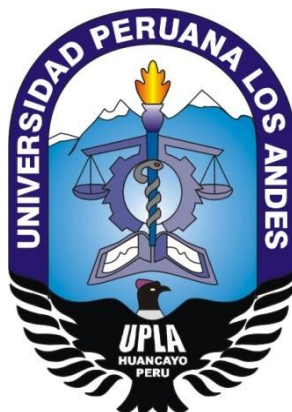


UNIVERSIDAD PERUANA LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL
DE *Piper aduncum* "MATICO" SOBRE *Escherichia coli***

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Bachiller KATIA FLORES PALACIOS
Bachiller MARIBEL ROSARIO PUENTE PUENTE**

HUANCAYO – PERÚ

2016

ASESOR

Mblgo. JAIME WESTER CAMPOS

DEDICATORIA

A mis padres Ana María y Moisés, las personas más importantes de mi vida, porque sin ellos yo no sería nada, gracias por brindarme una educación plena, que me permite ser lo que soy.

A mis maestros, gracias por su tiempo, apoyo y sabiduría transmitida en el desarrollo de mi formación profesional.

Katia Flores Palacios

A Dios por la vida y la fortaleza para seguir adelante.

A mis padres Yasminda y Esteban, por darme la vida, llenarla de amor, buenos ejemplos; por confiar en mis capacidades y brindarme lo necesario para cumplir este paso, gracias a ellos soy quien soy.

A todas las demás personas que indirectamente colaboraron en la realización de mi trabajo.

Maribel Puente Puente

AGRADECIMIENTO

A Dios, por habernos concedido llegar hasta este punto, alcanzando nuestros objetivos con felicidad y alegría. Gracias a ti fuimos fuertes frente a las adversidades de la vida, aprendimos a afrontar y alcanzar cada reto planteado. Gracias Señor por enseñarnos día a día que los sueños se pueden alcanzar y que un quiero siempre vendrá acompañado de un puedo.

Al Sr. Jorge Luna Villanueva, por todo el apoyo brindado en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud de esta casa de estudios, así como por sus acertados consejos.

A nuestros padres, por habernos dado esta vida que hoy nos permite alcanzar nuestras metas llenas de satisfacción y alegría.

Al Mblgo. Jaime Wester Campos, por los valiosos aportes que hicieron posible el avance y culminación nuestro anhelado trabajo de investigación.

RECONOCIMIENTO

A la Universidad Nacional del Centro del Perú, especialmente a la Facultad de Ingeniería e Industrias alimentarias, por todo el apoyo brindado durante nuestra estancia en sus laboratorios, por habernos permitido pertenecer a ellos; así como por los múltiples mensajes de aliento que posibilitaron hacer de nuestro trabajo un proyecto más completo.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	<i>i</i>
AGRADECIMIENTO	<i>ii</i>
RECONOCIMIENTO	<i>iii</i>
ÍNDICE	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	
1.1 Planteamiento del problema	10
1.2 Descripción y delimitación del problema	11
1.3 Formulación del problema	12
1.4 Objetivos	12
1.5 Justificación	13
1.6 Marco Teórico	14

1.7 Definición de conceptos clave	33
CAPÍTULO II: MÉTODO	
2.1 Método científico	35
2.2 Tipo y nivel de investigación	35
2.3 Diseño de investigación	36
2.4 Población	36
2.5 Muestra	36
2.6 Variable de Investigación	36
2.7 Técnicas de recolección de datos	37
2.8 Procesamiento de los datos	39
CAPÍTULO III: RESULTADOS	40
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	50
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	51
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS	

RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper aduncum* “MATICO” SOBRE *Escherichia coli*

La presente investigación se planteó como objetivo general evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* (“matico”) sobre *Escherichia coli*. Se empleó el método observacional, con recolección de datos y análisis en laboratorio; fue un estudio de tipo básico, prospectivo de nivel descriptivo. Se aplicó un diseño no experimental (descriptivo transversal) y se trabajó con cinco muestras de aceite esencial obtenido a partir de ejemplares diferentes de matico procesadas mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor. El cultivo de *E. coli* fue aislado a partir de muestra de heces de un paciente diagnosticado con enterocolitis y que aún no recibía tratamiento farmacológico; al cual se le aplicó un antibiograma según la técnica de Kirby-Bauer con discos de sensibilidad problema (embebidos con aceite esencial) control negativo (embebidos con agua destilada estéril) y control positivo (trimetropim/sulfametoxazol). Una vez realizados los antibiogramas se procedió a la medición de los halos netos de inhibición y su comparación con las tablas estandarizadas. Se obtuvo un promedio de 3,0 mL de aceite esencial de *P. aduncum* (“matico”) mediante destilación por arrastre de vapor, a partir de 250 g de hojas seleccionadas y 4.0 L de agua bidestilada y se determinó que el aceite esencial no posee actividad antibacteriana frente a *E. coli* mediante la técnica de Kirby-Bauer.

PALABRAS CLAVE: Actividad antibacteriana, *Piper aduncum*, *Escherichia coli*, Kirby-Bauer

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Piper aduncum* “MATICO” ESSENTIAL OIL OVER *Escherichia coli*

The present research pursued as general objective to evaluate the antibacterial activity of *Piper aduncum* (“matico”) essential oil over *Escherichia coli*. The observational method was employed, with data collection and laboratory analyses; it was a basic, prospective study and of descriptive level. It was applied a not experimental design (transversal descriptive) and worked with five samples of essential oil obtained from different samples of Matico processed by distillation by steam stripping technique. The *E coli* culture was isolated from a feces sample from a patient diagnosed with enter colitis who did not received pharmacology treatment; which was applied an antibiogram by the Kirby- Bauer technique with sensibility problem discs (embedded with essential oil), negative control (embedded with sterile distilled water) and positive control (trimetropim/ sulfametoxazol). Once the antibiograms were performed there were measured the net inhibition hales which were compared with standardized tables. It was obtained an average of 3.0 mL of *P. aduncum* (“matico”) essential oil through distillation by steam stripping from 250 g of selected leaves and 4.0 L of bidistilled water and determined that the essential oil do not have antibacterial activity over *E. coli* through the Kirby- Bauer technique.

KEYWORDS: Antibacterial activity, *Piper aduncum*, *Escherichia coli*, Kirby-Bauer

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización Mundial de Salud (OMS) ,¹ actualmente el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica. La terapéutica tradicional se basa sobre todo en el empleo de infusiones o principios activos de las plantas.

Durante el último decenio, la Asamblea Mundial de la Salud ha emitido numerosas resoluciones en respuesta al interés que vuelve a manifestarse por el estudio y empleo de la medicina tradicional en la asistencia médica y en reconocimiento de la importancia que tienen las plantas medicinales para los sistemas sanitarios de muchos países en desarrollo.²

En el Perú, por sus condiciones climáticas y por la diversidad de las biorregiones existe una abundante flora silvestre cuyas aplicaciones medicinales aún no están muy difundidas.

Por otro lado, la cada vez más creciente y desarrollada búsqueda de fármacos de origen sintético capaces de combatir un mayor número de agentes patógenos aunada al uso irracional de los mismos ha conllevado a la aparición de microbios resistentes y la aparición de efectos secundarios indeseables o reacciones adversas, además de su costo muchas veces elevado que los hace inaccesibles para las grandes mayorías; ha conducido a la búsqueda de terapias naturales alternas, muchas de las cuales se encuentran la alcance pero sin mayor sustento técnico que permita determinar su real efecto.

El vegetal denominado comúnmente “matico” (*Piper aduncum*) se caracteriza por contener numerosos glucósidos, especialmente de tipo flavonoide, los cuales muy probablemente le brindarían un efecto antibacteriano, carminativo, astringente, entre otros; lo cual hace de esta planta una de las razones para la búsqueda de metabolitos secundarios que podrían ser usados como alternativa terapéutica frente a enfermedades infecciosas; lo cual ha conducido a que sea empleada para el tratamiento de enfermedades de tipo entérico.³

Escherichia coli es una bacteria que puede producir infecciones entéricas (diarrea, disentería y colitis hemorrágica) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteremias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares). Además de ser el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones principalmente en la población infantil.⁴

1.2 DESCRIPCIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En el presente estudio se obtuvo y se analizó el aceite esencial de la especie vegetal *Piper aduncum* (“matico”), procedente del distrito de Puerto Bermúdez (Provincia de Oxapampa, departamento de Pasco).

Posteriormente se determinó su actividad antibacteriana *in vitro* sobre un cultivo de *Escherichia coli* aislado e identificado a partir de muestras de pacientes con enterocolitis atendidos en el Hospital Regional Docente Materno Infantil El Carmen de la ciudad de Huancayo.

Por tanto, las inferencias derivadas del presente estudio sólo pueden ser válidas para aceite esencial del “matico” y la bacteria sobre la cual se realizaron los ensayos (antibiogramas), con estos datos se determinó el grado de susceptibilidad que presenta *E. coli* frente al aceite esencial, de tal manera que permitió conocer su efectividad sobre la cepa sometida a estudio.

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* (“Matico”) sobre *Escherichia coli*?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper aduncum* (“Matico”) sobre *Escherichia coli*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener aceite esencial de *Piper aduncum* (Matico) mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor.
- Aislar e identificar a *Escherichia coli* a partir de muestras de heces diarreicas.

- Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. mediante la técnica de Kirby-Bauer.

1.5 JUSTIFICACIÓN

1.5.1 Teórica

Con la presente investigación se permite conocer de manera técnica y demostrable la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. aduncum* a fin de poder determinar su actividad *in vitro* frente a bacterias Gram negativas como *E. coli*; con ello se incrementará el conocimiento teórico sobre las capacidades medicinales de este vegetal.

1.5.2 Social

Este trabajo proporciona información sobre el poder antibacteriano del aceite esencial del Matico, como posible tratamiento alternativo frente a las infecciones intestinales, dando a conocer a la población la importancia de su correcto uso y empleo terapéutico para las patologías intestinales causadas por este agente patógeno.

1.5.3 Metodológica

La evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *P. aduncum* frente a *E. coli* se realizó empleando métodos y técnicas microbiológicas estandarizadas, actuales y disponibles que permitieron analizar su efecto *in vitro* mediante la medición de los halos de inhibición según la técnica de Kirby-Bauer.

1.6 MARCO TEÓRICO

1.6.1 Antecedentes de estudio

Hammer K., Carson C. y Riley T. (1999)⁵ estudiaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de 52 plantas, incluyendo a *Cymbopogon citratus*, frente a diez microorganismos (*Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*); encontraron la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada una de las plantas frente a dichos microorganismos.

Albado E., Saez G. y Grabiell S. (2001)⁶ evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua, frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, las cuales mostraron diferentes grados de sensibilidad; concluyendo que dicho aceite esencial posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *P. aeruginosa*.

Lima O. (2003)⁷ estudió *in vitro* la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas medicinales como *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Citrus limonium* (limón), *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Eugenia caryophyllus* (clavo), *Vismia macrophylla* (pichirina), *Lippia alba* (bálsamo), *Matricaria chamomilla* (manzanilla), *Pneumus boldus* (Boldo), *Ruta graveolens* (rue) y *Zingiber officinalis* (jengibre) en cepas de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Los resultados obtenidos demostraron que los aceites de *M. chamomilla*, *V. macrophylla*, *C. zeylanicum* y *E. globulus* mostraron moderada actividad para *E. coli* y *S. tiphy*; mientras que *C. limonium* destacó por presentar buena actividad (76 %) frente a *E. coli* y *S. tiphy*.

Ruíz Q. y Roque A. (2009)⁸ investigaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas *Cassia reticulata* *Ilex guayusa* L., *Piper lineatum* y *Terminalia catappa*), de los cuales ocho (67%) presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y uno (8%) frente a *Escherichia coli*.

Marín J. (2009)⁹ reveló que el extracto hidroalcohólico de *Vismia cayennensis* exhibió actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y *Shigella* sp., la cual se vio reflejada en los halos de inhibición observados, usando como control positivos terramicina y vibramicina. En el análisis fitoquímico de la corteza se evidenció presencia de flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y triterpenos, demostrando que podrían ser responsables de su actividad antimicrobiana.

Kiran B., Lalitha V. y Raveesha K. (2011)¹⁰ realizaron la evaluación *in vitro* de seis aceites esenciales extraídos de hojas, tallos y rizomas de plantas como: *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Curcuma longa*, *Capsicum annum* y *Cassia fistula* ensayados contra cinco tipos de bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Streptococcus pneumoniae*). En el ensayo antibacteriano *A. sativum* registró inhibición máxima frente a todas las bacterias de prueba, seguido de *C. longa* y *C. cyminum*; no se registró ninguna actividad antibacteriana en *C. fistula*.

Bastos M. y col. (2011)¹¹ evaluaron la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium* y 3 cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli*. El aceite esencial no presentó efecto para *P. aeruginosa*, pero se comprobó su actividad frente a los géneros evaluados.

Vivanco R. y col. (2012)¹² evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Mill) “perejil”, demostrando actividad significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* a concentraciones de 100 y 50%; para *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración de 100%; teniendo de poca a ninguna actividad frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

1.6.2 Bases teóricas

A. Matico

1. Descripción geográfica

Posee un hábitat bastante amplio, pero principalmente se le encuentra en lugares donde el clima es templado y tropical; habiéndose hallado ejemplares hasta a 3500 m.s.n.m. Abunda de manera especial en el Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Brasil y norte de Argentina, prefiere los lugares húmedos en las orillas de los riachuelos, en los fangos, etc., adaptándose fácilmente a cualquier clima.¹³

2. Descripción botánica¹⁴

Es una planta magnoliopsida semi-arbustiva arbórea que presenta un tallo cilíndrico, ramificado leñoso que a su vez presenta nudos prominentes y abultados.

Presenta hojas simples, sésiles, estipuladas, enteras alternas, penninervias de apariencia muy rugosa por el haz y con las nervaduras sobresalientes en forma de malla por el lado del envés. Su inflorescencia es en espiga simple, densa o compuesta con flores pequeñas hermafroditas aclamídeas, desnudas acompañadas de una bráctea que va a tener un ovario supero con dos estambres. Su fruto es una drupa y su semilla es inseminal, no presenta cáliz ni corola.



Figura 1. Hojas de *Piper aduncum* (matico)

Fuente: Brako L, y Zarucchi JL., 1993¹⁵

3. Ubicación taxonómica¹⁶

División :Magnoliophyta
Clase :Magnoliopsida
Sub Clase : Magnollidae
Orden : Piperales
Familia : Piperaceae
Género :Piper
Especie : *Piper aduncum* L.

4. Características fitoquímicas¹⁷

El componente más importante, desde el punto de vista cuantitativo y al que se atribuye en parte sus virtudes cicatrizantes, es el tanino. Esta sustancia se encuentra en una concentración de 5,7%. Otros constituyentes importantes son varios tipos de alcaloides, a los que se les confiere un efecto relajador de la musculatura lisa. Por último, se señala la presencia de numerosos glucósidos, especialmente de tipo flavonoide.

En *P. aduncum* el compuesto principal es la Canfora (22.68%), seguido de Canfene (21.18%) e Isoborneol (11.53%); también presenta alfa pineno, mirceno, limoneno, borneol y terpinol acetato. El aceite esencial contiene 5-metoxi-6(2'-propen)-benzodioxole, dillapiol, etoxidillapiol, mirisicina y piperitona.

5. Usos en medicina tradicional¹⁸

La medicina tradicional le atribuye propiedades variadas. Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias, en lavados antisépticos sobre heridas y en infusión para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno), en dolencias gástricas e intestinales ("empacho", diarreas agudas o crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para hacer gárgaras.

En la selva lluviosa amazónica los nativos la usan como antiséptico. En Perú fue utilizado para contener hemorragias y tratar úlceras y en Europa se ha usado para el tratamiento de los órganos genitales y afecciones renales. Es usada como emoliente y protector de la piel comercializado en forma de jabón antiséptico. Algunos estudios de laboratorio han confirmado sus propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y antisépticas.

B. Aceite esencial

1. Definición

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una proporción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos). Proporcionan el aroma característico a algunas flores y semillas, son productos químicos intensamente aromáticos, volátiles y poco densos.¹⁹

2. Características generales²⁰

Los aceites esenciales son de aspecto oleoso, altamente volátiles, solubles en aceites, alcohol, éter de petróleo, tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos; insolubles en agua aunque le transmiten su perfume; son inflamables, responsables del aroma de las plantas, colores y sabores, a veces dulces o amargos, con densidad generalmente inferior a la del agua.

Están compuestos en su mayor parte por hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que se encuentran con otros compuestos, casi siempre oxigenados. La mayoría de los aceites son menos densos que el agua (salvo excepciones como los aceites esenciales de canela, safrán y clavo) y con un alto índice de refracción.

Se les atribuyen variadas funciones en las plantas como protección frente a insectos y herbívoros adaptación frente al estrés hídrico y son de gran importancia en la polinización, debido a que constituyen elementos de comunicación química por su volatilidad y marcado olor.

3. Clasificación de los aceites esenciales²¹

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios:

a) Por su consistencia.- Se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.)

b) Por su origen.- Se clasifican en naturales, artificiales, o sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación fisicoquímica o química, son costosos y de composición variada. Los artificiales se obtienen por enriquecimiento de esencias naturales con uno de sus componentes; también se preparan por mezclas de varias esencias naturales extraídas de distintas plantas. Los sintéticos son mezclas de diversos productos obtenidos por procesos químicos, son más económicos y por lo tanto se utilizan mucho en la preparación de sustancias aromatizantes y saborizantes.

c) Por la naturaleza química.- Según la estructura química de los componentes mayoritarios que determinan el olor particular de los aceites, estos se dividen en tres grupos principales: Monoterpenoides (linalol, nerol, 1-8 cineol y geraniol), Sesquiterpenoides (farnesol y nerolidol) y Compuestos oxigenados (alcoholes, aldehídos y cetonas).

4. **Extracción de los aceites esenciales**²²⁻²³

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varias técnicas como son:

a) Destilación por arrastre de vapor.- Proceso basado en que la mayoría de partes aromáticas presentes en una materia vegetal pueden ser arrastradas por el vapor de agua. Es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición.

Los vapores salen y se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles (agua y aceites esenciales) finalmente se separan en un decantador o vaso florentino. Esta técnica tiene muchas ventajas como por ejemplo:

- El vapor de agua es muy económico en comparación al costo de los disolventes orgánicos.
- Asegura que no se recaliente el aceite esencial.
- No requiere uso de equipos sofisticados.

b) Procesos de expresión aplicados a los cítricos.- Procesos aplicados generalmente a frutos de cítricos cuyas esencias se encuentran en las cáscaras y su aplicación es muy antigua. El proceso ocurre en varias etapas:

- Laceración de la epidermis y de las celdas que contienen la esencia.
- Creación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.

- Abrasión de la cáscara con la formación de pequeñas partículas de la raspadura. La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara y en ambos procesos se puede realizar con un proceso manual o mecánico.

Esta técnica se basa en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar en forma inmediata la esencia, para evitar que sea adsorbida por la corteza esponjosa que resulta después del proceso. Por esta razón los equipos de extracción de cítricos cuentan con un sistema de aspersión de agua que moja constantemente la superficie del fruto.

c) Extracción con solventes volátiles.- La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura.

Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles.

d) Enflorado o enfleurage.- El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otro medio físico-químico. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

e) Extracción con fluidos supercríticos.- Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura.

Presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

C. *Escherichia coli*

1. Características generales²⁴

También conocida por la abreviación de su nombre *E. coli*, es quizás el microorganismo procarionta más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo).

Es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), con un tamaño promedio de 1,1 - 1,5 μm de ancho y 2,0 - 6,0 μm de largo, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular.

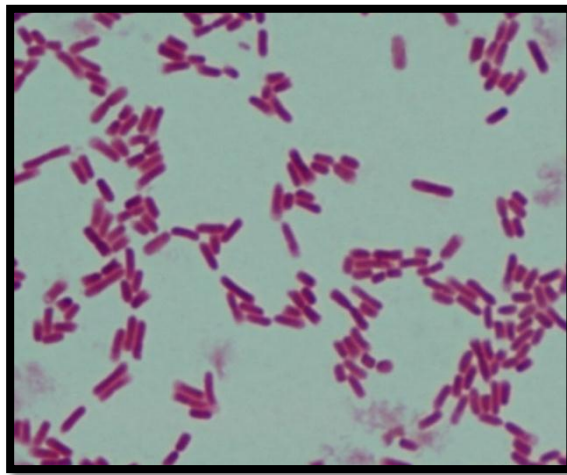


Figura 2. Observación microscópica de *E. coli*

Fuente: Brooks G. y col., 1996²⁵

2. Clasificación²⁶⁻²⁷

Las cepas patógenas están agrupadas en seis grupos patogénicos:

a) *E. coli* enterotoxigénica (ECET).- Este grupo se caracteriza por ocasionar diarrea en personas que estuvieron en países en desarrollo (diarrea del viajero). Esta bacteria se caracteriza por la producción de enterotoxinas, las cuales inducen la secreción de agua y electrolitos dentro del lumen intestinal, de manera similar a *V. cholerae*. Las enterotoxinas son del tipo termo lábil (LT) y termoestable (ST), y colonizan a nivel del intestino delgado mediante adhesinas fimbriales; por lo que esta bacteria no es invasiva.

b) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI).- Esta bacteria causa la disentería bacilar, con un cuadro similar al provocado por *Shigella*, la cual comparte genes de virulencia con *E. coli*. ECEI puede invadir y proliferar en las células epiteliales de la mucosa del colon, llegando a matar las células. Clínicamente se caracteriza por la presencia de sangre y moco en las heces, acompañado de calambres abdominales, vómito, fiebre y malestar general en los pacientes infectados.

c) *E. coli* enteropatógena (ECEP).- Es el grupo causante del mayor índice de casos de diarrea infantil en los países en desarrollo. Se caracteriza por la producción de la proteína intimina, una adhesina tipo no fimbrial la cual media la adhesión a la mucosa intestinal. Causa diarrea acuosa o sanguinolenta, la cual se asocia a la adhesión. Produce características histopatológicas similar a la ECEH, conocida como lesión de fijación y borramiento; la cual es esencial para una completa patogenicidad.

d) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH).- Las características clínicas de este grupo incluyen náuseas, dolor abdominal, diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia púrpura. Producen verotoxinas las cuales son el factor de virulencia más importante.

e) *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg).- Este grupo se asocia con la diarrea aguda y persistente en niños. Esta bacteria no secreta enterotoxinas y se caracteriza por la producción de una estructura denominada fimbria de adherencia agregativa, la cual al adherirse a las células intestinales induce un acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica y una respuesta inflamatoria, produciendo una estimulación de la secreción mucosa manifestada por diarrea acuosa con moco y fiebre.

f) ***E. coli* adherente-difusa (ECAD).**- Estudios recientes involucran a esta cepa como el agente causal de diarreas en niños; en donde la susceptibilidad a este patógeno es edad dependiente. Este grupo se caracteriza clínicamente por la presencia de diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales.

3. Ubicación taxonómica²⁸

Reino	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Tribu	: Escherichieae
Género	: Escherichia
Especie	: <i>Escherichia coli</i>

4. Patogenia²⁹

E. coli puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gram-negativa. Son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 20 cm, o unas 8 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres.

Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido.

Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente ésta la causa de infecciones superiores como la pielonefritis, que puede tener origen hematógeno

5. Tratamiento³⁰⁻³¹

Hasta el presente no existe una terapia específica para las infecciones por *E. coli*, pues es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, aún no se confirmó que la antibiòticoterapia aporte algún beneficio para el paciente. Es por ello que se debe realizar una cuidadosa utilización de los antimicrobianos hasta que se demuestre la eficacia de los mismos mediante la realización de estudios de intervención controlados.

El tratamiento comprende medidas terapéuticas destinadas a corregir las alteraciones hidroelectrolíticas, hematológicas, neurológicas o de hipertensión arterial durante el período agudo, y otras dirigidas a modificar la etiopatología de la enfermedad.

a) Quinolonas.- Entre las cuales están el ácido pipemídico y fluoroquinolonas (norfloxacin, pefloxacin y ciprofloxacina), son antibiòticos bactericidas muy activos contra Enterobacteriaceae y otros bacilos gramnegativos.

b) Aminoglucòsidos.- Son antibiòticos bactericidas, especialmente activos frente a bacilos gramnegativos.

c) Aminopenicilinas/inhibidores de la betalactamasa (IBL).- Aunque pueden ser útiles contra enterobacilos (*E. coli*, *Proteus* spp. y *Klebsiella pneumoniae*), el nivel de cepas resistentes no permite usarlos en forma empírica, sino después de conocida la sensibilidad del germen. Son útiles en la embarazada por carecer de efectos tóxicos para el feto.

d) Cefalosporinas.- Las de primera generación (cefalexina y cefradina) son activas contra enterobacilos sensibles. Por el alto nivel de resistencias que han adquirido estos gérmenes, no se las incluyen en los planes empíricos de tratamiento. Son útiles cuando se conoce que el agente es sensible y en la embarazada porque no son tóxicas para el feto.

e) Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX).- Aunque por el alto nivel de cepas resistentes no está indicado para un tratamiento empírico, es muy útil cuando se conoce que el germen es sensible, pues los elimina del reservorio de origen (vagina) con lo que se disminuye el riesgo de recaídas.

f) Nitrofurantoína.- Es antiséptico y alcanza buenas concentraciones urinarias, pero no a nivel de los reservorios. No es aconsejada en el primer trimestre de embarazo.

D. Actividad antibacteriana

1. Definición³²

La actividad antimicrobiana se define como: la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición).

Se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos.

La actividad o potencia de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. Si se prueban las muestras en diferentes concentraciones se puede determinar una concentración inhibitoria mínima del antibiótico hacia ese microorganismo.

2. Evaluación de la actividad antibacteriana³³

La actividad antibacteriana se cuantifica *in vitro* para determinar:

- La potencia de un antibacteriano en solución.
- Su concentración en los tejidos o tejidos del cuerpo.
- La susceptibilidad de un microorganismo determinado a las concentraciones conocidas del fármaco.

La medición de la actividad antibacteriana se puede realizar a través de uno de dos métodos principales:

a) Método de dilución.- Basado en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución).

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado.

b) Método del antibiograma disco-placa.- Consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar.

El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución.

Sin embargo, los métodos disco placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

3. Técnica de Kirby-Bauer³⁴

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel) en contacto con la superficie del agar, sobre la cual se ha distribuido previamente el microorganismo en cuestión. Se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada, por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

El diámetro obtenido (entre el disco y el crecimiento) dependerá, no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del grosor de la capa del medio del Agar Müller Hinton, su pH y composición, de la capacidad de difusión del antimicrobiano en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria. Todas éstas, son las variables más importantes que afectan el resultado del antibiograma.

Para cada antimicrobiano se establecen “concentraciones críticas” o “puntos de corte” que permiten separar a los microorganismos en tres categorías: Sensible, resistente y con sensibilidad intermedia. Estas categorías se establecen para cada bacteria frente a cada agente antimicrobiano, comparando la concentración inhibitoria mínima (CIM) en cada caso con los puntos de corte establecidos.

a) Sensible.- Un microorganismo se considera sensible a un antimicrobiano cuando se espera que la infección causada por el mismo, responda a dicho fármaco con la dosis recomendada.

b) Resistente.- Este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antimicrobiano en cuestión, cualesquiera que sean las dosis empleadas y la localización de la infección

c) Sensibilidad intermedia.- Este término se aplica a dos situaciones diferentes:

- Incluyen a cepas con sensibilidad disminuida frente a un antimicrobiano que puede utilizarse con éxito para el tratamiento si se emplean dosis más altas por ser este agente poco tóxico, o porque se concentra en el sitio de la infección.
- Incluyen cepas con sensibilidad intermedia a los antimicrobianos que por ser más tóxicos no pueden usarse en dosis más elevadas, en este caso, la categoría de sensibilidad intermedia sirve como una zona de transición entre cepas sensibles y previene pequeños errores causados por factores técnicos..

1.7 DEFINICIÓN DE CONCEPTOS CLAVE³⁵⁻³⁸

- **Aceite esencial (AE) o esencia.-** Sustancia líquida, aromática y volátil, de características lipofílicas, que se obtiene a partir de diferentes partes de las plantas a través de métodos físicos.
- **Medicina tradicional.-** Conjunto heterogéneo de medidas terapéuticas que constituyen el contenido de medicinas conocidas también como “Autóctonas” o “populares”.
- **Flavonoides.-** Pigmentos vegetales no nitrogenados.
- **Alcaloides.-** Metabolitos secundarios de las plantas sintetizados a partir de los aminoácidos.
- **Antibiograma.-** Test microbiológico que determina la susceptibilidad, sensibilidad o resistencia de una bacteria a un grupo de antibióticos.
- **Antibiótico.-** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.
- **Componentes fitoquímicos.-** Compuestos químicos constituyentes de las plantas.
- **Condensación.-** Vapor generado en la cámara de extracción, el cual contiene vapor de agua y aceite esencial, se le acondiciona mediante el cambio de fase para iniciar así un proceso de separación.
- **Concentración inhibitoria mínima (CIM).-** Concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18–24 horas de incubación.

- **Cepa.-** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.
- **Disco de sensibilidad.-** Disco impregnado con algún antimicrobiano usado para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.
- **Efectividad antimicrobiana.-** Concentración de antibiótico alcanzada en los fluidos orgánicos adecuada y que logra inhibir el desarrollo de los agentes patógenos.
- **Inóculo.-** Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.
- **Incubación.-** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.
- **Medio de cultivo.-** Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana *in vitro*.
- **Microaerófilico.-** Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión de 5% de oxígeno, 10% de anhídrido carbónico y 85% de nitrógeno.
- **Principio activo.-** Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y de uso terapéutico de una droga.

CAPÍTULO II

MÉTODO

2.1 MÉTODO

Se aplicó el método observacional, ya que no se manipuló la variable a investigar.³⁹

2.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN⁴⁰

La presente investigación correspondió al tipo básico pues sirvió para recopilar información e incrementar el conocimiento sobre la problemática; transversal debido a que se colectaron muestras diferentes en momentos distintos y prospectiva, pues se recolectaron datos cuyos fenómenos se presentaron con posterioridad al inicio del estudio.

Según el nivel fue de tipo descriptiva, ya que se limitó a la caracterización de la variable sometida a estudio.

2.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se aplicó un diseño no experimental (descriptivo transversal)⁴¹ con ensayos en laboratorio.

2.4 POBLACIÓN

Estuvo conformada por todo el aceite esencial de *Piper aduncum* (Matico) obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.

2.5 MUESTRA

Se trabajó con muestras de aceite esencial obtenidas a partir de ejemplares diferentes de Matico. El cultivo de *Escherichia coli* fue aislado e identificado a partir de muestras de heces de pacientes del Hospital Regional Docente Materno Infantil “El Carmen” (Huancayo) ,diagnosticados con enterocolitis y que aún no recibieron tratamiento farmacológico.

2.6 VARIABLE DE INVESTIGACIÓN

2.6.1 Variable

Actividad antibacteriana

2.6.2 Operacionalización de la variable

Variable	Dimensión	Indicador (halo de inhibición)	Tipo	Escala de medición
Actividad antibacteriana	Bactericida	> 16.0 mm	Cualitativa	Nominal
	No Bactericida	< 10.0 mm		
	Intermedio	11.0 – 15.0 mm		

* Punto de corte y CIM para Trimetropim/sulfametoxazol (Disco de 1,25/23,75 µg), según NCCLS 2002.⁴²

2.7 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.7.1 Obtención del aceite esencial de *Piper aduncum* “Matico”

A. Colección de muestras

La materia prima, ejemplares completos con peso aproximado de 6.0 kg, fueron colectados de Puerto Bermúdez (Provincia de Oxapampa, departamento de Pasco), entre los meses de noviembre y diciembre de 2015.

B. Tratamiento de la especie vegetal

Se seleccionaron las hojas y se transportaron en bolsas de papel, en el laboratorio se separaron las hojas frescas y no dañadas, limpias de fragmentos oscuros o atacados por insectos u hongos; lo demás fue descartado, quedando un peso promedio de 4.0 kg. Posteriormente se sometió a desecación a la sombra a temperatura ambiental (promedio de 14-18°C) durante 48 horas.

C. Obtención del aceite esencial⁴³

Se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor, haciendo uso del equipo extractor de aceites esenciales, para ello se colocaron 250 g de hojas secas de Matico y 4.0 L de agua bidestilada. La destilación se terminó cuando ya no se observó más formación de aceite esencial, llegando a obtener volúmenes promedio de 10.0 mL. La mezcla fue separada en una pera de decantación, eliminado la fase acuosa y reservando la orgánica (3.0 mL), la cual fue secada sobre sulfato de sodio anhidro; conservada en frascos de vidrio de color ámbar y de cierre hermético.

Todo el procedimiento se realizó por quintuplicado en los laboratorios de la Facultad de Industrias alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

2.7.2 Aislamiento e identificación de *E. coli*⁴⁴⁻⁴⁵

A. Obtención de muestras

Se colectaron cinco muestras de heces procedentes de personas diagnosticadas con enterocolitis, las cuales fueron depositadas en frascos estériles de boca ancha y con etiquetas que consignaban datos como fecha de colección y lugar de procedencia.

B. Aislamiento e identificación de colonias

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud (Universidad Peruana Los Andes), se procedió sembrar – por estría- en placas con agar Mac Conkey (Merck®) y Eosina Azul de Metileno (Merck®), las que fueron incubadas en estufa a 37°C por 48 horas. Finalizada la incubación se procedió a la identificación de colonias mediante técnicas de coloración y pruebas bioquímicas. Posteriormente la colonia confirmada se conservó en tubos (13x100mm) con agar Agar soya tripticasa (Merck®) inclinado y puesta en refrigeración (6 – 8°C).

2.7.3 Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial⁴⁶

A. Preparación de los discos de sensibilidad

Se perforaron discos de papel de filtro Whatman N°41 (IBM®), los cuales fueron procesados de la siguiente manera:

- **Discos problema.-** Fueron impregnados con cada tipo de aceite esencial por 24 horas. Luego se les sometió a desecación a temperatura ambiental durante 4 a 6 horas.

- **Discos control negativo.-** Fueron embebidos en agua destilada estéril por 24 horas. Luego se les sometió a desecación a temperatura ambiental durante 4 a 6 horas.

B. Técnica de Kirby-Bauer

Al cultivo de *E. coli* se le aplicó un antibiograma según la técnica de Kirby-Bauer con los discos de sensibilidad problema, control negativo y control positivo (Trimetropim/sulfametoxazol 1,25/23,75 µg) Una vez realizados los antibiogramas, se procedió a la medición de los halos netos de inhibición y su comparación con las tablas estandarizadas.

Todos los ensayos se efectuaron por quintuplicado en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología (Facultad de Ciencias de la Salud – UPLA).

2.8 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Los resultados de los antibiogramas (halos netos de inhibición) se presentan mediante tablas cruzadas y gráficos, siendo procesados mediante estadísticos descriptivos (media aritmética). Se compararon e interpretaron los datos con las Tablas estandarizadas de antibiograma para enterobacterias y los Criterios establecidos en el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).⁴⁷ Todos los datos fueron procesados con el Software estadístico Microsoft Excel 2013.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Tabla 1. Aceite esencial obtenido de *Piper aduncum* (Matico)

Actividad realizada	Tipo de muestra				
	A	B	C	D	E
Recolección total (Kg)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Selección de hojas (Kg)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Secado: Tiempo (h) y temperatura (°C)	48	48	48	48	48
	14-18	14-18	14-18	14-18	14-18
Peso para extracción (g)	250	250	250	250	250
Volumen de agua para extracción (L)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Volumen del destilado (mL)	10.1	10.1	10.0	10.3	10.2
Volumen concentrado del aceite (mL)	3.0	3.1	3.2	3.0	3.1

Fuente: Elaboración propia, marzo 2016

3.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli*



Figura 3. Diagrama para el proceso de aislamiento e identificación de *E. coli*

Fuente: Elaboración propia, marzo 2016

3.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL

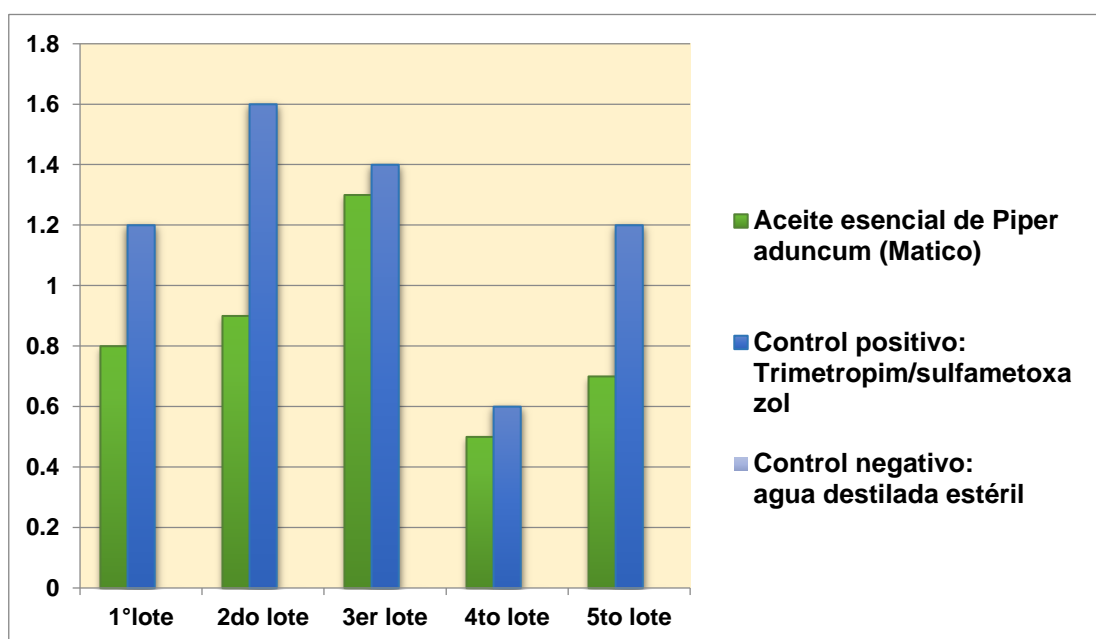
Tabla 2. Diámetro de los Halos de Inhibición (mm) para *E. coli*

Discos	Ensayos	Tamaño del halo de inhibición (mm)				
		A	B	C	D	E
Problema: Aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> (Matico)	1	1.5	1.3	1.3	0.0	0.4
	2	0.0	1.8	1.1	1.0	1.3
	3	1.0	0.7	0.9	0.0	1.0
	4	1.1	0.2	1.3	1.2	0.3
	5	0.3	0.7	0.6	0.0	0.7
	PROMEDIO	0.8	0.9	1.3	0.5	0.7
Control positivo: Trimetropim/ sulfametoxazol	1	1.2	2.9	1.4	0.0	1.3
	2	0.0	1.7	1.6	1.4	1.3
	3	1.4	1.3	0.9	0.0	1.5
	4	1.5	0.6	1.5	0.9	0.0
	5	2.1	1.3	1.7	1.0	1.8
	PROMEDIO	1.2	1.6	1.4	0.6	1.2
Control negativo: agua destilada estéril	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia, marzo

2016

Gráfico N °1.- Diámetro promedio de los Halos de Inhibición (mm) para cada tipo de disco



Fuente: Elaboración propia, marzo 2016

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se puede observar que a partir de 250 g de hojas de matico seleccionadas para destilación, luego de la decantación, se obtuvo en promedio 3,0 mL de aceite esencial por igual para todas las procedencias de las muestras trabajadas. Se empleó la técnica de destilación por arrastre de vapor, pues es la que ha demostrado amplia eficiencia para la extracción de principios activos con actividad farmacológica; siendo además fácil de realizar.⁴⁸

En esta investigación se logró obtener el aceite esencial haciendo uso del equipo extractor ubicado en las instalaciones de los laboratorios de la Facultad de Industrias alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú; luego de la obtención de los cinco lotes de aceite esencial, estos fueron conservados en recipientes de vidrio de cierre hermético, de color ámbar y conservados en refrigeración (5 °C) hasta su posterior empleo.

Por su parte, resultó relativamente fácil el aislamiento e identificación de un cultivo de *E. coli* a partir de muestras de heces procedentes de pacientes con enterocolitis; pues debe considerarse que esta bacteria es habitante normal del tracto intestinal del hombre y animales; llegando a alcanzar elevadas tasas durante los procesos de enterocolitis, cuya principal manifestación clínica es la evacuación de heces diarreicas.⁴⁹

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud (UPLA) se emplearon medios de cultivo selectivos y diferenciales como el agar Mac Conkey y Eosina Azul de Metileno, los cuales fueron útiles y suficientes para el aislamiento de colonias típicas de la bacteria en cuestión tras una incubación promedio de 48 horas a 37°C; posteriormente la identificación estuvo basada en la verificación de características tintoriales y bioquímicas propias para este género y especie microbiana (Figura 3).⁵⁰ Una vez que el cultivo estuvo plenamente identificado se procedió a su conservación en tubos con agar Tripticasa de soya y mantenidos en refrigeración hasta los ensayos de susceptibilidad.

Como parte del diseño para la determinación de la actividad antibacteriana se emplearon tres tipos de discos de sensibilidad: aquellos preparados con el aceite esencial obtenido (discos problema); como control positivo (discos de trimetropin/sulfametoxazol) y control negativo (discos embebidos en agua destilada estéril). La actividad antimicrobiana se determinó a través de la técnica de Kirby-Bauer mediante la medición del diámetro del halo de inhibición; el cual es afectado por dos factores: la respuesta del microorganismo (susceptibilidad) y la potencia del aceite esencial (capacidad bactericida o bacteriostática del principio activo).⁵¹

Tal como se observa en la Tabla 1, se logró evidenciar la formación de halos de inhibición con el aceite esencial (promedio de 0.84 mm) demostrando certeramente que el aceite esencial del matico, sin importar su procedencia, no afecta el crecimiento de *E. coli*, pues esos diámetros alcanzados no son los suficientemente grandes como para causarle ni siquiera un efecto bacteriostático a la bacteria, tal como se señala en consideración al punto de corte y concentración inhibitoria mínima del trimetropim/sulfametoxazol (TMP/SMX); el cual señala que para un efecto bactericida el tamaño del halo debe ser mayor a 16.0 mm, mientras que la actividad bacteriostática se verificaría con un tamaño de halo entre 11.0 a 15.0 mm.

Sin embargo, otro aspecto llamativo al momento de realizar la evaluación de la actividad antibacteriana fue el pequeño diámetro de los halos de inhibición alcanzados con los discos control positivo TMP/SMX (promedio de 1.2 m) lo cual es una demostración de que la bacteria se comportó como resistente frente a este fármaco.

Ante estos hechos la posible explicación sobre el comportamiento de la bacteria radica en dos aspectos: que el aceite esencial obtenido no posee ni la cantidad ni concentración de principios activos con actividad farmacológica sobre *E. coli*, o que esta bacteria es bastante resistente a los medicamentos.

Con relación al primer aspecto conviene destacar lo demostrado por los estudios fitoquímicos realizados a las especies de *P. peltatum* L. y *P. aduncum* L., donde se logró evidenciar la gran variabilidad de compuestos presentes en ambos vegetales; destacándose los alcaloides, triterpenos y esteroides; flavonoides de tipo flavanona, flavonas y chalconas; fenoles y taninos, azúcares reductores, quinonas, compuestos grasos, cumarinas y resinas con actividades antisecretoras, citoprotectoras, antibacterianas y cicatrizantes.⁵²⁻⁵³

Los resultados de esta investigación difieren de los reportado por Shimabukuro Y. y Torres L. (1992),⁵⁴ quienes señalan que los aceites esenciales de *P. aduncum* (Matico) aislados de las partes frescas, desecadas, previamente molidas y sometidas a destilación de vapor en un aparato semi-industrial eran activos contra *E. coli* utilizando el método de dilución en agar.

Por otro lado, Vivanco R. y col. (2012)⁵⁵ evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Mill) “perejil”, demostrando actividad significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* a concentraciones de 100 y 50% y para *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración de 100%; teniendo de poca a ninguna actividad frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* a diferencia que el aceite esencial de “matico” extraído tiene escasa actividad antibacteriana sobre *E. coli*.

Por tanto, la posible explicación a los resultados hallados y la diferencia respecto a lo reportado por estos autores podría deberse a dos principales razones. Por un lado la inactivación de alguno de los principios activos obtenidos, debido a algún tipo de alteración del aceite esencial o posible volatilización de sus componentes. Por otro lado, es probable que el desarrollo de *E. coli* no haya sido significativamente afectado debido a la resistencia antibacteriana que posee; pues se trató de un cultivo procedente de pacientes con enterocolitis, lo cual podría significar que la bacteria ya habría adquirido resistencia en el medio ambiente, posiblemente como consecuencia del uso irracional de los medicamentos.

Para determinar con certeza si el cultivo de *E. coli* era resistente se realizó un conjunto de antibiogramas adicionales según lo indicado por el Instituto Nacional de Salud (INS) para enterobacterias, cuyos resultados demostraron que se trataba de un microbio polirresistente (Anexo 1).

Con la finalidad de comparar la potencia de los cinco tipos de aceite esencial y los discos comerciales de trimetropim/sulfametoxazol se realizó un Análisis de varianza de un factor ($\alpha = 0.05$), el cual demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de discos (Anexo 2).

En términos generales, esta investigación ha demostrado que el aceite esencial de matico induce la formación de pequeños halos de inhibición sobre *E. coli*, demostrando que no posee actividad antibacteriana debido a que la bacteria es muy resistente a los medicamentos, con lo cual se pueden abrir las posibilidades de mejorar la eficiencia de extracción de principios activos con actividad farmacológica o potencias aquellos a fin de poder combatir a este tipo de microbios.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad antibacteriana de cinco muestras de aceite esencial de *Piper aduncum* (Matico) sobre un cultivo de *E. coli*

2. Se obtuvo un promedio de 3,0 mL de aceite esencial de *Piper aduncum* (Matico) mediante destilación por arrastre de vapor, a partir de 250 g de hojas seleccionadas y 4.0 L de agua bidestilada.

3. Se aisló e identificó un cultivo de *E. coli* a partir de una muestra de heces diarreicas.

4. Se determinó que el aceite esencial obtenido no posee actividad antibacteriana sobre *E. coli* mediante la técnica de Kirby-Bauer.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

1. A futuros investigadores, antes de realizar cualquier tipo de ensayo cerciorarse de las características y posibilidades de efectividad del proceso extractivo, a fin de poder escoger el método y técnica más adecuado.

2. Continuar con el estudio de diversas plantas que tengan actividad antibacteriana para así promover el uso de las plantas medicinales.

3. Realizar investigaciones *in vitro* sobre actividad antimicrobiana de principios activos vegetales pero en sinergismo con sustancias potenciadoras que permitan combatir a las bacterias resistentes.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Una estrategia mundial para combatir las enfermedades infecciosas. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1994.
2. Arroyo A, Bonilla R, Tomas G. Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* "Matico". Revista de investigación UNMSM. 2011; 14:62-67.
3. Instituto Nacional de Salud. Reporte de las Principales enfermedades infecciosas en el Perú. Lima: Boletín Informativo del Instituto Nacional de Salud; 2007.
4. Brooks G, Butel J, Ornston L, Jawetz E, Melnick J, Adelberg Edward. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15^{ta} ed. México: Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.; 1996.
5. Hammer K, Carson C, Riley T. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales y otros extractos vegetales. Journal of Applied Microbiology. 1999; 86:985-990.
6. Albado E, Saez G, Grabiell S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered. 2001; 12(1):16-19.

7. Lima O. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales en cepas de bacterias Gram negativas. Rev. Bras. Cien. Saude; 2003; 7(3):251-258.
8. Ruíz Q, Roque A. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-orientado peruano. Ciencia e Investigación 2009; 12(1):41-47.
9. Marín J. Estudio fitoquímico de *Vismia cayennensis* y su posible actividad biológica [Tesis]. Sucre: Universidad de Oriente Núcleo de Sucre; 2009.
10. Kiran B, Lalitha V, Raveesha. Potencialidad antifúngica y antibacteriana de seis aceites esenciales extraídos de Fuentes vegetales. International Journal of Engineering Science and Technology. 2011; 3(4):3029-3038.
11. Bastos M, Damé L, De Souza L, Almeida D, Alves M, Braga J. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Rev Cubana Plant Med. 2011; 16(3):260-266.
12. Vivanco R, León E, Castro A, Ramos N. Composición química del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman Ex A.W. Hill "perejil" y determinación de su actividad antibacteriana. UNMSM. Ciencia e Investigación 2012; 15(2):78-83.
13. Saralegui H. Piperaceae. En: Greuter W, Rodríguez R, editores. Flora de la República de Cuba. Serie A: Plantas Vasculares. La Habana: Editorial Königstein; 2004.
14. Arroyo A, Bonilla R, Tomas G. Estudio Fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* "Matico". Revista de investigación UNMSM. 2011; 14:62-67.
15. Brako L, Zarucchi J. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden Vol. 45; 1993.
16. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Clasificación taxonómica del Matico. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Museo de Historia Natural; 2016.
17. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Clasificación taxonómica del Matico. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Museo de Historia Natural; 2016.
18. Osuna L, Tapia M y Aguilar A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. España: Publicaciones y ediciones de la Universidad de Barcelona; 2005.

19. Martínez M. Aceites esenciales. Medellín: Universidad de Antioquia - Facultad de Química Farmacéutica; 2003.
20. Flores G. Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de usos [Tesis]. Chile: Universidad de Santiago de Chile; 2010.
21. Burillo J. Investigación y experimentación de plantas aromáticas y medicinales en Aragón: Cultivo, transformación y analítica. Zaragoza: Gobierno de Aragón, Dirección General de Tecnología Agraria; 2003.
22. Rodríguez M. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. España: Editorial Acribia S.A.; 2012.
23. Servicio Nacional de Aprendizaje. Introducción a la Industria de los Aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. Colombia: Servicio Nacional de Aprendizaje; 2004.
24. Prescott P, Harley J, Klein D, Microbiología. 4^{ta} ed. Madrid: Editorial McGraw Hill Interamericana; 2008.
25. Brooks G, Butel J, Ornston L, Jawetz E, Melnick J, Adelberg Edward. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15^{ta} ed. México: Editorial El Manual moderno S.A. de C.V.; 1996.
26. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M, Painter P. Microbiología. 2^{da} ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1996.
27. Zinsser J, Joklick W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Microbiología. 20^{da} ed. Buenos Aires: Editorial Médica panamericana; 2004.
28. Ewing WH. Identificación de Enterobacteriaceae. 4^{ta} ed. Washington: Elsevier Science Inc.; 1985.
29. Galli L. Estudio de los factores de adherencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga aisladas de bovinos [Tesis]. Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; 2012.
30. Moredo F. Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la Provincia de Buenos Aires [Tesis]. Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2012.
31. Laurence L, Brunton J, Lazo K, Parker L. Goodman y Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. En Laurence L. Brunton, editor. Penicilinas, Cefalosporinas y Otros Antibióticos Lactámicos B. México: McGraw Hill Interamericana; 2010.

32. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Departamento de Laboratorio médico y Microbiología. Washington, USA: Universidad de Washington; 2003.
33. Jorgensen J, Sahm D. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana: Consideraciones generales. En Murray P. & Pfaller M., eds. Manual de Microbiología clínica. 6^{ta} ed. Washington D.C, USA: Sociedad Americana de Microbiología; 1995.
34. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma de Discos. Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer. España: Editorial Biomédica; 1984.
35. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales. 2^{da} ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2001.
36. Bravo L. Farmacognosia especial. España: Editorial Elsevier; 2003.
37. Brock T, Madigan M. Microbiología. 6^{ta} ed. Madrid: Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A.; 1993.
38. Geo F. Brook, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. Microbiología de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17^{ta} ed. México D.F.: Editorial El Manual Moderno; 2002.
39. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 4^{ta} ed. México: Editorial Mac Graw Hill; 2006.
40. Pineda E, Alvarado E, Canales F. Metodología de la investigación. Washington: OPS/OMS; 1994.
41. Sánchez H, Reyes C. Metodología y Diseños en la Investigación científica. Lima: Editorial Visión Universitaria; 2009.
42. NCCLS. Tablas complementarias para disco difusión: Comité Nacional para estándares de laboratorio clínico: Documento M100-S10; 2002. Disponible en:
[http://www.acronymfinder.com/National-Committee-for-Clinical-Laboratory-Standards-\(NCCLS\).html](http://www.acronymfinder.com/National-Committee-for-Clinical-Laboratory-Standards-(NCCLS).html)
43. Villar Del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A.; 1999.
44. Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R, Anderson M. Microbiología médica. España: Editorial Mosby/Doyma Libros; 1995.
45. Brooks G, Butel J, Ornston L, Jawetz E, Melnick J, Adelberg Edward. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15^{ta} ed. México: Editorial El Manual moderno S.A. de C.V.; 1996.

46. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima, Perú: Editorial Ministerio de Salud; 2002.
47. NCCLS. Tablas complementarias para disco difusión: Comité Nacional para estándares de laboratorio clínico: Documento M100-S10; 2002. Disponible en:
[http://www.acronymfinder.com/National-Committee-for-Clinical-Laboratory-Standards-\(NCCLS\).html](http://www.acronymfinder.com/National-Committee-for-Clinical-Laboratory-Standards-(NCCLS).html)
48. Bravo L. Farmacognosia especial. España: Editorial Elsevier; 2003.
49. Brock T, Madigan M. Microbiología. 6^{ta} ed. Madrid: Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A.; 1993.
50. Zinsser J, Joklick W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Microbiología. 20^{da} ed. Buenos Aires: Editorial Médica panamericana; 2004.
51. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Departamento de Laboratorio médico y Microbiología. Washington, USA: Universidad de Washington; 2003.
52. Giraldo A. Estudio fitoquímico de *Piper pesaresanum* y *Piper crassinervium* (Piperaceae) [Tesis]. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2012.
53. Flores E. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana [Tesis]. España: Universidad de la Laguna; 2006.
54. Shimabukuro Y, Torres L. Estudio técnico de la extracción de aceite esencial de *Piper aduncum* “matico” y diseño de planta piloto [Tesis]. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería; 1992.
55. Vivanco R, León E, Castro A, Ramos N. Composición química del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman Ex A.W. Hill “perejil” y determinación de su actividad antibacteriana. UNMSM. Ciencia e Investigación 2012; 15(2):78-8

ANEXOS

ANEXO 1

RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA COMPLETO DE *E. coli*

Tabla 3. Antibióticos y diámetros para *Escherichia coli*.

MEDICAMENTO	HALO DE INHIBICION (mm)	RESULTADOS
Ampicilina	7.0	Resistente
Norfloxacino	0	Resistente
Amikacina	18.0	Sensible
Gentamicina	5.0	Resistente
Cefalotina	0	Resistente
Cefuroxima	0	Resistente
Amoxicilina/A. Clavulánico	10.0	Resistente
Ácido nalidíxico	0	Resistente
Nitrofurantoina	9.0	Resistente
Ofloxacino	0	Resistente
Cloranfenicol	15.0	Resistente
Ceftazidima	9.0	Resistente
Cefepima	8.0	Resistente
Meropenem	16.0	Sensible
Cefixima	0	Resistente
Cefoperazona	2.0	Resistente
Azitromicina	8.0	Resistente

Fuente: Elaboración propia, marzo 2016

ANEXO 2

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR (95% de confianza, alfa = 0,05)

Análisis de varianza para el aceite esencial y el control positivo

Aceite esencial de Matico vs control positivo (SMX/TMP)						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	16.7936	10	1.67936	4.3304957	2.8073	1.89942234
Dentro de los grupos	53.904	139	0.38779856			
Total	70.6976	149				

H_0 = El efecto antibacteriano es igual con el aceite esencial y el control positivo

H_1 = El efecto antibacteriano es diferente con el aceite esencial y el control positivo

Como: la Probabilidad (2.8073) es > 0.05 entonces se acepta H_0

Conclusión:

La actividad bactericida es igual con el aceite esencial y el control positivo. Lo que equivale a inferir que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la potencia del aceite esencial obtenido y el fármaco control positivo contra la bacteria *E. coli*

Fuente: Elaboración propia, marzo 2016

ANEXO 3

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MATICO

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

MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 65-USM-2016

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

La muestra vegetal (planta completa), recibida de: **Katia FLORES PALACIOS y Maribel Rosario PUENTE PUENTE**, estudiantes de la Universidad Peruana Los Andes; ha sido estudiada y clasificada como: ***Piper aduncum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: MAGNOLLIDAE

ORDEN: PIPERALES

FAMILIA: PIPERACEAE

GENERO: *Piper*

ESPECIE: *Piper aduncum* L.;

Nombre vulgar: "matico".
Determinado por: Blgo. Severo Baldeón y Blgo. José Campos

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 05 de mayo de 2016

 
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)
DRA. HAYDEE MONTOYA TERRERROS

DDB

Fuente: Elaboración USM, mayo 2016

ANEXO 4

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper aduncum* "Matico"



Selección y secado a sombra (temperatura ambiental por 48 h) de hojas



Obtención de ejemplares de matico (Puerto Bermúdez - Oxapampa)



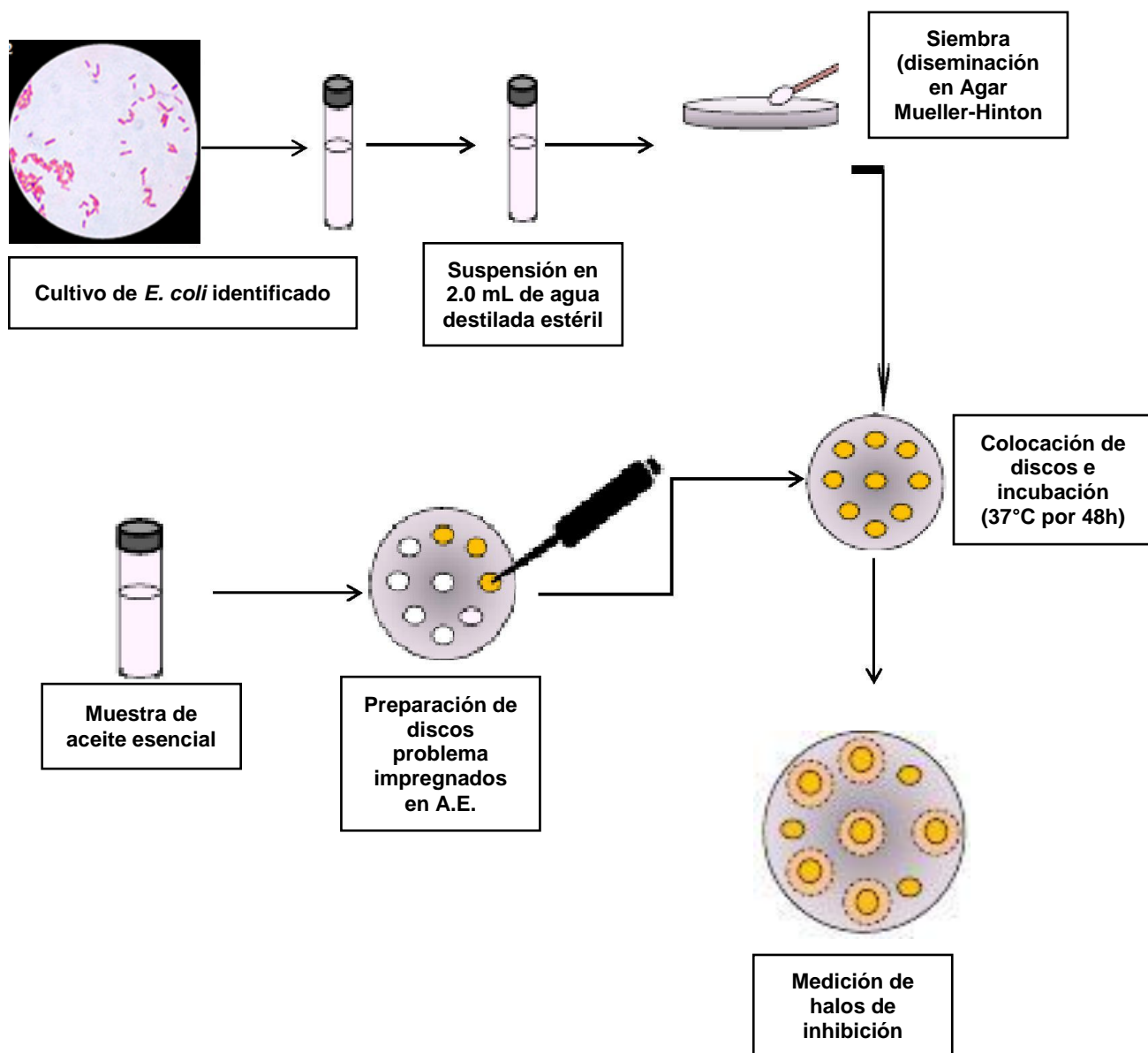
Separación de fase orgánica en pera de decantación para obtener 3.0 mL de aceite esencial



Introducción de 250 g de hojas secas y 4.0 L de agua en el equipo de destilación

ANEXO 5

ESQUEMA DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



Fuente: Elaboración propia, marzo 2016