcohol : sesquiterpeno-espátuleno
- Fenol : aromático-timol

2.2.1.2. Aplicaciones y usos

En las aplicaciones de los aceites esenciales, las esencias son múltiples y variables. Lo cual se utiliza tanto por sus propiedades aromáticas, en la industria alimentaria y perfumería como también en la industria de productos de limpieza, y sus propiedades farmacológicas que son utilizadas en vía tópica y vía interna ¹⁶.

2.2.2. Extracción por arrastre de vapor

Es la técnica más utilizada y autorizada por la Farmacopea Europea. En este método de destilación en el cual se coloca la planta recomendablemente seca ya que estando fresca contiene mucilagos que van a enturbiar al aceite así disminuyendo su calidad, lo cual que contiene su principio aromático en la caldera de un alambique de hierro, acero inoxidable, cobre o vidrio, cubierta con agua. Al momento de calentar la caldera se va evaporando el agua y el aceite, que luego se condensa en el refrigerante, recogiendo el agua en el colector, del cual se va separando por cierto tiempo por diferencia de densidades, y al final se aísla con un embudo provisto de un grifo en la parte más estrecha ¹⁶⁻¹⁸.

El arrastre de vapor se debe tomar en cuenta que por su calidad de vapor a presión y por experimentación se obtiene mayor rendimiento a 40psi.

La temperatura de vapor; en el área de la columna de destilación, es la cantidad de material vegetal que se va a alimentar; a las condiciones de condensación que deben estar alrededor de los 40°C, para una mejor separación del condensado ¹⁶⁻¹⁸.

2.2.3. Los extractos

Son preparados y concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, generalmente de material vegetal desecado, obtenidos al evaporarse parcial y totalmente y en este disolvente los líquidos extractivos son de origen vegetal. según su consistencia y concentración de principio activo se clasificarán en: extractos fluidos, secos y blandos ¹⁶⁻¹⁸.

2.2.3.1. Los extractos fluidos: en estas drogas en lo cual la concentración prescrita de etanol, son preparados de forma que una parte de droga va a corresponder a una parte o dos partes del extracto fluido y teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca van corresponder a 100 partes de planta fresca. Generalmente los extractos fluidos se obtendrán por percolación ¹⁶⁻²⁰.

2.2.3.2. Los extractos secos: Son de consistencia seca y son fácilmente pulverizables, lo cual se obtiene por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Estos extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5 por ciento. Deben presentar una concentración muy superior al del principio activo de la droga original, son preparados bastante estables y de fácil manipulación; como líquido extractor se debe utilizar el alcohol de diversas concentraciones como también el agua. Para obtener extractos secos son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos ¹⁶⁻¹⁸.

2.2.3.3. Los extractos blandos: Tiene una concentración de principio activo superior a la de la droga original y su consistencia es semisólida, su disolvente suele ser agua y mezclas hidroalcohólicas. También son poco estables lo cual resultan difíciles de manipular. ¹⁶⁻¹⁸.

2.2.4. *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epl.

2.2.4.1. Clasificación taxonómica

Taxonomía:

Según Cronquist, A. 1981

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Lamiales

FAMILIA: Lamiacea

GÉNERO: ***Lepechinia***

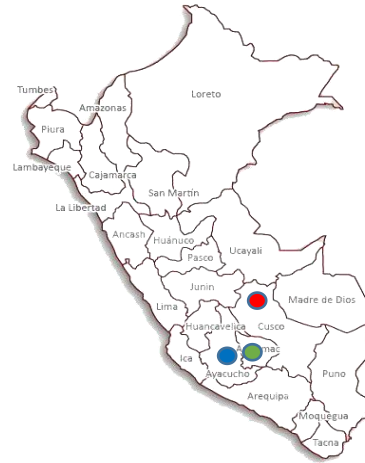
ESPECIE: ***Lepechinia meyenii*** (Walp.)

Epl. NOMBRES VULGAR: salvia,
pacha salvia, salvia de puna.

2.2.4.2. Hábitat y Distribución geográfica

Es una planta nativa de los andes. En el Perú se distribuye por todas las regiones de la Sierra (Ayacucho, Apurímac, Cusco, entre otros) ¹⁶.

- Ayacucho – pacha salvia
- Apurímac – pacha salvia
- Cuzco – pacha salvia



2.2.4.3. Descripción Botánica

Este género *Lepechinia* descrito en 1806 por Willdenow que tomo el nombre del botánico ruso Ivan Ivanovic Lepechin (1737- 1802).

Epling señaló que en estos géneros *Alguelaguen*, *Stachys*, *Sphaceley* *Astemon* son sinónimos de *Lepechinia* (Eggers, 2000). En la actualidad este género va a comprender de 39 especies, las que fueron agrupadas en 8 secciones por Epling y en 2 por Hart (Eggers, 2000; Hart, 1983). Están distribuidas en el continente americano y su hábitat es el páramo y subpáramo (3200 – 4500msnm) ¹⁹⁻²³.

Carhuapoma (2011), dice existen 11 géneros en Perú de las cuales dos son endémicas de especies muy aromáticas. La especie *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epl., es tipo herbácea, rizomatosa, con hojas muy fragantes y extendidas, y con flores blancas. Se distribuye por los andes peruanos, Bolivia y Argentina. En el Perú se usa como infusión que contiene aceite esencial con constituyentes de pinenos y limoneno ¹⁶.

2.2.4.4. Principios activos de *Lepechinia meyenii*

Los estudios fitoquímicos indican que las especies de este género biosintetizan principalmente, di terpenos tricíclicos, triterpenos y flavonoides ²⁰⁻²³.

Los diterpenos reportan principalmente ácidos derivados de los núcleos abietano y pimarano, aislados a partir de *L.caulescens*, *L. bullata*, *L. glomerata*, *L. hastata*, *L. meyenii* y *L. urbaniana*. Algunos de ellos son el ácido carnósico, rosmanol (Bruno *et al.*, 1991), 7-metoxirosmanol, etoxirosmanol (Eggers, 2000), ácido 7 β -hidroxi- abieta-8(14)-en-18-oico-9 α , 13 α -endoperóxido, el ácido 8 α (9 α), 13 α (14 α)-diepoxiabietan-18-oico, y el ácido 7 α -hidroxidehidroabiético (Delgado *et al.*, 1986, 1994). También se han encontrado diterpenquinonas citotóxicas como las 6,7-dehidroroyleanona, horminona y 7-O- metil horminona en *L. bullata* ²³.

Dentro de los triterpenos se reporta al ácido ursólico, oleanólico, betulínico y sus 2 α -hidroxi derivados aislados apartir de *L. glomerata*, *L. caulescens* y *L. chamaedryoides* (Eggers, 2000; Delgado *et al.*, 1986, 1994).

En *L. caulescens* se reporta al stigmasterol y el β -sitosteril- β -D- glucósido; en cuanto a los flavonoides se han identificado a salvigenina (de *L. caulescens*), artemetina y santina (de *L.urbaniana*) ²⁰⁻²³.

2.2.4.5. Propiedades Medicinales de *Lepechinia meyenii*

Tiene acción antiespasmódica, y se utiliza especialmente como carminativo en casos de meteorismo y flatulencia digestiva, por lo que es útil en los cólicos estomacales. Se recomienda como tónico general y en el tratamiento del dolor de cabeza. En vía externa se utiliza como hemostático y antiinflamatorio

16.

2.2.5. Metabolitos secundarios y rutas metabólicas

En las rutas metabólicas se les consideran como un conjunto de reacciones bioquímicas, producto del metabolismo o la biotransformación enzimática de gran importancia para biosintetizar a los metabolitos secundarios. El ácido shiquimico es precursor de diversos intermediarios aromáticos.

La formación de ácido shiquimico ocurre a partir de 3,4 átomos de carbono y son el ácido fosfoenolpiruvico(PEP) y la eritrosa-4-fosfato(E4P) con una condensación de tipo aldólica, produciendo un compuesto C7 a través de ciertas etapas. Es responsable de la biosíntesis en la mayoría de los compuestos fenólicos de estas plantas y se utilizan como sustratos a la eritrosa-4-fosfato y el ácido fosfoenolpiruvico. Uno de estos productos es la fenilalanina. Esta enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) catalizara la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario en el cual la reacción que catalizara es importante. A su vez es una esta etapa reguladora para la formación de muchos compuestos fenólicos ¹⁴.

Los metabolitos secundarios suelen estar restringida a estados específicos del desarrollo y en períodos de estrés de cada especie vegetal. Las células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de dichas plantas con el medio ambiente y que están relacionados con la maquinaria reproductiva de las plantas (atracción de insectos para la promoción de la polinización) ¹⁴.

Estos productos secundarios van a tener uso en la industria farmacéutica, también en la producción de *tests* de diagnóstico, de fragancias, y aditivos alimentarios en general. Lo mencionado anteriormente va a explicar el interés de la industria en la producción de compuestos naturales y que la calidad de costos no sea afectados por las condiciones climáticas, sanitaria o políticas de la región de producción. En este contexto en que los cultivos de las células y tejidos vegetales que constituyen a una alternativa para producir sustancias cuya producción comercial por los métodos convencionales va resultar difícil económicamente poco viable.

2.2.5.1. Tipos de metabolitos secundarios

Los más abundantes son:

Terpenos: son terpenoides, que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40 mil moléculas diferentes). En esta ruta biosintética de los compuestos va a dar lugar a metabolitos primarios y secundarios de gran importancia para su crecimiento y supervivencia de estas plantas. En estos metabolitos primarios se encuentran los aceites esenciales (monoterpenos y sesquiterpenos), las hormonas (giberelinas, ácido abscísico y las citoquininas), los carotenoides, clorofilas plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de membranas). Suelen

ser insolubles en agua y se derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). la forma de los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los di terpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetra terpenos tienen 40 C y se habla de poli terpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno ¹⁴.

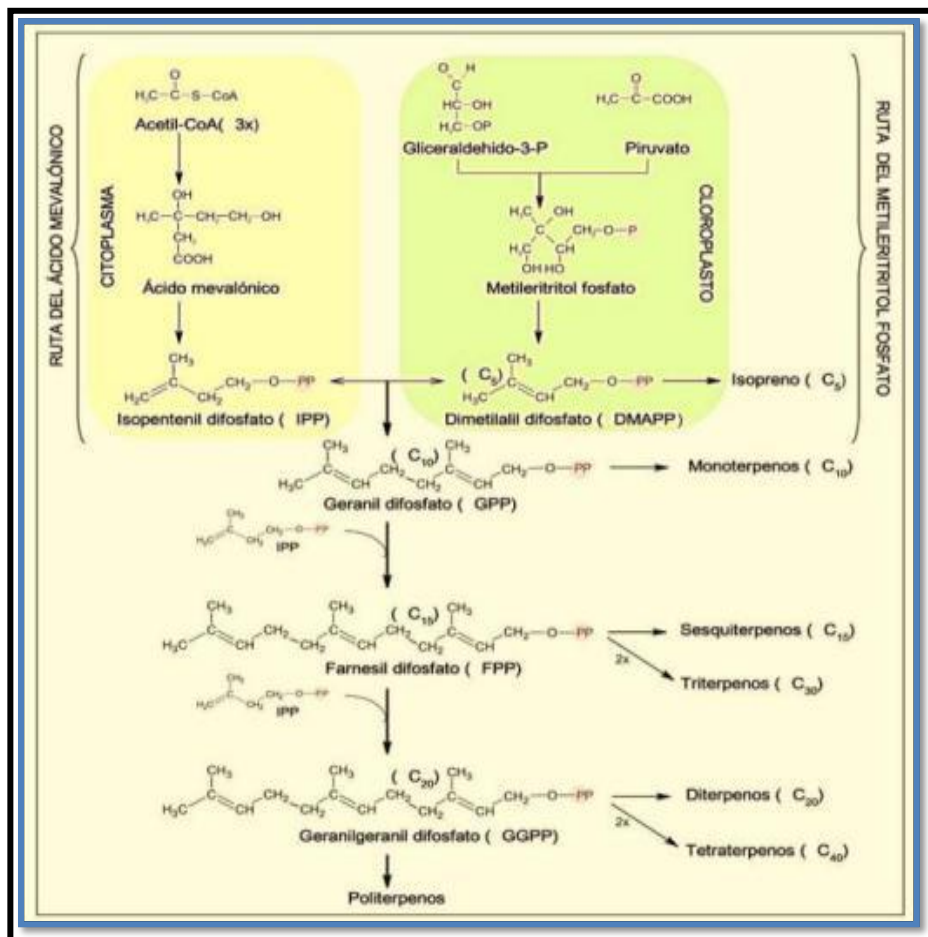


Figura N° 1. Ruta metabólica de los terpenos y aceites esenciales
(Fuente: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)

2.2.5.2. Compuestos fenólicos

Son contextos del metabolismo y los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir en el metabolismo primario y secundario. Las plantas se sintetizan en productos secundarios que tengan grupo fenol. En la sustancia reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles y fenilpropanoides todas ellas derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo ¹⁴.

La estructura química, es muy diversa que comprende moléculas sencillas con ácidos fenólicos y polímeros complejos como los taninos y la lignina. En éste grupo se encuentran pigmentos flavonoides y productos que están implicados en interacciones de plantas-herbívoro. La ruta del ácido malónico es fuente importante de los fenoles, hongos y bacterias y es poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido shiquímico cuya responsabilidad de la biosíntesis de la mayor cantidad de de los compuestos fenólicos de las plantas. Se da apartir de la eritrosa-4-P y de ácido fosfoenol pirúvico iniciandose una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico y derivados de éstos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales.

La fenilalanina, triptófano que se encuentran en los aminoácidos esenciales sirve para que los animales se puedan incorporar en la dieta. La tirosina no es

esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarse por la hidroxilación ¹⁷.

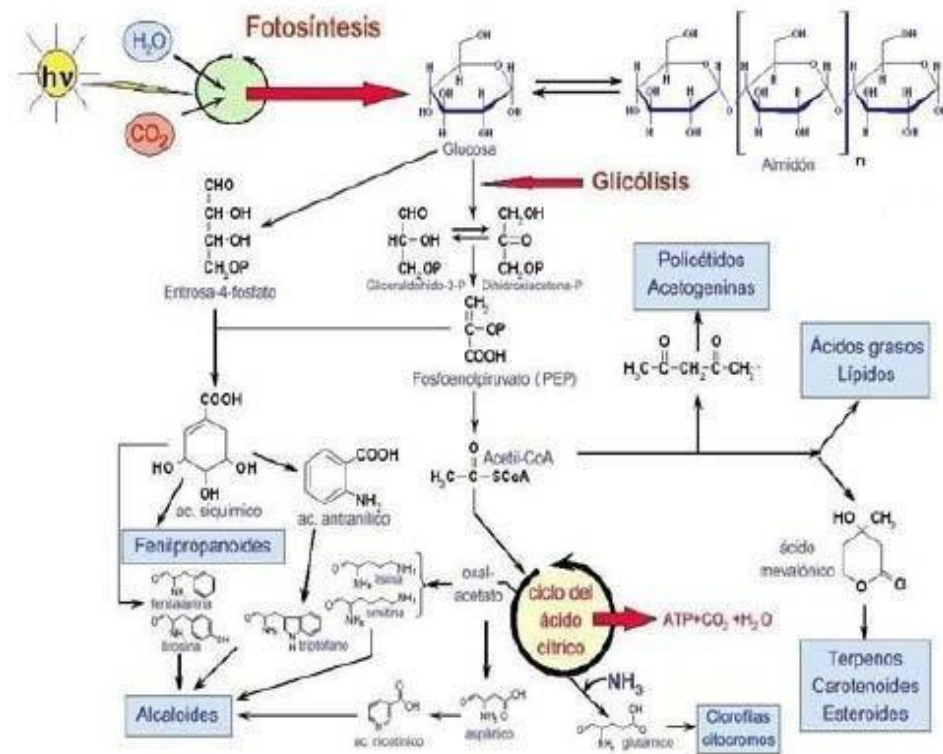


Figura N° 2. Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios.
(Fuente: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_pl_ant_as.pdf)

2.2.6. *Staphylococcus aureus*

2.2.6.1. Generalidades

Conocido como estafilococo áureo o estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, gran positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no espatulada que se encuentra distribuida por todo el mundo y comprobando que unas de cada tres personas se hallan colonizadas, pero no infectadas ²². Puede producir una gran cantidad de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas

relativamente benignas, como los siguientes diagnóstico de foliculitis, forunculosis y conjuntivitis, hasta producir enfermedades de riesgo vital, como por ejemplo la celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis y neumonía. También puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia de *Staphylococcus áureas* y por la ingesta de la entero toxina estafilocócica secretada por la bacteria.²².

Este microorganismo se encuentra en la actualidad causando muchas infecciones nosocomiales. En esta situación se favorece el hecho que esta especie habita en las mucosas y en la piel de los seres humanos, lo cual permite que a través de las heridas quirúrgicas ingresen al torrente sanguíneo de los pacientes que se encuentren en contacto directo o indirecto con el personal sanitario, u objetos contaminados de otros pacientes²².

Los *Staphylococcus áureas* tienen cepas habituales que son resistentes a la penicilina, utilizando antibióticos más eficaces para combatir a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafazolina. Para la administración del tratamiento antimicrobiano recomendablemente puede ser conveniente en función del caso y la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes y drenajes quirúrgicos²².

2.2.6.2. Tipificación genética de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas tales como infecciones cutáneas, septicemia, neumonía e intoxicación alimentaria, entre otras. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *S. áureas* resistentes a la meticilina (MRSA), que tradicionalmente se encontraban limitadas al ámbito nosocomial (cepas MRSA adquiridas en el hospital), a nivel mundial. Sin embargo, en años recientes las cepas MRSA también se han encontrado en la comunidad (cepas MRSA adquiridas en la comunidad) y estas han ido incrementando sustancialmente su incidencia.

Se sabe que alrededor del 30% de las personas son portadoras sanas de *S. aureus*, estos portadores sanos pueden transmitir a la bacteria a personas inmunodeficientes, con heridas o con implantes quirúrgicos, por lo que pueden llegar a provocar infecciones nosocomiales. Se ha descrito la colonización nasal de *S. aureus* entre miembros de la misma familia sin producir la enfermedad, sin embargo, pueden dar lugar a infecciones, por lo que los portadores sanos de *S.aureus* son un factor de riesgo importante en la infección por este microorganismo. Entre las especies de *Staphylococcus* clínicamente importantes se destacan *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, aunque no hay que descartar a las demás especies de estafilococos coagulasa negativos, que contribuyen a infecciones sobre todo a nivel intrahospitalario. Los estafilococos producen varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia, *S.*

aureus tiene la capacidad de producir coagulasa, por esta razón la detección de esta enzima es el criterio más utilizado para diferenciarlo de las otras especies. Actualmente la identificación de cepas de *S. aureus* se puede llevar a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Diferentes protocolos de PCR se han propuesto para detectar e identificar *S. aureus*, se detectan genes como *nucA*, *coaA*, *femA* o *femB* entre otros. Si además se requiere saber si son cepas MRSA se detecta el gen *mecA* que es un marcador molecular de resistencia a la meticilina. En estas cepas de *S. aureus* producen una termonucleasa extracelular (TNasa) con una frecuencia similar a las cepas que producen coagulasa. El gen *nucA* que codifica a la termonucleasa es producido por casi todas las cepas de *S. aureus* y es usado como criterio de diagnóstico de esta especie.

Es un coco Gram positivo, aerobio o anaerobio, inmóvil, no esporulante con actividad catalasa y coagulasa, que generalmente se dispone en gran cantidad de racimos irregulares semejantes a las uvas y crecen con mucha rapidez sobre medios metabólicamente activos, fermentando carbohidratos y produciendo pigmentos que van a variar desde el color blanco hasta el amarillo intenso. Son células esféricas de casi 1µm de diámetro en grupos irregulares, están desprovistos de motilidad y no forman esporas.⁽³¹⁾

El género *Staphylococcus* contiene quince especies, tres de importancia clínica son *S. aureus*, las especies *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* y que también se asocian con enfermedades humanas. Algunos son

miembros de la flora normal de la piel y mucosas en los seres humanos, infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. En algunas personas se presenta un tipo de infección de *S. aureus* durante su vida, que va variando desde la gravedad de la intoxicación alimentaria hasta infecciones cutáneas menores e infecciones graves potencialmente mortales.

En los *Staphylococcus aureus* de la coagulasa negativa son normales en su flora humana y a veces causan infección en el aparato digestivo ya que los alimentos contienen toxinas produciendo intoxicación alimentaria en pocas horas. Estos patógenos casi siempre causan hemólisis coagulación del plasma y producen varias enzimas y toxinas extracelulares.³¹.

Los hospitales invierten esfuerzos considerables en la prevención de la relación directa de paciente a través de personal y el medio ambiente. Incluso con buenas prácticas de control de la infección, la transmisión continúa. Los trabajadores sanitarios colonizados han sido implicados como fuentes de transmisión en los brotes, pero el uso de los servicios de salud el cribado de los trabajadores y la erradicación de *S. aureus* como medidas de control de rutina es controvertido.³¹.

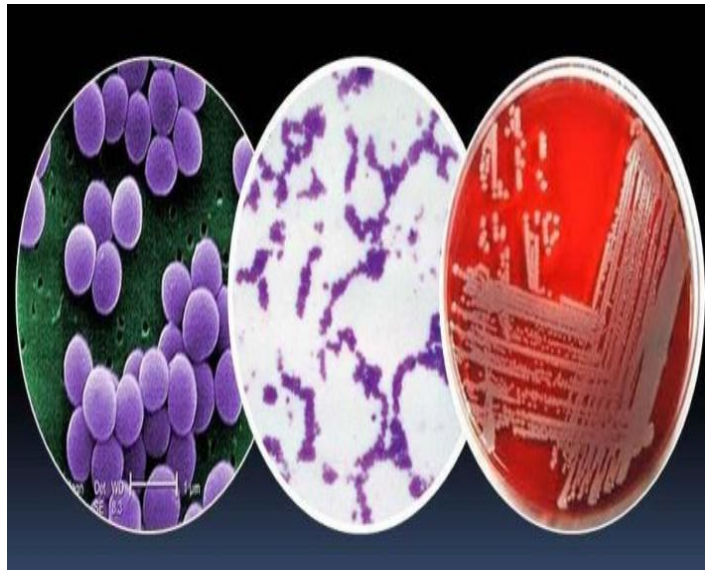


Figura N° 3. Microfotografía de *Staphylococcus aureus*
(Fuente:<https://www.google.com.pe/search?q=Staphylococcus+aureus>).

2.2.6.3. Antibióticos frente a *Staphylococcus aureus*

Existen diversos antibióticos para el tratamiento contra el *Staphylococcus aureus*, como: la penicilina G, nafazolina, oxacilina, vancomicina, gentamicina, entre otras alternativas.

2.2.6.4. Gentamicina

Este antibiótico es frecuentemente empleado por los profesionales de la salud en el tratamiento de infecciones, por ser económico y de amplio espectro, motivo por el cual tiene mucha aceptación por parte de la población. ³¹

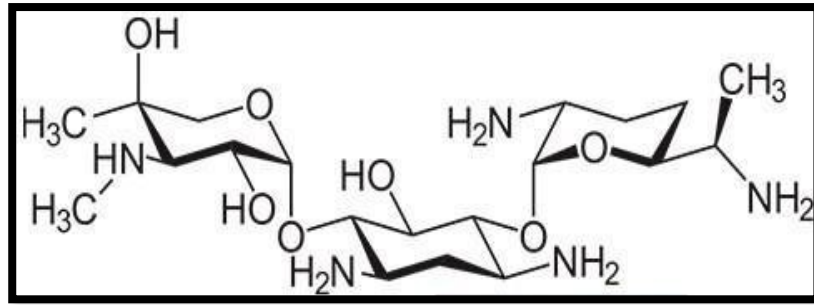


Figura N° 4. Estructura molecular del aminoglucósido gentamicina

(Fuente: <http://www.paraque-es.com/page/4/>).

El mecanismo de acción de este aminoglucósido es inhibir la síntesis de la pared celular. El peptidoglucano es el mucopéptido esencial en la composición de la pared celular, cuya síntesis es impedida por el antibiótico e inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes, la droga se fija en la pared celular y cuando este produce la división bacteriana, aparecen los defectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible y penetra líquido en su interior, estalla y se lisa.²²

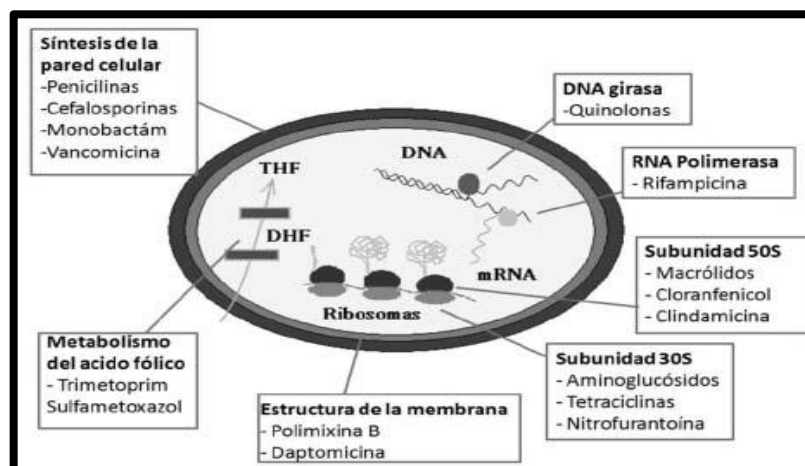


Figura N° 5. Mecanismo de acción de los antibióticos antimicrobianos.

(Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antibiotics_Mechanisms_of_action.png)

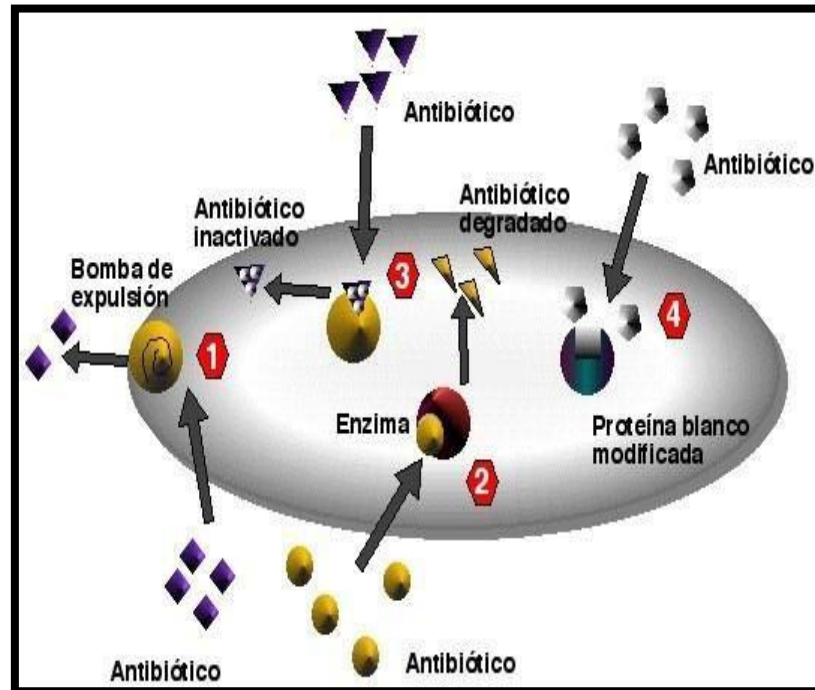


Figura N° 6. Mecanismo de resistencia a los antibióticos.

(Fuente: <https://jorlab.blogspot.pe/2000/04/resistencia-los-antibioticos.htm>)

2.3. Formulación de hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

El aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) tiene efecto antibacteriano en cultivos microbiológicos *Staphylococcus aureus*.

2.3.2. Hipótesis específicas

- 1) El aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) contiene metabolitos con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.
- 2) El aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones.

2.4. Definición de términos básicos

- ❖ **Aceites esenciales:** Llamados productos volátiles de naturaleza compleja y elaborados por diferentes vegetales a los que confiere el aroma agradable.
- ❖ **Antibacteriano.** Sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de bacterias.
- ❖ **Cepa.** Es un cultivo formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.
- ❖ **Flavonoides.** Pigmentos vegetales no nitrogenados.
- ❖ **Medicina Tradicional.** Es un Conjunto heterogéneo de medidas terapéuticas que van a constituir el contenido de medicinas “autóctonas” o “populares” .
- ❖ **Plantas medicinales.** Especie vegetal que contiene en toda o en alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades.
- ❖ **Principio activo.** Son Sustancias químicas responsables de la actividad farmacológica y su uso terapéutico de la droga.
- ❖ **Staphylococcus:** Son microorganismos que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo

Descriptivo y Explicativo.

Diseño:

Experimental: Porque manipulamos la variable independiente aleatoria para hallar el efecto antibacteriano.

3.2. Población y muestra

Población

Plantas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) que crecen en el distrito de Sarhua, Huarcaya, provincia de Víctor Fajardo, Ayacucho (3800msnm) en un área de 300m².

Muestra

10 Kg de hojas frescas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia).

3.3. Equipos, materiales y reactivos

Equipos:

- ❖ Balanza.
- ❖ Autoclave.
- ❖ Equipo de destilación.
- ❖ Papel filtro Whatman N° 40.

Materiales de vidrio:

- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Placas Petri
- ❖ Matraces de 500 ml
- ❖ Matraces de 250 ml
- ❖ Matraces de 100 ml.
- ❖ Pipetas de 1 ml
- ❖ Pipetas de 5 ml
- ❖ Pipetas de 10 ml.
- ❖ Vasos precipitados de 200 ml.
- ❖ Frasco de vidrio color ámbar de 100 ml capacidad.
- ❖ Probeta de 100 ml.

Otros:

- ❖ Mascarillas
- ❖ Guantes.
- ❖ Algodón
- ❖ Alcohol 70°
- ❖ Guardapolvo
- ❖ Marcadores.

Reactivo:

- ❖ Anhídrido Na₂ SO₄
- ❖ Cloruro de sodio
- ❖ Suero fisiológico
- ❖ Agar Mueller - Hinton

3.4. Procedimiento

- a) **Colecta de la materia vegetal:** las hojas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) se colectarán de aquellas plantas que crecen en los páramos de Pampansa, Huarcaya, Sarhua 3800 metros de altitud, provincia de Víctor Fajardo, región de Ayacucho ¹⁸ .

- b) **Procesamiento de la muestra:** Las hojas se desecarán bajo sombra a condiciones climáticas de la sierra, por siete días, hasta obtener la muestra seca que fácilmente se va a triturar al frotar con la mano, También serán guardadas en bolsa de papel o frasco de boca ancha de color ámbar, hasta su utilización ^(15,18) .
- c) **Extracción de aceite esencial:** Se tomó aproximadamente de 10 Kg de hojas secas de la muestra que serán sometidos a destilación por el método de arrastre de vapor de agua.

Una vez destilado la separación será por diferencia de densidades entre el solvente extractor que es agua y la esencia, utilizando una pera de bromo, se tratará con Na₂SO₄ anhidro para quitarle las impurezas de agua, luego se filtrará el extracto de aceite esencial puro y se guardará en frasco de vidrio de color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C. ¹⁸ .

d) **Rendimiento del aceite esencial (%RAE)**

Se determina el porcentaje del rendimiento del aceite esencial (%RAE) realizándose por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de vidrio. A partir de 100 g de hojas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) se obtuvo un determinado volumen que fue medido con una probeta florentino. Por el método gravimetría-volumétrico y se determinó el % RAE, aplicando la siguiente fórmula. ¹⁸ .

% RAE = Vol. AE (mL)/ Pmuestra (g) x100 Dónde:

Vol. AE : Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

Pmuestra : Peso de la muestra a destilar en gramos.

$$\%X = \frac{1.2\text{ml}}{100} \times 100 = 1.2$$

e) **Caracterización de principales componentes químicos del aceite esencial.**

Se realizó por técnicas cromatografías y espectroscópicas. Empleando cromatógrafo de gas- detector de ionización de llama (GC-FID) y el cromatógrafo de gases–espectrómetro de masas Hewlett-Packard 6890 computarizado, en condiciones de muestra 0,1 mL de aceite esencial en 10 mL de etanol (1%); con columna Supelcowax™ 10 y metilsilicona SE-30 (30m x 0,25 mm i.d., 0.25um), a temperatura de inyección 250 °C, temperatura de horno a 60 – 220 °C (10 minutos), gas transportador helio y temperatura detector a 270°C¹⁸.

f) **Método para evaluar la actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus***

Método de Kirby – Bauer (método de difusión en agar) (Villarreal, 2003; Lansing et al., 2004)

La técnica de eficacia antimicrobiana realizado mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) lo cual define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Este método ha sido adaptado para evaluar la eficacia de una muestra con propiedades antimicrobianas frente a determinados microorganismos. Este método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicótico (disco de papel) en contacto con la superficie de agar, en la cual se ha distribuido previamente el microorganismo. De esta manera se formará, por difusión, un gradiente de concentración antimicótico alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo, lo cual está indicado, por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento antibacteriano. El diámetro obtenido (entre el disco y el crecimiento) dependerá, no solo de la sensibilidad del microorganismo y de la carga del disco si no también por el grosor de la capa del medio de agar Mueller

Hinton, su pH y composición, de la capacidad de difusión del antibacteriano en ese medio, de la temperatura y de la atmosfera de incubación, y su velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria. Todas estas, son las variables importantes que afectan el resultado del antibiograma.

Cada antimicótico establece concentraciones críticas y puntos de corte que van a permitir separar a los microorganismos en tres categorías: sensibles, resistentes y sensibilidad intermedia.

En estas categorías se establecerán por cada hongo frente a un agente antibacteriano, se comprobará la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada caso con puntos de cortes establecidos.

Este método de destilación del aceite esencial se obtendrá por arrastre de vapor. Se utilizará el aceite esencial por el método Bauer Kirby actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus áureas*, en tres concentraciones diferentes de la muestra; 0,1 mL/1 mL (10 por ciento), 0,15 mL/ 1 mL (15 por ciento), 0,25 mL/1 mL (25 por ciento) y como blanco de la muestra etanol absoluto 1uL/mL.

g) Preparación del Agar Mueller Hinton:

El agar Mueller - Hinton se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante con agua destilada. Se autoclavó el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar se dejó enfriar en baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado se vertió el preparado fresco y tibio a placas petri de vidrio estéril, para adquirir un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm, corresponderá tener 25 a 30 ml de placas de 100 mm de diámetro. En este medio el agar se dejó enfriar a una temperatura ambiente. El pH del agar Mueller Hinton tuvo un pH entre 7,2 y 7,4.

Esta medición se realizó sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar. ²².

h) Preparación de los inóculos bacterianos:

Se consideró colonias puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, estas cepas son cultivadas y reactivadas en los laboratorios del CENPROFARMA, UNMSM; se tomó una cierta cantidad de colonias y se diluyó en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico de tal manera que la solución resultante tenga una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de Mac Farland el cual corresponde a concentraciones de 3×10^8 UFC/mL.

En esta última solución se realizó una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada se tomó 3 mL y se diluyó a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados fueron estériles, así como también el área de trabajo. La solución resultante tuvo una concentración de 1×10^8 ufc/mL.

Bajo las mismas condiciones se realizó una dilución de 1 en 100 añadiendo 0.1 mL de la solución anterior a un tubo con 9.9 mL de suero fisiológico, la solución resultante tuvo una concentración de 1×10^6 ufc/mL. Se realizó una serie de diluciones para cada cepa por separado.

i) Inoculación de las placas:

Se Introdujo un hisopo estéril en un inóculo bacteriano preparado (1×10^6 ufc/mL) y antes de retirarlo se escurrió sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo. Se sembró la placa de agar Mueller-Hinton con el hisopo lo cual se obtuvo un crecimiento confluyente, para que se enfrie y con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60°c en

dos oportunidades. Estos cuidados se extremaron para sembrar en placas de borde a borde, porque de lo contrario se pudo generar problemas en la realización de las lecturas. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

j) Preparación de los discos de antibióticos:

Los discos de antibióticos fueron discos comerciales de la marca OXOID, Gentamicina 10µg.

k) Aplicación de los discos a las placas inoculadas:

Estos inóculos se colocaron con pinza estéril estando antes sobre el agar. Se presionó los discos levemente para que así puedan ser adheridos al mismo tiempo. Estuvieron de 15mm del borde de las placas y se distribuyeron de tal manera que no hubo superposición de los halos de inhibición. Estos discos de antibióticos fueron colocados de la siguiente manera:

- Dos discos del mismo antibiótico en cada placa inoculada con un microorganismo de tal manera que se obtuvieron resultados por quintuplicado, por lo tanto, las placas con discos de antibióticos fueron 5 placas con 5 discos en cada uno.
- Luego de colocarlos los discos las placas se incubaron a 35°C- 37°C durante 18-24 hs. Las placas se colocaron en forma invertida.

Los discos con la muestra del aceite esencial de *L. meyenii* (pacha salvia) a tres concentraciones (10, 15 y 25%) fueron colocados de manera similar solo que en este caso se hizo por quintuplicado, tres discos por cada placa, estos también se incubaron a 35°C-37°C durante 18-24hs.

3.5. Procesamiento de datos

En estos resultados serán presentados las tablas y figuras de histogramas sometidas a un Análisis de Varianza y en la Prueba de Tukey y así poder comprobar las diferencias entre las medias, en un 95 por ciento de confianza (Wayne, 2002).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Presentación

Los resultados se presentan en tablas y figuras, no aplica la medición de Durenfer. En la tabla 1 observamos los 15 metabolitos fotoquímicos de los cuales los compuestos mayoritarios fueron el 1R- α -Pinoeno, D-Limoneno y Eucaliptol.

Tabla N° 1: Composición química del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) determinado por CG-EM.

| Número | Nombre del compuesto (NIST08.L) | tR (min) | % en la muestra (áreas relativas) |
|--------|--|----------|-----------------------------------|
| 1 | α -Tujeno | 8.88 | 0.20 |
| 2 | 1R- α -Pinoeno | 9.17 | 21.37 |
| 3 | Canfeno | 9.66 | 0.51 |
| 4 | Desconocido(C ₁₀ H ₁₄) | 10.16 | 0.43 |
| 5 | β -Tujeno | 10.29 | 0.66 |
| 6 | β -Pinoeno | 10.41 | 6.82 |
| 7 | 3-Careno | 11.28 | 5.24 |
| 8 | o-Cimeno | 11.56 | 0.34 |
| 9 | p-Cimeno | 11.79 | 2.05 |
| 10 | D-Limoneno | 12.00 | 15.43 |
| 11 | Eucaliptol | 12.25 | 18.80 |
| 12 | Desconocido(C ¹⁰ H ¹⁸ O ²) | 15.02 | 0.71 |
| 13 | Desconocido(C ¹⁰ H ²⁰ O ²) | 15.69 | 0.25 |
| 14 | Desconocido(C ¹⁰ H ¹⁶ O) | 18.90 | 0.17 |
| 15 | 3-Pinanona | 19.81 | 0.79 |

Leyenda:

tR: tiempo de retención

NIST08.L: es una biblioteca de espectros de masas de ionización electrónica (EI) con 220.460 espectros revisados por pares de 192 .108 compuestos unidos ,con identificaciones y por lo general estructuras químicas.

De los 15 componentes encontrados en el aceite esencial:

9 son Monoterpenos (α -Tujeno, 1R- α -Pineno, Canfeno, β -Tujeno, β -Pineno 3-Careno ,o-Cimeno, p-Cimeno y eucaliptol) 1 Hidrocarburo terpenico (D- limoneno)

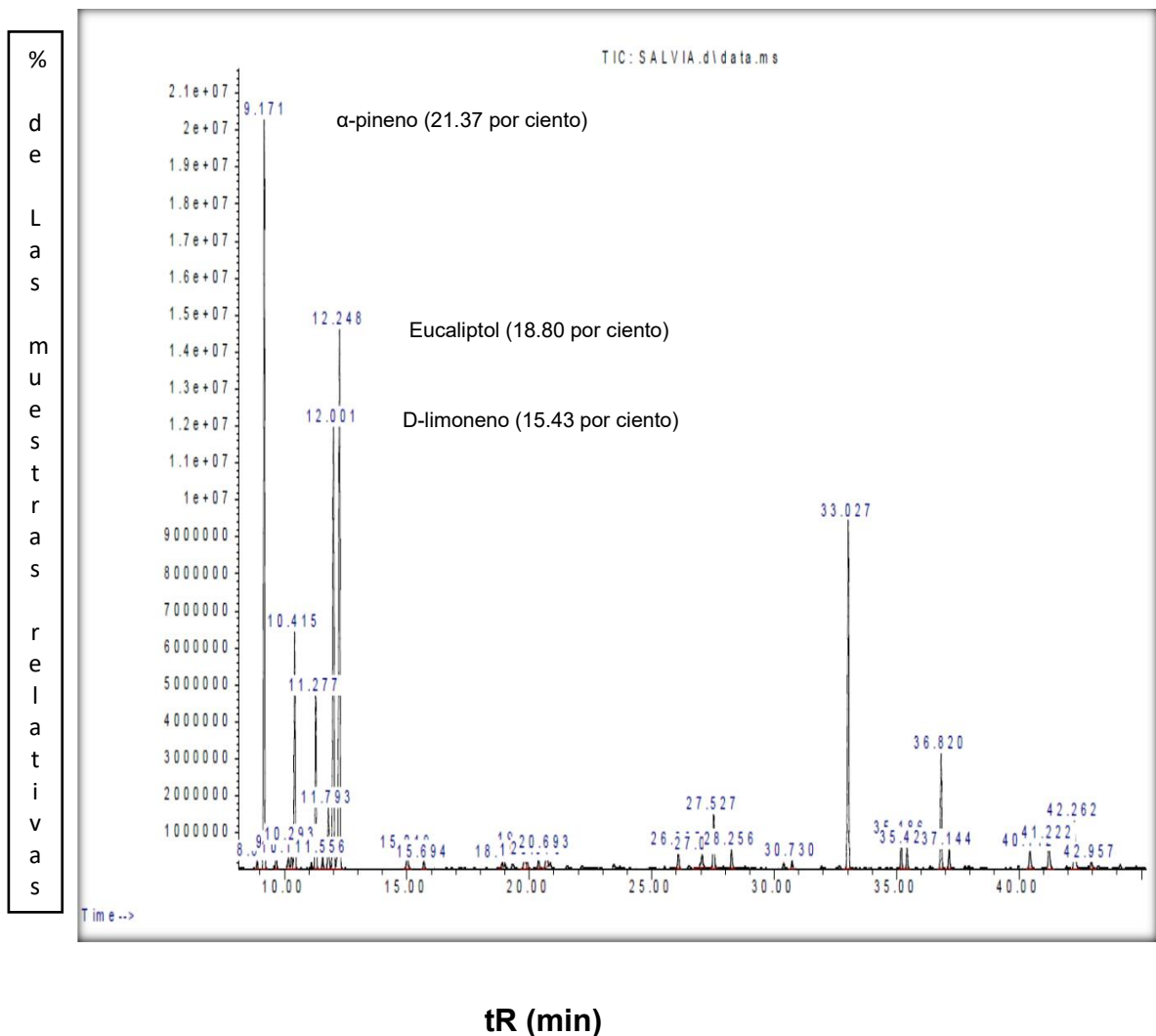


FIGURA 7. Cromatograma de los componentes principales del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) por cromatografía de gases

Los compuestos mayoritarios fueron:



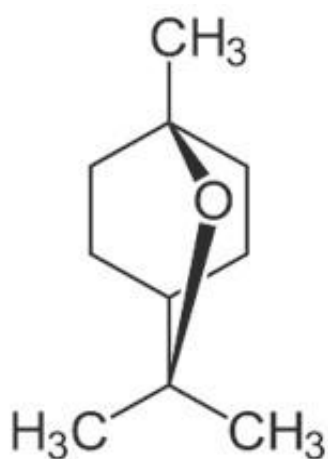
α -pineno

El α -pineno actúa como broncodilatador en los seres humanos, y presenta propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antibióticas.



d-limoneno

El D-limoneno es el monoterpene principalmente responsable de la fragancia de las frutas cítricas posee una fuerte fragancia a naranja en su forma aislada, y se usa de manera generalizada como aditivo del sabor en la producción de alimentos y como compuesto aromático en perfumería.



Eucaliptol

El eucaliptol o cineol es un monoterpeneoide y al mismo un éter cíclico aromático producido por numerosas plantas. Tiene un característico sabor y olor tipo menta que hace que se use mucho como aromatizante y saborizante en numerosos productos.

Tabla N° 2: Halos de Inhibición del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) a tres concentraciones frente al *Staphylococcus aureus*.

| FRECUENCIA | HALOS DE INHIBICIÓN (mm) | | |
|------------------|--|---------------|---------------|
| | Concentraciones de aceite esencial de <i>L.meyenii</i> | | |
| | 10 % | 15 % | 25 % |
| F1 | 11.79 | 13.41 | 13.30 |
| F2 | 11.10 | 13.02 | 17.80 |
| F3 | 11.53 | 13.78 | 20.70 |
| Media (X) | 11.473 | 13.403 | 17.266 |

La media de la muestra de la *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) se analizó en tres concentraciones de los cuales en el halo de inhibición del 10 por ciento la media es el 11.473 en el 15 por ciento del halo de inhibición la media es 13.403 y en el 25 por ciento del halo de inhibición la media es 17.266.

Contrastación de hipótesis

Tabla N° 3: Prueba T en cepa enfrentada de *Staphylococcus aureus* con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) a 10 % de concentración.

| | gl | Sig. | media | 95% Intervalo de confianza para la media | |
|--|----|------|--------|--|----------|
| | | | | Inferior | Superior |
| Halo de inhibición <i>Lepechinia meyenii</i> (mm) | 5 | 0,00 | 11.473 | 11.10 | 11.79 |

Prueba de hipótesis:

Ho: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es igual a cero.

H1: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es mayor a cero.

Dado que el p valor de la prueba t resulta ser menor a 0.05 (sig. = 0.000) se rechaza la Ho y se concluye que la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es diferente a cero lo que significa que si presenta eficacia antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*.

Intervalo de confianza:

La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) está entre 11.10 y 11.79mm

Tabla N° 4: Prueba T en cepa enfrentada de *Staphylococcus aureus* con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) a 15 % de concentración.

| | gl | Sig. | media | 95% Intervalo de confianza para la media | |
|--|----|------|--------|--|----------|
| | | | | Inferior | Superior |
| Halo de inhibición <i>Lepechinia meyenii</i> (mm) | 5 | 0,00 | 13.403 | 13.02 | 13.78 |

Prueba de hipótesis:

Ho: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es igual a cero.

H1: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es mayor a cero.

Dado que el p valor de la prueba t resulta ser menor a 0.05 (sig.=0.000) se rechaza la Ho y se concluye que la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es diferente a cero lo que significa que si presenta eficacia antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*.

Intervalo de confianza:

La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) está entre 13.02 y 13.78mm.

Tabla N° 5: Prueba T en cepa enfrentada de *Staphylococcus aureus* con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) a 25 % de concentración.

| | t | gl | Sig. | media | 95% Intervalo de confianza para la media | |
|--|--------|----|------|-------|--|----------|
| | | | | | Inferior | Superior |
| Halo de inhibición <i>Lepechinia meyenii</i> (mm) | 11,825 | 5 | 0,00 | 17,26 | 13,30 | 20,70 |

Prueba de hipótesis:

Ho: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es igual a cero.

H1: La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es mayor a cero.

Dado que el p valor de la prueba t resulta ser menor a 0.05 (sig. = 0.000) se rechaza la Ho y se concluye que la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es diferente a cero lo que significa que si presenta eficacia antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*.

Intervalo de confianza:

La media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) está entre 13.30 y 20.70mm.

Tabla N° 6: Estadísticos de grupo cepa enfrentada de *Staphylococcus aureus* con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia).

| Estadísticos de grupo | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---|-------|-----------------|------------------------|
| | Tratamiento | N | Media | Desviación típ. | Error típ. de la media |
| Halo de inhibición (mm) | Gentamicina 10µg | 2 | 30,00 | 0,000 | 0,000 |
| | <i>Lepechinia meyenii</i> | 6 | 17,00 | 3,521 | 1,438 |

Interpretación:

La media en la muestra del halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es 17 mm con una desviación típica de 3.52 mm, en el caso de la *Gentamicina* la media muestral fue de 30 mm con una desviación de 0.00.

Tabla N° 7: Prueba T para la igualdad de medias de cepas de *Staphylococcus aureus* enfrentada con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp.) (pacha salvia) frente a la **gentamicina**.

| | t | gl | Sig. (bilateral) | Diferencia de medias | Error típ. de la diferencia | 95% Intervalo de confianza para la diferencia | |
|--|-------|-------|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|----------|
| | | | | | | Inferior | Superior |
| Halo de inhibición (mm) | 9.043 | 5.000 | 0.000 | 13.000 | 1.438 | 9.305 | 16.695 |

Prueba de hipótesis:

Ho: La media del Halo de inhibición de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es igual a La media del Halo de inhibición de la **gentamicina**.

H1: La media del Halo de inhibición de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es diferente a la media del Halo de inhibición de la **gentamicina**.

Interpretación:

Los datos muestran una diferencia de medias de 13 mm y dado que el p valor de la prueba t resulta ser menor a 0.05 (sig.=0.000) se rechaza la Ho a favor de H1 y se concluye que las medias son diferentes, lo que significa que la Gentamicina presenta una eficacia antimicrobiana superior a la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) contra la cepa de *Staphylococcus aureus*. La diferencia de los halos esta entre 9.3 y 16.7 mm con un nivel de significancia del 95 por ciento.

4.2. Discusión

En la Tabla N° 1, se observa que son 15 metabolitos fitoquímicos identificados en el aceite esencial de la *Lepchinia meyenii* (pacha salvia) que se hallan en mayor proporción son: α -pineno (21.37 por ciento), eucaliptol (18.80 por ciento), D-limoneno (15,43 por ciento), α -bergamoteno (11.63 por ciento), β -pineno (6.82 por ciento), 3-careno (5.24 por ciento). Estos resultados se complementan con los estudios previos existentes como antecedentes de los componentes del aceite esencial, los resultados y los datos que servirán para futuros trabajos que se relacionen con los estudios farmacológicos y microbiológicos fueron reportados por primera vez. ¹⁵.

Alzamora *et al.*, ⁴ 2001, realizó el estudio de los aceites esenciales antimicrobianos *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling. Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron *aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231. Se empleó discos de antibióticos amoxicilina como controles. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*.

El aceite esencial de *Lepechinia mutica*, reportó 79 componentes, lo que representa el 97,3 por ciento de la muestra total. Los hidrocarburos sesquiterpénicos (38,50 por ciento) e hidrocarburos monoterpénicos (30,59 por ciento), mientras que los sesquiterpenos oxigenados (16,20 por ciento) y monoterpénos oxigenados (2,10 por ciento) fueron los componentes menores. Con el fin de caracterizar mejor el aroma del aceite, los olorantes más importantes, desde el punto de vista sensorial, fueron identificados por *Aroma Extract Dilution Analysis* (AEDA) GC-O. Se trata de α -pineno, β -phellandreno y dauca-5,8-dieno, que presentan los característicos olores leñosos, herbáceos y terrosos, respectivamente. Además, el aceite esencial mostró una actividad moderada *in vitro* contra cinco cepas fúngicas, siendo especialmente eficaz contra *M. canis*, que

es un agente causal zoófilo dermatófito zoofílico de infecciones de animales de compañía y humanos⁽⁸⁾. Estos resultados se relacionan muchísimo con los componentes del aceite esencial de ***Lepechinia meyenii*** (pacha salvia)

El aceite esencial de ***Lepechinia radula*** Benth Epling (Lamiaceae), extraída por hidro destilación de las partes aéreas, reportó 34 compuestos que al 93,4 por ciento del total del aceite. Los constituyentes principales del aceite esencial fueron **δ -3-careno** (19,9 por ciento), **β -pineno** (17,0 por ciento), (E) - β - cariofileno (9,7 por ciento) y (E - E)-/alpha - farneseno (9,4 por ciento). El aceite esencial de ***L. radula*** poseía un fuerte efecto antifúngico^[12]. Se identifica en el aceite esencial de la ***Lepechinia meyenii*** (pacha salvia) la presencia de **3-careno** (5.24 por ciento) y **β -pineno** (6.82 por ciento) ⁸.

Los estudios realizados de la ***Lepechinia caulescens***, especie empleada para tratar enfermedades gastrointestinales infecciosas reporta por CG-EM los componentes de borneol, alcanfor y trans-cariofileno. Asimismo el aceite esencial de esta especie es activo contra algunas cepas de *Vibrio cholerae* con 4 μ L/ mL de MIC y 6 μ L/ mL de MBC⁽⁶⁾. El aceite esencial de ***Lepechinia meyenii*** (pacha salvia) tiene también actividad antimicrobiana frente a las cepas ensayadas⁹.

En la Tabla N° 2, se presenta lo halos de Inhibición del aceite esencial de ***Lepechinia meyenii*** (Walp.) (pacha salvia) a tres concentraciones frente al ***Staphylococcus aureus***. En ella se observa que a mayor concentración de aceite esencial hay mayor halo de inhibición, siendo una media de 17.266 mm. Esto nos hace pensar que hay una mayor concentración de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana

14-16

En las tablas del N° 3 al N° 4 se reportan las estadísticas de la prueba T enfrentada a la cepa de ***Staphylococcus aureus*** con el aceite esencial de ***Lepechinia meyenii*** (Walp.) (pacha salvia). Realizando la

prueba de hipótesis la media del halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* es mayor a cero¹⁴⁻¹⁶.

Dado que el **p** valor de la prueba t resulta ser menor a 0.05 (sig. =0.000) se rechaza la H_0 y se concluye que la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es diferente a cero lo que significa que si presenta eficacia antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*¹⁴⁻¹⁶.

En la Tabla N° 5 el intervalo de confianza, fue la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) está entre 13.30 y 20.70 mm, para una concentración al 25 por ciento de aceite¹⁴⁻¹⁶.

En la Tabla N° 6 este hallazgo de la actividad anti-*Staphylococcus aureus* comparado con la gentamicina, con una media del halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) es 17 mm con una desviación típica de 3.52mm, en el caso de la *Gentamicina* la media muestral fue de 30mm con una desviación de 0.00¹⁴⁻¹⁶.

En la Tabla N° 7 se observa el intervalo de confianza ,fue la media del Halo de inhibición (mm) para la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) esta entre la inferior 9.305 y la superior 16.95 , lo cual el error típico de la diferencia fue 1.438¹⁴⁻¹⁶.

Existen estudios de aceites esenciales con actividad anti-*Staphylococcus aureus*, como es el caso de las hojas frescas de *Espeletia schultzii* Wedd (Asteraceae), el análisis de sus componentes volátiles por cromatografía de gases, espectrometría de masas (CG-EM) permitió la identificación de 13 componentes, que constituyeron el 100 por ciento del aceite esencial de los cuales los mayoritarios fueron **α -pineno (49,72 por ciento)**, **β -pineno (16,02 por ciento)** y **β -mirceno(14,42 por ciento)**²³.

La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó empleando los métodos de difusión en agar con discos y microdilución en caldo contra ***Staphylococcus aureus*** (ATCC25923)²³.

Estos resultados revelaron que la sensibilidad del método juega un papel preponderante en la evaluación de este aceite como antibacteriano. Se correlaciona con la actividad anti- ***Staphylococcus aureus*** del aceite esencial de la ***Lepechinia meyenii*** (pacha salvia) ya que también tiene en su composición las estructuras moleculares de **α -pineno y β -pineno** ²³.

Estudios de la evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto y el aceite esencial de las hojas de ***Chenopodium Ambrosioides*** L. “paico” en cepas de ***Staphylococcus aureus***, ***Staphylococcus epidermidis***, ***Escherichia coli***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Cándida albicans*** ²³.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

- 1) Se logró identificar 15 metabolitos del total analizado, de los cuales los compuestos mayoritarios del aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) son: α -pineno, D-limoneno y Eucaliptol . El resto de los metabolitos están por debajo del uno, por ciento de concentración.

- 2) Se observó que la concentración al 25 por ciento del aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) tiene mayor efecto antibacteriano frente a cultivos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* .

5.2. Recomendaciones

- 1) La *Lepechinia meyenii* (pacha salvia), el aceite esencial su efecto es antibacteriano, pero se debe de seguir investigando para otros proyectos que también tiene otros tipos de efectos para dicha enfermedad y así esto pueda servir de aporte para la sociedad, lo cual la demanda de salud es muy importante.
- 2) El estudio de investigación debe ser procesado por control de calidad y aprobado por el científico solo así se puede elaborar una forma farmacéutico y cumpliendo como lo dice según EL DECRETO SUPREMO 016-2011 cumpliendo estas normas será apto para el consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) **Cruz R et al.** Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de un gel para manos con nanomoléculas de cobre. *Revista argentina de dermatología*, 2017, vol. 98, no 1, p.46-54.
- 2) **Díaz Vélez C, Neciosup Puicán E, Fernández Mogollón JL, Tresierra Ayala MA, Apolaya Segura M.** Mortalidad atribuible a infecciones nosocomiales en un hospital de la Seguridad Social en Chiclayo, Perú. *Acta Med Peru.* 2016;33(3):250-2.
- 3) **Sunció S, Daniel, L, García Medina, D. G.** Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana in vitro de *Clidemia hirta* L Don "L. mutica" por el método de disco difusión, frente a microorganismos patógenos [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica;2016.
- 4) **Alzamora Libertad, Morales Liliana, Armas Lourdes, Fernández Gilma.** Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Revista Peruana de Biología*, 2014, Vol. 62, nº 2, p 156-161.
- 5) **Castillo Romero PC.** Estudio químico y de actividad: antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). 2011. UPCP. Tesis.
- 6) **Bravo O et al.** *Minthostachys mollis* griseb y *Lepechinia meyenii* walp epling: actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. *Revista del CIZAS Nov*, 2014, vol. 5, no 1, p. 7-23

- 7) **Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O.** Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 2013, 88(2), 199-204.
- 8) **Morocho V, Toro ML, Cartuche L, Guaya D, Valarezo E, Malagón O et al.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Lepechinia radula* Benth Epling. *Records of Natural Products* 2017; 11(1), 57.
- 9) **Acevedo JGA et al.** In vitro anti-Vibrio cholerae activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. *Fitoterapia*, 2015, vol. 76, no 1, p. 104-107.
- 10) **Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Esteban JL, Guzmán CA, Zygadlo JA, Ariza-Espinar L.** Essential Oil of *Lepechinia floribunda* (Benth.) Epl. *Journal of Essential Oil Research* 1994; 6(5): 539-540.
- 11) **Bonilla P, Lozano N, Arroyo J, Beltrán H.** Efecto sobre la gravidez, la prolactina y hormonas sexuales en ratas del sub extracto metanólico de hojas de *Tagetes filifolia* "Anisillo". *Ciencia e Investigación*. 2008; 11(1):7-14.
- 12) **Jara VL.** Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Tagetes filifolia* "anisillo" sobre cepas de *Escherichia coli*. Lima [Tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Alas Peruanas, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2015.
- 13) **Figuroa SF.** Actividad anti-fúngica "in vitro" del extracto alcohólico y aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* "romero" potencializado con ozono sobre la *Candida albicans* cepa ATCC 10231. [Tesis para optar el grado Odontólogo]. Ecuador: Universidad Nacional de Chimborazo Riobamba, Facultad de Ciencias de la Salud; 2016.
- 14) **Carhuapoma YM.** *Plantas aromáticas nativas del Perú Biocomercio*

- de fragancias, sabores y fitocosméticos*. (1ra ed.). Lima: CONCYTEC; 2011.
- 15) **Carhuapoma YM**. Taxonomía de plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNSCH. 2003.
 - 16) **Carhuapoma YM**. Composición química, actividad anti- *Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "Urqu muña" [tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2007.
 - 17) **Bruneton J**. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2da. Edición. Zaragoza – España: Acribia S.A. 2001
 - 18) **Bandoni LA**. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As; 2002.
 - 19) **Muñoz LF**. Plantas Medicinales y Aromáticas estudio cultivo y proceso. Mundi – Prensa Madrid Barcelona; 2002.
 - 20) **Zouhir Abdelmajid et al**. ANTISTAPHYBASE: database of antimicrobial peptides (AMPs) and essential oils (EOs) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus aureus*. *Archives of microbiology*, 2017, vol. 199, no 2, p. 215-222.
 - 21) **Ramos García, M. D. L, Bautista-Baños, S. Barrera- Necha, L. L., Bosquez-Molina, E, Alia-Tejacal, Estrada- Carrillo, M**. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología* 2010, 28(1), 44-57
 - 22) **Pisano, M. B., Fadda, M. E., Melis, R., Ciusa, M. L., Viale, S.,**

- Deplano, M., Cosentino S.** Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control* 2015, 51, 1-8.
- 23) Alarcón L, Peña A, Velasco J, Usubillaga A, Contreras B, **Rojas L et al.** Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzii* wedd (asteraceae) recolectada en el estado Trujillo–Venezuela. *Revista Academia*. 2016;(15): 69-79.
- 24) **Chambi QLD, Pacheco MKP.** Evaluación del Efecto Antimicrobiano In Vitro del Extracto y el Aceite Esencial de la Hojas de *Chenopodium Ambrosioides* L. “Paico” en Cepas de *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomona Aeruginosa* y *Cándida Albicans* [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017.
- 25) **Velásquez M., Álvarez, RM., Tamayo, PJ., Carvalho CP.** Evaluation in vitro of the fungistatic activity of the mandarin essential oil on the growth of *Penicillium sp.* *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2014: 15(1), 7-14.
- 26) **Price JR, Cole K, Bexley A, Kostiou V, Eyre DW, Golubchik, T, Llewelyn MJ.** Transmission of *Staphylococcus aureus* between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing. *The Lancet Infectious Diseases* 2017, 17(2), 207-214.
- 27) **Deatherage DE, Kepner JL, Bennett AF, Lenski RE, Barrick, J. E.** Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017, 114(10), E1904-E1912.
- 28) **Dowhan W, Bogdanov M, Mileykovskaya, E., Vitrac H.** Functional

Roles of Individual Membrane Phospholipids in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes 2017, 1-22.

- 29) **Shyamala R, Reddy PS.** Incidence and sensitivity pattern of Pseudomonas aeruginosa in chronic suppurative otitis media in South Indian Rural Population. Journal of Microbiology and Biotechnology Research 2017; 2(2): 346-350.
- 30) **Nakajima S, Harrison O, Linehan JL, Belkaid Y.** Candida albicans colonization exacerbates skin inflammation in a murine model of psoriasis, 2017.
- 31) **Prat G, Serrat H, Arriagada D, Andresen M.** Biodisponibilidad relativa de Gentamicina, Laboratorio Chile SA. ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas 2017; 16(1):46-47.
- 32) **Sánchez R., Serrano J., Marfil N., Jodral V.** Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: Fundamentos de seguridad [Internet]. [España]: Díaz Santos; 2009. [Consultado: 30 de agosto del 2017].

Disponible en:

<http://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479789220.pdf>

ANEXOS

ANEXO N° 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE “*Lepechinia meyenii*” (pacha salvia) EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS *Staphylococcus aureus*

| PROBLEMA GENERAL | OBJETIVO GENERAL | HIPOTESIS GENERAL | CLASIFICACION DE VARIABLES | DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES | METODOLOGIA | POBLACION MUESTRA Y MUESTREO | INSTRUMENTO |
|--|---|--|--|---|--|--|--|
| ¿ Tendra efecto antibacteriano el aceite de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de <i>Staphylococcus aureus</i> ? | Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de <i>Staphylococcus aureus</i> | El aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) tiene efecto antibacteriano en cultivos microbiológicos de <i>Staphylococcus aureus</i> . | V1: INDEPENDIENTE | TERAPEUTICO | PROPOSITO : Aplicado ENFOQUE : Cuantitativo SECUENCIA TEMPORAL : Longitudinal TEMPORALIDA: Prospectivo ASIGNACION DE FACTORES : Experimental FINALIDAD : Analítico DISEÑO ESPECIFICO: Ensayo pre clínico NIVEL : Experimental | POBLACION : Agar Mueller Hinton MUESTRA : 15 placas Petri con agar Mueller Hinton MUESTREO : No probabilística Consecutiva | La técnica empleada en esta investigación será la observación estructural ,no participante individual de el laboratorio el instrumento a ser empleado será una ficha de observación AD – HOC Elaborado por el investigador y debidamente validados para los estudios específicos . |
| PROBLEMAS ESPECIFICOS | OBJETIVOS ESPECIFICOS | HIPOTESIS ESPECIFICOS | Extraccion del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) | Tipo tratamiento administrativo | | | |
| P.E.1 : ¿Qué tipo de metabolitos secundarios contiene el aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia)? | O.E.1: Determinar cuales son los tipos de metabolitos secundarios presentes en la <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia). | H.E.1 : El aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) contiene metabolitos con actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . | V2: DEPENDIENTE | | | | |
| P.E. 2 : ¿ A que concentración el aceite esencial de la <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) presenta efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ? | O.E.2 :Determinar la concentración del aceite esencial de la <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) que tendrá efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . | H.E.2 : El aceite esencial de la <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) presenta efecto antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones . | Extraccion bacteriana | MICROBIOLOGIA Microbiológica | | | |

ANEXON° 2: VARIABLES

Tabla de Operacionalizacion de Variables

| Variable | Dimensiones | Indicadores | Unidad de Medida |
|---|----------------------------|--|-------------------------|
| Variable Independiente (x) Aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) | Metabolitos Secundarios | Terpenos | % CG-EM |
| Variable Dependiente | | Indicadores | Unidad de Medida |
| Variable dependiente (Y) Actividad antibacteriana de <i>Lepechinia meyenii</i> (pacha salvia) | Microbiológico | 10% de concentración 15% de concentración 25% de concentración | mm. |

ANEXO N° 3: TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS



FIGURA N° 8. Recoleccion y desecación de las hojas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia)

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy



FIGURA N° 9. Hojas de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) envueltas en papel y frasco

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy



FIGURA N° 10. Extracción del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (pacha salvia)

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy



FIGURA N° 11: Cultivo de la bacteria ***Staphylococcus aureus***

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy



FIGURA N° 12. Crecimiento de la bacteria ***Staphylococcus aureus.***

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy



FIGURA N° 13: Resultados Halos de inhibición del aceite esencial de la *Lepechinia meyenii* (pacha salvia) contra las cepas de *Staphylococcus aureus* comparado con la gentamicina.

Fuente propia de los investigadores Cecilia Gomez y Eusebia Godoy

ANEXO N° 4: TAXONOMÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 258-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (muestra estéril) recibida de Cecilia Edith Gomez Callupe y Eusebia Godoy Quispe, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica; ha sido estudiada y clasificada como: *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Lepechinia*

ESPECIE: *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling

Nombre vulgar : "Pacha salvia"

Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere pertinente.

Lima, 26 de junio de 2018




Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb