

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES  
OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES  
DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS  
FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**ROXANA BETSABÉ VEGA ABAD**

**LIMA – PERÚ**

**2019**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24 -  
Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES  
OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES  
DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS  
FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*”**

**Presentada por:**

**ROXANA BETSABÉ VEGA ABAD**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado:**

Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel  
PRESIDENTE

Ph. D. Gretty Katherina Villena Chávez  
MIEMBRO

Ph. D. Ana Kitazono Sugahara  
MIEMBRO

M. Sc. Fermín Humberto Arévalo Ortiz  
ASESOR

Blga. Favidia Deysi Valdivia Guerrero  
Co - Asesora

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Francisco Vega y Rosana Abad, los pilares de mi vida.*

*A mis hermanos, Frank, Gustavo, Simone y Francisco, por su apoyo incondicional.*

*A mi hija, Camila Arrué, mi motor y fuerza de cada día.*

*Los amo.*

Roxana Betsabe Vega Abad

## AGRADECIMIENTO

Expreso mi profundo agradecimiento a mi maestro y asesor Magister en Biotecnología Fermín Arévalo Ortiz, quién confió en mi desempeño para esta investigación y me permitió desarrollarlo en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Agradezco a mi mentora y co-asesora Blga. Faviola Valdivia Guerrero, por sus enseñanzas y apoyo en el desarrollo de esta investigación en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del Instituto Nacional de Salud.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud, por permitirme desarrollar parte de esta investigación en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del Centro Nacional de Salud Pública y por proporcionarme la cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Brindo mi agradecimiento al Blgo. Arturo Granda Paucar, por el apoyo con las identificaciones taxonómicas de las especies vegetales en estudio en el Herbario MOL del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, y al Mg. Blgo. Orlando Advíncula por el apoyo en el análisis estadístico de esta investigación.

A su vez, agradezco a mi compañero de clases y amigo Blgo. Luis Gutiérrez Mesías, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta investigación.

También, expreso mi agradecimiento a la empresa Caléndula Productos y Servicios S.A – La Libélula Biocosmética Natural, por haberme brindado las facilidades necesarias para poder desarrollar esta investigación mientras laboraba en dicha empresa.

Finalmente, agradezco a aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a que pueda culminar esta investigación con éxito.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	vii
SUMMARY .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Molle ( <i>Schinus molle</i> L.) .....	3
2.1.1. Descripción botánica .....	3
2.2. “Huamanripa” ( <i>Senecio calvus</i> Cuatrec.) .....	7
2.2.1. Descripción botánica .....	7
2.3. “Panisara” ( <i>Clinopodium pulchellum</i> ) (Kunth) Govaerts .....	8
2.3.1. Descripción botánica .....	8
2.4. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	11
2.5. Microorganismos patógenos.....	13
2.6. Reglamentos de bioseguridad.....	15
2.7. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.....	15
2.8. Aromatograma.....	16
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>17</b>
3.1. Materiales .....	17
3.2. Métodos .....	19
3.2.1. Recolección de las muestras.....	19
3.2.2. Transporte de las muestras frescas .....	19
3.2.3. Identificación de las muestras .....	19
3.2.4. Proceso de extracción de los aceites esenciales .....	20
3.2.5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana .....	21
3.2.6. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales.....	23
3.2.7. Interpretación de los resultados.....	24
3.2.8. Análisis estadístico.....	24
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
4.1. Recolección de las muestras.....	25
4.2. Identificación de las muestras .....	27
4.3. Proceso de extracción de aceites esenciales .....	27

4.3.1. Destilación por arrastre de vapor de agua .....	27
4.3.2. Hidrodestilación con equipo Clevenger .....	27
4.4. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana .....	31
4.5. Concentración mínima inhibitoria.....	38
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición del aceite esencial de hojas de <i>Schinus molle</i> .....	6
<b>Tabla 2:</b> Equipos utilizados para la investigación.....	18
<b>Tabla 3:</b> Antibióticos utilizados como controles positivos.....	22
<b>Tabla 4:</b> Diluciones de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> para evaluar la concentración mínima inhibitoria.....	23
<b>Tabla 5:</b> Peso de aceite esencial destilado (g) y rendimientos (%(w/w)) de los aceites esenciales obtenidos por el método de destilación por arrastre de vapor de agua...	27
<b>Tabla 6:</b> Peso de aceite esencial destilado (g) y rendimientos (%(w/w)) de los aceites esenciales obtenidos por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger .....	29
<b>Tabla 7:</b> Tabla comparativa de los rendimiento de extracción de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> obtenidos por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger .....	30
<b>Tabla 8:</b> Índice de refracción de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> .....	31
<b>Tabla 9:</b> Medida de los halos de inhibición de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.....	33
<b>Tabla 10:</b> Medida de los halos de inhibición de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger.....	33
<b>Tabla 11:</b> Medida de los halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.....	40
<b>Tabla 12:</b> Medida de los halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estructura vegetal de <i>Schinus molle</i> Linnaeus., “Molle” .....	4
<b>Figura 2:</b> Estructura vegetal de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts, “Panisara” ...	9
<b>Figura 3:</b> Destilador por arrastre de vapor de agua .....	20
<b>Figura 4:</b> Hidrodestilador con equipo Clevenger .....	21
<b>Figura 5:</b> A. Racimos de frutos de <i>Schinus molle</i> . B. Frutos frescos de <i>Schinus molle</i> ....	25
<b>Figura 6:</b> A. Plantas de <i>Senecio calvus</i> . B. Hojas frescas de <i>Senecio calvus</i> .....	26
<b>Figura 7:</b> A. Planta de <i>Clinopodium pulchellum</i> . B. Hojas frescas de <i>Clinopodium pulchellum</i> .....	26
<b>Figura 8:</b> Curva de secado de los frutos frescos de <i>Schinus molle</i> , a temperatura constante de 40 °C .....	28
<b>Figura 9:</b> Curva de secado de las hojas frescas de <i>Senecio calvus</i> , a temperatura constante de 40 °C .....	28
<b>Figura 10:</b> Curva de secado de las hojas frescas de <i>Clinopodium pulchellum</i> , a temperatura constante de 40 °C .....	29
<b>Figura 11:</b> <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619, cultivada en agar sangre de cordero al 5% (AS) .....	32
<b>Figura 12:</b> Halos de inhibición de los aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> destilado por el método de arrastre de vapor de agua...	34
<b>Figura 13:</b> Comparación de la extracción del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger.....	36
<b>Figura 14:</b> Comparación de la extracción del aceite esencial de <i>Senecio calvus</i> por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger.....	37
<b>Figura 15:</b> Comparación de la extracción del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger.....	37
<b>Figura 16:</b> Halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> , <i>Senecio calvus</i> y <i>Clinopodium pulchellum</i> destilado por el método de arrastre de vapor de agua.....	39
<b>Figura 17:</b> Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger.....	42



<b>Figura 18:</b> Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Senecio calvus</i> extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger.....	43
<b>Figura 19:</b> Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Clinopodium pulchellum</i> extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger .....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificados de Identificación de las muestras vegetales en estudio en el Herbario MOL “Augusto Weberbauer” de la Universidad Nacional Agraria La Molina .....	57
Anexo 2: Resolución de aprobación y consentimiento del desarrollo de proyecto de tesis en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del Instituto Nacional de Salud – Jesus Maria .....	60
Anexo 3: Certificado de análisis de la cepa Streptococcus pneumoniae ATCC 49619.....	63

## RESUMEN

En este estudio se determinó que los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* obtenidos por dos métodos de extracción: destilación por arraste de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger, presentan actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, con sensibilidad límite según la escala de Duraffourd. También se estableció que la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales obtenidos por destilación por arraste de vapor de agua fueron de: 100% (V/V) para *Schinus molle*, 75%(V/V) para *Senecio calvus* y 50%(V/V) para *Clinopodium pulchellum*. Por otro lado, la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación con equipo Clevenger fueron de: 100%(V/V) para *Schinus molle*, 50%(V/V) para *Senecio calvus* y 50%(V/V) para *Clinopodium pulchellum*, frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

**Palabras clave:** Aceites esenciales, *Streptococcus pneumoniae*, *Schinus molle*, *Clinopodium pulchellum*, *Senecio calvus*.

## SUMMARY

This study determined that essential oils of *Schinus molle*, *Senecio Calvus* and *Clinopodium pulchellum*, obtained by two extraction methods: Steam distillation and Hydrodistillation using the Clevenger-type apparatus. They exhibit antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, with limit sensitivity according to Duraffourd scale. It was also established the minimum inhibitory concentration obtained by Steam distillation were: 100% (V/V) to *Schinus molle*, 75% (V/V) to *Senecio calvus*, and 50% (V/V) to *Clinopodium pulchellum*. On the other hand, the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils obtained by Clevenger apparatus were: 100% (V/V) *Schinus molle*, 50% (V/V) to *Senecio calvus* and 50% (V/V) to *Clinopodium pulchellum*, against *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

**Keywords:** Esencial oils, *Streptococcus pneumoniae*, *Schinus molle*, *Clinopodium pulchellum*, *Senecio calvus*.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país megadiverso y cuenta con el 10 por ciento de las especies de flora del planeta. Alberga alrededor de 25 mil especies diferentes de plantas gracias a las 11 ecorregiones existentes en el territorio; asimismo, el 30 por ciento de ellas son endémicas del Perú, es decir únicas en el mundo (SERNARP, 2017).

Desde épocas preincaicas, las plantas medicinales han sido utilizadas por el poblador del antiguo Perú para tratar enfermedades y curar heridas, ya que muchas de las plantas medicinales nativas tienen propiedades antiinflamatorias, antirreumáticas, antiespasmódicas, antipiréticas, antifúngicas, antimicrobianas, entre otros (Bussmann & Glenn, 2010). También se sabe que muchas de estas propiedades son atribuidas a metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, antocianinas, compuestos fenólicos y entre otros a los aceites esenciales, siendo este último, que por su compleja composición, su mecanismo de acción no está muy claro hasta la actualidad.

Entre las enfermedades más recurrentes en nuestro país están las infecciones respiratorias agudas (IRA), que son un grupo de enfermedades que afectan al aparato respiratorio, ya sea por virus, bacterias u hongos. Su complicación más grave es la neumonía y es la causa principal de muertes en niños menores de cinco años en el país (MINSA, 2016). Entre estas neumonías, las neumonías bacterianas son las más virulentas y es *Streptococcus pneumoniae* el agente principal de la mortalidad y morbilidad infantil (OPS/OMS, 2014). A la fecha el tratamiento adecuado para combatir estas neumonías son los antibióticos; sin embargo, cada día se evidencia un marcado incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos (OMS, 2018), generando dificultades en el tratamiento convencional. Por otra parte, hay pocas investigaciones científicas sobre tratamientos alternativos y el uso de los aceites esenciales podría ser una alternativa para tratar dichos males.

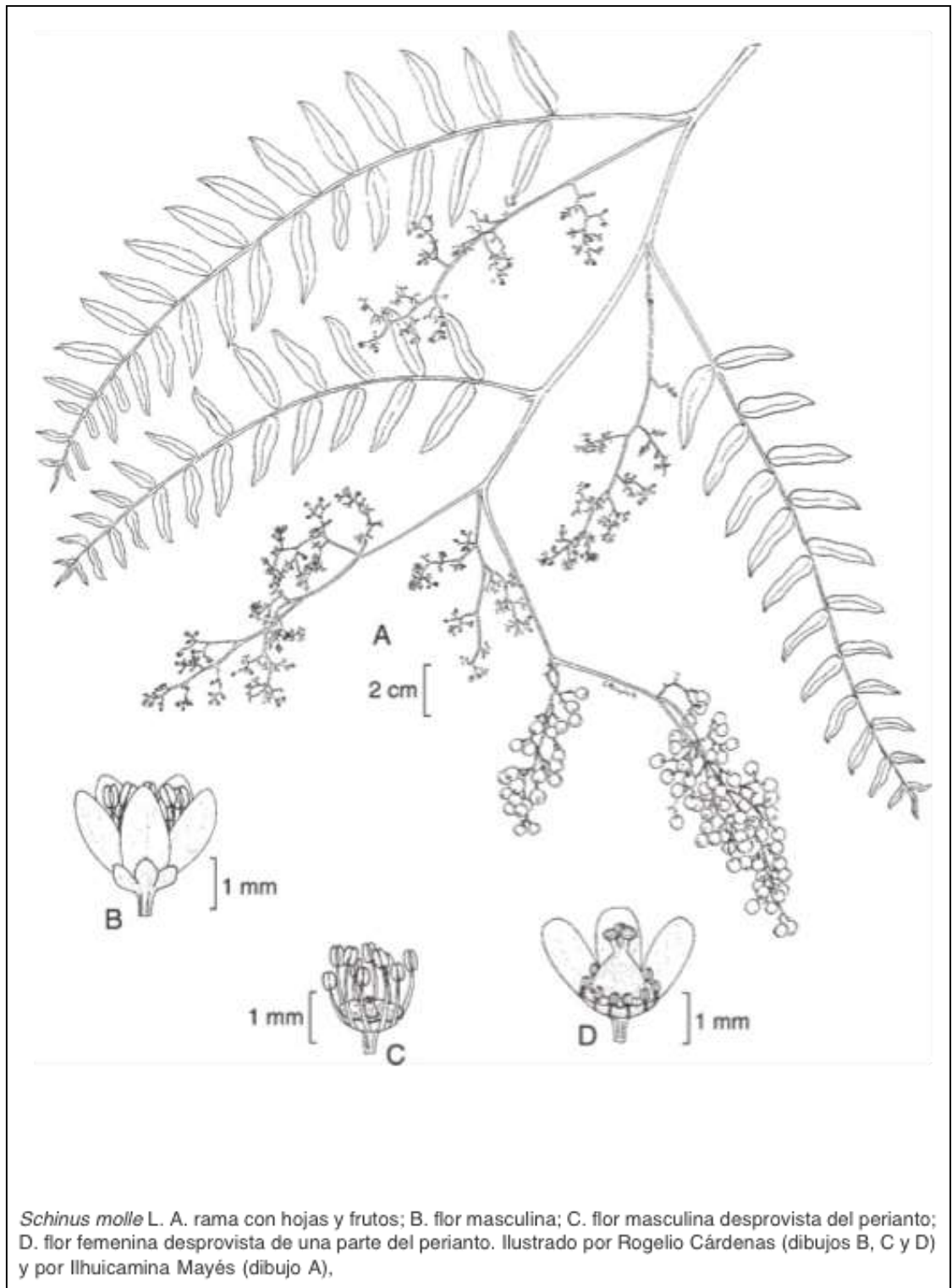
La historia señala que el uso de plantas medicinales es ancestral; pero existe poca información científica sobre los procedimientos adecuados para su uso. Por ejemplo, el uso de material vegetal fresco o seco, la extracción de los compuestos por métodos diferentes, son cuestiones por las que podrían variar las propiedades medicinales de sus componentes; es por esta razón, que el objetivo de la presente investigación es realizar un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por dos métodos de extracción diferentes, tales como destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger, de tres plantas medicinales nativas del Perú (*Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum*) frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Así mismo, evaluar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por cada método de extracción en estudio.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Molle (*Schinus molle* L.)

#### 2.1.1. Descripción botánica

Planta leñosa, por lo común de porte arbóreo (a veces arbustivo), hasta de 15 m de alto, frondosa, perennifolia; tronco generalmente robusto, de ramificación profusa, ramas y ramillas péndulas, diminuta y esparcidamente pubérulas, glabras con la edad. Hojas con peciolo de 2 a 6 cm de largo, láminas regularmente imparipinnadas, oblongo-lanceoladas de 10 a 30 cm de largo, raquis subalado, foliolos (15)21 a 27(41), sésiles, opuestos, subopuestos o alternos, lineares a lanceolados, de (1.5)2.5 a 6 cm de largo y de 0.3 a 1 cm de ancho, ápice agudo a acuminado, usualmente curvado en el extremo, borde entero o algo aserrado, membranáceos a ligeramente coriáceos, glabros a esparcida y diminutamente pubérulos, abundantemente provistos de resina aromática. Inflorescencias axilares, paniculadas, de 8 a 15(20) cm de largo, menudamente puberulentas, brácteas deltoides, puberulentas en el dorso, ciliadas en el margen, pedicelos de unos 2 mm de largo, puberulentos. Flores por lo común unisexuales; cáliz de 5 segmentos ovados a semicirculares, de unos 0.5 mm de largo, ciliados en el margen; pétalos 5, elípticos a oblongos, de unos 2 mm de largo, Estambres 10, dispuestos en dos series, con filamentos finos de diferente longitud, de (0.8)1 a 1.5(2) mm de largo, anteras oblongas, de unos 0.8 mm de largo; ovario súpero, 3-carpelar, 1-locular, estilos 3, cortos y gruesos; drupa de color rojo, de alrededor de 5 mm de diámetro, glabra (Rzedowski & Calderón, 1999) (Figura 1).



**Figura 1: Estructura vegetal de *Schinus molle* L., “Molle”**

FUENTE: Rzedowski & Calderón (1999)



**a. Taxonomía (Chase & Reveal, 2009)**

Clado: Angiospermae

Clado: Eudicotyledoneae

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Sapindales Juss. ex Bercht & J. Presl

Familia: Anacardiaceae R. Br.

Genero: *Schinus* L.

Especie: *Schinus molle* L.

**b. Origen y distribución geográfica**

Ampliamente distribuido en toda America desde el sur de California y oeste de Texas en Estados Unidos, México, Centroamérica, también en el centro y sur de Sudamérica, principalmente Perú, aunque se extiende de Ecuador a Chile y Bolivia (Rzedowski & Calderón, 1999). Vive en los Andes peruanos a altitudes de hasta 3 650 m.s.n.m.

**c. Principios activos**

Hoja: flavonoides (rutina, quercetina e isoquercetina, triterpenos, antocianidinas,  $\beta$ -sitosterol, taninos, ácido gálico, ácido protocatéquico, glucosa, fructosa, aceites esenciales (0,5%). Ácido linolénico, linoleico, lignocérico, y esteárico. Corteza y semillas: ácido esteárico. Frutos: aceites esenciales (2,4 %);  $\alpha$ -bergamontranseno, bourboneno,  $\alpha$  y  $\delta$ -canadineno,  $\alpha$  y  $\delta$ -calacoreno, calameneno, canfeno, carvacrol,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -copaenocroweacina,  $\gamma$ -cubebeno, p-cimeno, butirato de geraniol, hexanoato de nerol,  $\alpha$  y  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$  y  $\gamma$ -muroleno, etc. Además, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido y peonidina-3-glucósido. (Cóndor, 2014). Se han reportado los componentes del aceite esencial extraído de *Schinus molle* por método clevenger según Deveci *et al.* (Tabla 1).

**Tabla 1: Composición del aceite esencial de hojas de *Schinus molle* L.**

<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje de Aceite (%)</b>
Sabineno	2.56
Alfa-pineno	0.87
Camfeno	0.4
Beta Pineno	0.13
Mirceno	0.47
Alfa-felandreno	6.94
Limoneno, Cineno, Cajeputeno	2.98
Beta-Tujone	-
P-cimeno	1.56
Alfa gurjuneno	1.38
Endobornil acetato	-
Elemeno	-
Beta Elemeno	0.48
Beta-Ceriofileno	4.3
Alfa copaeno	0.47
Trans Cariofileno	-
(+) Aromadendreno	0.54
Alfa-humuleno	2.04
Germacreno D	6.54
Biciclogermacreno	1.82
Delta Cadineno	11.28
Alfa Cadineno	0.59
(+) Fenchon	3.24
Elemol	5.11
Ledeno	5.21
Calareno	4.68
Alfa Eudesmol	2.38
Alfa cadinol	10.77

Fuente: Deveci *et al.* (2010)

#### **d. Propiedades medicinales y usos**

Posee actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, insecticida y propiedades repelentes (Deveci *et al.*, 2010. Gundidza, 1993. Dikshit *et al.*, 1986).

Sus usos medicinales reportados en el Perú son para tratamientos de bronquitis, asma y resfrío (Bussmann, 2010). También es usado como antireumático y antiinflamatorio (Arellano, 1992).

## 2.2. “Huamanripa” (*Senecio calvus* Cuatrec.)

### 2.2.1. Descripción botánica

Hierba perenne rizomatosa 25-40 cm de alto. Tallo escapiforme. Hojas basales semiarrosetadas, pecíolo desarrollado de 3-5 cm de largo membranácea y glabra; limbo de color violáceo claro, oblongo espatulado y oblongo lanceolado, 6-9 x 0.5-2 cm, margen revuelto de bordes enteros, ápice semiagudo, atenuado en la base, glabro en ambas caras, nervadura central notoria en el envés. Hojas caulinares alternas, sésiles. Capítulos discoideos, en corimbos laxos; involucreo discoide, caliculado 10-15 x 10-15 mm, brácteas uniseriadas, lineal-lanceoladas, agudas, pilosas en el ápice. Flores actinomorfas, isomorfas, hermafroditas; corola tubulosa amarillenta, pentadentada; anteras concrecentes, ápice apendiculado, base obtusa. Aquenio cilíndrico y glabro. Pappus formado por numerosos pelos blanquecinos (Loja, 2002).

#### a. Taxonomía (Chase & Reveal, 2009)

Clado: Angiospermae

Clado: Eucotyledoneae

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asterales Takht.

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae Bercht & J. Presl

Genero: *Senecio* L.

Especie: *Senecio calvus* Cuatrec.

#### b. Origen y distribución geográfica

Es nativa de Ecuador, Perú y Bolivia. En el Perú se distribuye en Ancash, Cajamarca, Cusco, Junin, Lima y según Yarupaitán & Albán (2003) es nativa de Quilcas, Junín.

**c. Principios activos**

No se han reportado sus principios activos, sin embargo, la actividad antimicrobiana de algunas de las especies de Senecio fueron evaluadas en microorganismos como *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 (Alzamora *et al.*, 2001).

**d. Propiedades medicinales y usos**

Se emplea para el tratamiento de infecciones respiratorias tales como bronquitis, asma y neumonía (Alzamora *et al.*, 2001; Bussman & Glenn, 2010)

**2.3. “Panisara” (*Clinopodium pulchellum*) (Kunth) Govaerts**

**2.3.1. Descripción botánica**

Arbusto erguido, poco ramificado, de 1–1,5 m de alto, tallos cuadrangulares en corte transversal un tanto pilosos. Hojas opuestas, pecioladas, lámina simple, de forma deltoidea, envés densamente pubescente. Inflorescencia axilar, y con pocas flores, pétalos de color anaranjado. Cáliz y corola pentámera, zigomorfa. Corola tubular, arqueada, el ápice terminado en cinco lóbulos de ápice obtuso. Androceo formado por cuatro estambres más largos que la longitud de la corola y el gineceo tiene ovario súpero 2-carpelar, 4-locular, estilo simple, estigma bifido. En cada carpelo dos óvulos. El fruto es un esquizocarpo que se separa en cuatro segmentos (Galán, 2013) (Figura 2).



**Figura 2: Estructura vegetal de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, “Panisara”**

FUENTE: The Field Museum, Chicago-USA (2009)

**a. Taxonomía (Chase & Reveal, 2009)**

Clado: Angiospermae

Clado: Eucotyledoneae

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Lamiales Bromhead

Familia: Lamiaceae Martinov

Genero: Clinopodium L.

Especie: *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts

**b. Origen y distribución geográfica**

Crece a más de 2 500 m.s.n.m, propio de la serranía peruana, y por lo general ampliamente distribuida en el centro y norte del país, en laderas rocosas, ubicado hacia el norte y oeste del país. Se encuentra en los departamentos de La Libertad, Ancash, Cajamarca, Junín y Piura, además de ser más prolifera en meses de lluvia y ubicada en laderas de cerros (Rodríguez, 2006).

**c. Principios activos**

El aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* está compuesto de una gran diversidad de monoterpenos, dentro de los cuales la mayoría de sus constituyentes son derivados del mentano, presente en diferentes especies de *Mentha*.

De acuerdo a esto, la actividad biológica reportada respecto a los diferentes constituyentes derivados de los aceites esenciales presentes en diferentes especies de *Mentha*, se caracterizan por una actividad antibacteriana moderada. Benzo *et al.* (2007), hallaron en el aceite esencial de *C. pulchellum* muchos constituyentes monoterpenos y otros presentes también en el aceite esencial de especies de *Mentha*. Esto no excluye por supuesto, que otros metabolitos secundarios, no presentes en el aceite esencial, puedan contribuir a la actividad biológica de esta planta.

Además, también son reconocidas las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales de *Clinopodium pulchellum*, se plantea un sinergismo entre las moléculas presentes en el aceite esencial, potenciando su capacidad antirradical. A su vez se

probó la toxicidad aguda de forma oral en ratones albinos, mostrándose depresión profunda, incoordinación motora, respiración acelerada, piloerección y sedación; siendo la dosis letal media de 777,19 mg/kg (Carhuapoma *et al.*, 2014).

De acuerdo a estudios de Velasco-Negueruela *et al.* (1983), reportaron que el aceite esencial de *C. pulchellum*, posee un contenido de mentona (3,92%), isomentona (12,16%), alfa-pineno (1,03%), canfeno (0,55%), limoneno (3,14%) y pulegona (72,42%). Sin embargo, Slavkovska *et al.* (2013), documentaron variaciones fenológicas en la composición del aceite, mostrando que la concentración de pulegona fue más alta (76,1%) en la etapa vegetativa, y disminuyó durante la floración (49,5%) y etapa de fructificación (34,7%), además, la concentración de mentona era más baja en la etapa vegetativa (7,8%), y luego aumentó linealmente durante la floración (28,7%) y la fase de fructificación (48,5%).

#### **e. Propiedades medicinales y usos**

Es empleada en la medicina tradicional como un antiséptico oral, además se le atribuye propiedades curativas para problemas gastrointestinales y respiratorios. Las partes utilizadas suelen ser las hojas, tallos e inflorescencias frescas o secas, para preparar las decocciones se emplean de 100 a 150 gramos por litro de agua, que se beben como mates, infusiones y aditivos a otras bebidas como la leche (Bussmann & Sharon, 2011).

### **2.4. Métodos de extracción de aceites esenciales**

#### **a. Destilación por arrastre de vapor de agua**

Es el método más utilizado y consiste en generar vapor que pasará a través de material vegetal fresco, el cual cederá su calor latente a la muestra para lograr su evaporación. (Peredo-Luna *et al.*, 2009). Formando dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia (Wankat, 1988).

Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles siguen la Ley de Dalton sobre las presiones parciales, que dice que: cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión como si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema. Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (destilación por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100 °C (UNAM, 2010).

**b. Hidrodestilación de tipo Clevenger**

Está compuesto de un balón, donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura, ésta se calienta y el aceite esencial con el agua presente se evaporan continuamente. Un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de D, permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua floral condensada regresa al balón por el rebose de la conexión (Cerpa, 2007).

**c. Extracción con solventes volátiles**

Se basa en la facilidad de los disolventes orgánicos para penetrar en el material vegetal y disolver sus aceites volátiles, debido a las diferencias de punto de ebullición entre el aceite esencial y el solvente. Tiene la ventaja de trabajar a temperaturas bajas, por lo que no provoca la termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además, ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad. Se utiliza a escala de laboratorio pues a escala industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias (algunas veces tóxicas). La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos, que se pueden separar por destilación controlada (SENA, 2012).



#### **d. Extracción por fluidos supercríticos**

Consiste en utilizar como material de arrastre sustancias químicas en condiciones especiales de temperatura y presión. El material vegetal se corta en trozos pequeños, se licua y se empaca en una cámara de acero inoxidable por donde se hace circular un líquido supercrítico. Los aceites esenciales se solubilizan y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene un aceite puro (Román *et al.*, 2016).

#### **e. Eufloración**

Se emplea para la extracción de esencias de flores delicadas, sensibles al calor y costosas como: rosa, jazmín, azahar, acacia, violeta, y resinas como la mirra. Los pétalos frescos se ponen en contacto con una delgada capa de grasa y el perfume emitido por las flores se absorbe. Después de dos o tres meses, muchas capas de grasa se saturan con las moléculas perfumadas del aceite de la flor, el cual se trata con alcohol y luego se destila para obtener la esencia. Es un procedimiento muy costoso por la mano de obra. Generalmente se sustituye por la extracción con hexano ligero como solvente. Este método tiene sus ventajas debido a que la extracción de algunas plantas tiene bajo contenido de aceite esencial, y otros métodos destruirían estas frágiles esencias (SENA, 2012).

### **2.5. Microorganismos patógenos**

Los microorganismos patógenos son aquellos que provocan serias consecuencias y perjuicios a la salud. Hay diferentes grados de patogenicidad y esto es, en relación al daño que generan en el huésped, ésta a su vez es generada por algunos mecanismos inherentes a estos microorganismos tales como, adhesividad, invasividad y toxigenicidad. En ocasiones algún microorganismo puede presentar uno, dos o los tres mecanismos, pero siempre tiende a predominar uno de ellos o a ser el principal (Romero, 2007). Entre los microorganismos patógenos más conocidos y estudiados tenemos a *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis; *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, causantes de infecciones respiratorias agudas; *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, causantes de enfermedades estomacales (por lo general asociadas a alimentos y hábitos

de higiene); *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, asociadas a infecciones intrahospitalarias y que a la actualidad, según la OMS (2017), tienen prioridad alta con respecto a su resistencia a los antimicrobianos; y no podemos dejar de mencionar a *Neisseria gonorrhoeae*, causante de la gonorrea.

**a. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619**

Es un diplococo Gram positivo, capsulado. Presenta morfología lanceolada, miden 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y se disponen en pares o diplos. Son anaerobias facultativas. Para su crecimiento y multiplicación tiene requerimientos específicos, como aportes de proteínas y suplementos hematológicos, por lo que es considerada una bacteria fastidiosa (Preado, 2001).

Su crecimiento en caldos es difuso, y en agar muestra colonias pequeñas, grisáceas y mucoides (acuosas), rodeadas de una zona verde de hemólisis parcial (hemólisis  $\alpha$ ) en el agar sangre de cordero al 5 por ciento. Algunos aislamientos son dependientes de CO<sub>2</sub> (5-7 %), atmósfera que favorece el crecimiento y el rango de temperatura a la cual se debe incubar es de 30 - 36 °C (OPS, 2012).

*S. pneumoniae* es sensible a optoquina y presenta solubilidad en bilis, estos ensayos son utilizados como pruebas presuntiva y confirmatoria respectivamente. Es un microorganismo patógeno, clasificado con bioseguridad del tipo II.

La cepa ATCC (American Type Culture Collection) 49619, es una cepa de referencia internacional recomendada por la CLSI (2018).

Se ha reportado presencia de actividad antimicrobiana en el extracto clorofórmico de *Phenax rugosus* (Perez *et al.*, 2007), extracto crudo de *Aspergillus fumigatus* (Sanchez, 2019), extracto hidro-alcohólico de hojas de *Cestrum hediondinum* Dun. (Zapata, 2017), extractos orgánicos de diversas partes de las plantas *Bauhinia sp.*, *Sambucus nigra*, *Eichhornia crassipes* y *Taraxacum officinale* (Rodriguez *et al.*, 2017), extractos etanólicos de *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Clinopodium bolivianum* y *Artemisa abrotanum* (Neyra, 2018), extractos de *Bellaco*

*caspi* (Guevara *et al.*, 2012) y el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) kuntze (Fonseca, 2016), frente a diferentes cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*.

También, se ha reportado que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* no presenta actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus pneumoniae* (Peña & Gutierrez, 2017).

## **2.6. Reglamentos de bioseguridad**

Conjunto de medidas preventivas reconocidas internacionalmente orientadas a proteger la salud y la seguridad del personal y su entorno. Complementariamente se incluye normas contra riesgos producidos por agentes físicos, químicos y mecánicos. Modernamente se incorporan también las acciones o medidas de seguridad requeridas para minimizar los riesgos derivados del manejo de un organismo modificado genéticamente (OMG), sus derivados o productos que los contengan, y uso de la tecnología del ADN recombinante (ingeniería genética) y otras técnicas moleculares más recientes (MINSA-INS, 2005).

Existen cuatro niveles de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos: Nivel de Bioseguridad Tipo 1 (NBS-1), Nivel de Bioseguridad Tipo 2 (NBS-2), Nivel de Bioseguridad Tipo 3 (NBS-3) y Nivel de Bioseguridad Tipo 4 (NBS-4). Estos se encuentran ampliamente detallados en el manual de bioseguridad en laboratorios de ensayos, biomédicos y clínicos elaborado por el Instituto Nacional de Salud (2005).

## **2.7. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana es la capacidad de un producto metabólico para perjudicar o inhibir el crecimiento de un microorganismo, estas sustancias pueden actuar de dos maneras: bactericida, si ésta ha eliminado al microorganismo o bacteriostática, si ha inhibido su crecimiento (Lizcano & Vergara, 2008).

Existen algunas técnicas *in vitro* que determinan si cierto compuesto presenta actividad antimicrobiana, estas se detallan a continuación:

**a. Prueba de difusión en agar empleando discos**

También llamado método de Kirby- Bauer, por ser quien lo describió por primera vez, este método está estandarizado y recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

Es una prueba cualitativa y 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. El disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde radialmente a través del espesor del agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, conocida también como halo de inhibición (García *et al.*, 2000).

**b. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba, por lo que es una prueba cuantitativa. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación de la CLSI 2018; los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente (Cavaliere *et al.*, 2005)

**2.8. Aromatograma**

Es un método de medida *in vitro* que se utiliza para probar y medir el poder antibacteriano de un aceite esencial. Permite observar el comportamiento del patógeno generalmente identificado, frente a uno o varios aceites seleccionados. Por lo general, se realiza en una placa Petri con un medio de cultivo y sobre este se colocan discos impregnados con el aceite esencial en estudio, aquí se observa el crecimiento del microorganismo y su inhibición se puede cuantificar mediante la medida de los halos de inhibición que se formen alrededor de los discos embebidos con los aceites esenciales (Romero, 2004).

## III. METODOLOGÍA

### 3.1. Materiales

- **Material Biológico**

**Muestras vegetales**

- Frutos maduros y frescos de *Schinus molle*
- Hojas frescas de *Senecio calvus*
- Hojas frescas de *Clinopodium pulchellum*

**Microorganismo**

- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

- **Modulo básico de Biología y Química**

- **Medios de cultivo**

- Agar Sangre (AS)
- Agar Mueller Hinton Sangre (MHS)
- Caldo Glicerol
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

- **Soluciones**

- Etanol al 70%
- Suero fisiológico 0,85% (P/V)

- **Equipos**

**Tabla 2: Equipos utilizados para la investigación**

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>	<b>Número de serie</b>	<b>Ubicación</b>
Refrigeradora eléctrica doméstica de 490 l.	Frigidaire	FFTR-1817LW	S/S	INS - IRA
Cabina de seguridad biológica - cámara de bioseguridad clase ii	Labconco	S/M	223323	INS – IRA
Turbidímetro	Siemens	Micros can	15104	INS - IRA
Agitador de tubos	Ika	BG3	7.100888	INS - IRA
Balanza analítica de precisión	Sartorius	CP323S	18708922	INS - IRA
Agitador magnetico con plancha de calentamiento 18 cm x 18 cm	Cimared	SP131320-33	1313051228516	INS - IRA
Equipo de baño maria de 25 l.	Memmert	S/M	W350713056	INS - IRA
Incubadora de cultivo de co2 de 170 l.	Thermo Scientific	IF110PLUS	D413.0620	INS – IRA
Congeladora eléctrica vertical hasta -80° c	Thermo Scientific	-	-	INS - IRA
Potenciómetro de mesa con electrodos y sensor de temperatura	Mettler Toledo	ORION 3 STAR	B38156	INS - IRA
Estufa de temperatura constante con aireación	Memmert	-	-	UNALM -Lab. Fitoquímica
Equipo de destilación por arrastre de vapor de agua	Armado In - house	-	-	UNALM -Lab. Fitoquímica
Equipo de hidrodestilación de tipo Clevenger	Armado In - house	-	-	UNALM -Lab. Fitoquímica

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Recolección de las muestras**

#### **a. *Schinus molle***

Se recolectaron frutos maduros frescos de árboles cultivados en el distrito de Cieneguilla – Lima, durante mes de julio del 2018.

#### **b. *Senecio calvus***

Se recolectaron plantas frescas en el Área de Conservación Regional Huaytapallana, provincia de Huancayo - Junin, durante el mes de agosto del 2018

#### **c. *Clinopodium pulchellum***

Se recolectaron plantas frescas en la provincia de Yungay – Ancash, durante el mes de enero del 2019.

### **3.2.2. Transporte de las muestras frescas**

Para conservar en óptimas condiciones las muestras se transportaron en una caja de cartón con base de papel craft con la parte lustrosa en contacto con la muestra, una vez colocada las muestras frescas fueron espolvoreadas con alcohol de 96 °C por cada 2 cm de espesor de muestra y finalmente cubiertas con el papel craft. El tiempo de transporte fue de 10 horas desde la recolección de la muestra hasta su destilación.

### **3.2.3. Identificación de las muestras**

*Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* fueron identificados en el Herbario MOL del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Las constancias se consignan en el Anexo 1.

### 3.2.4. Proceso de extracción de los aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales se realizó por la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua y por hidrodestilación con equipo Clevenger, de cada una de las especies, en el laboratorio de Fitoquímica del departamento de Química de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### a. Destilación por arrastre de vapor de agua (Peredo-Luna *et al.*, 2009)

Para este proceso se utilizaron muestras frescas de cada una de las especies en estudio. Los aceites esenciales obtenidos se preservaron en viales oscuros para protegerlos de la luz y en refrigeración, hasta su utilización.



*Figura 3:* Destilador por arrastre de vapor de agua

#### b. Hidrodestilación con equipo Clevenger (Cerpa, 2007)

Para este proceso se utilizaron muestras secas de cada una de las especies en estudio, éstas fueron secadas en estufa a 40 °C hasta peso constante (Ibarz, 2011).





**Figura 4: Hidrodestilador con equipo Clevenger**

### **3.2.5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) del Instituto Nacional de Salud (INS) sede de Jesus María (Anexo 2.)

#### **a. Agente biológico para las pruebas antimicrobianas**

El agente biológico fue *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 liofilizado (Anexo 3) y fue proporcionado por el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) del INS - Jesus María.

#### **b. Activación de las cepas**

Se hidrató la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 liofilizada con 1ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) y se sembró en placas de Agar Sangre de Cordero al 5 por ciento (AS), preparado “*in-house*”, en Cámara de Flujo Laminar de Bioseguridad tipo II. Luego se incubaron en estufa en un ambiente con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas (INS – IRA, 2005).

**c. Preparación del inóculo**

Se realizaron resiembras de las cepas activadas en placas de Agar Sangre de Cordero al 5 por ciento (AS). Luego se incubaron en estufa en un ambiente con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas.

**d. Antibióticos control**

Para el control de la susceptibilidad antimicrobiana se utilizaron antibióticos en discos recomendados por la guía del CLSI 2018 (Clinical and Laboratory Standards Institute) para *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (Tabla 3).

**Tabla 3: Antibióticos utilizados como controles positivos**

Nombre del antibiótico	Abreviación	Concentración (µg/disco)
Cloranfenicol	C	30µg
Oxacilina	OX	1µg
Trimeptoprin-Sulfametoxazol	SXT	25µg(1:5)

**e. Aromatograma y antibiograma control por método Kirby-Bauer**

Se inocularon placas de agar Mueller Hinton Sangre (MHS) con una dilución equivalente a 0.5 en la escala de McFarland de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Para el aromatograma se embebieron los discos de difusión estériles con 10 µl de cada aceite esencial en estudio. Se colocó un disco con aceite por placa y un disco estéril como control negativo y control de esterilidad. Se hicieron tres repeticiones de cada muestra.

El antibiograma se realizó con antibióticos control en discos (Tabla 2) y se colocaron tres por cada placa. Se hicieron tres repeticiones de cada una.

Todas las placas de incubaron en estufa en un ambiente con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas.

### 3.2.6. Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales

La concentración mínima inhibitoria se realizó en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) del Instituto Nacional de Salud (INS) sede de Jesus María (Anexo 2).

#### a. Preparación de las diluciones de aceites esenciales

Para realizar las diluciones de los respectivos aceites esenciales se utilizó aceite vegetal de girasol estéril. Se hicieron tres diluciones de cada aceite esencial (75% (V/V), 50% (V/V) y 25% (V/V)).

Las diluciones se prepararon en microtubos esteriles de 0,5 ml y se homogenizaron (Tabla 4).

**Tabla 4:** *Diluciones de los aceites esenciales de Schinus molle, Senecio calvus y Clinopodium pulchellum para evaluar la concentración mínima inhibitoria*

Dilución %(V/V)	Volumen de aceite esencial ( $\mu$ l)	Volumen de aceite de girasol ( $\mu$ l)	Volumen final ( $\mu$ l)
100%	80	0	80
75%	60	20	80
50%	40	40	80
25%	20	60	80
0% (Control)	0	80	80

#### b. Preparación del inóculo de *S. pneumoniae* ATCC 49619

Se realizaron resiembras de las cepas activadas en placas de Agar Sangre de Cordero al 5 por ciento (AS). Se incubaron en estufa en un ambiente con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas.

#### c. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se inocularon placas de agar Mueller Hinton Sangre de Cordero al 5 por ciento (MHS) con una dilución equivalente a 0.5 en la escala de McFarland de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Luego, se embebieron los discos de difusión estériles con 10 µl de cada dilución de aceite esencial, se colocó un disco por cada dilución y un disco esteril como control negativo y control de esterilidad por placa. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra.

Todas las placas de incubaron en estufa con 5 por ciento de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas.

### **3.2.7. Interpretación de los resultados**

Se midieron los halos de inhibición, en milímetros (mm), de cada disco con un Vernier. La interpretación de los resultados se realizó según la escala de Duraffourd siendo:

- Sensibilidad nula (-) para un diámetro menor a 8 mm
- Sensibilidad límite (+) para un diámetro entre 8 a 14 mm
- Sensibilidad media (++) para un diámetro entre 14 a 20 mm
- Sensibilidad alta (+++) para un diámetro mayor a 20 mm

### **3.2.8. Análisis estadístico**

Se realizaron modelos lineales generales y mixtos para considerar la heterogeneidad de varianza durante el estudio (Di Rienzo, Macchiavelli, & Casanoves, 2017) para la actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria. Se analizó la normalidad usando la prueba de Shapiro-Francia (Shapiro & Francia, 1972). La homocedasticidad es una propiedad fundamental del modelo de regresión lineal general y está dentro de sus supuestos básicos, por lo que haciendo un gráfico de dispersión de residuos versus valores predichos se debe observar una nube de puntos sin patrón alguno, es decir, patrón aleatorio (Di Rienzo *et al.*, 2008). Se utilizó el programa INFOSTAT 2018.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Recolección de las muestras

#### a. *Schinus molle*

Se recolectó 2000g de racimos de frutos maduros y frescos de árboles cultivados, obtenidos en el distrito de Cieneguilla, Lima (Figura 3(A)).

Se obtuvo 1710g de frutos maduros y frescos (Figura 3(B)).



**Figura 5: A. Racimos de frutos de *Schinus molle*. B. Frutos frescos de *Schinus molle*.**

#### b. *Senecio calvus*

Se recolectó 1000g de plantas frescas, obtenidas en el Área de Conservación Regional Huaytapallana, en la provincia de Huancayo, Junín (Figura 4(A)).

Se obtuvo 703.4g de hojas frescas (Figura 4(B)).



**Figura 6: A. Plantas de *Senecio calvus*. B. Hojas frescas de *Senecio calvus*.**

**c. *Clinopodium pulchellum***

Se recolectó 2000g de plantas frescas, obtenidas de la provincia de Yungay, Ancash (Figura 5(A)).

Se obtuvo 460.5g de hojas frescas (Figura 5(B)).



**Figura 7: A. Planta de *Clinopodium pulchellum*. B. Hojas frescas de *Clinopodium pulchellum*.**

## 4.2. Identificación de las muestras

*Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* fueron identificados en el Herbario MOL del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina con los siguientes números de constancia (Anexo 1.):

- a. *Schinus molle* L.: 030-2019-HM-UNALM
- b. *Senecio calvus* Cuatrec.: 029-2019-HM-UNALM
- c. *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts: 031-2019-HM-UNALM

## 4.3. Proceso de extracción de aceites esenciales

### 4.3.1. Destilación por arrastre de vapor de agua

Se utilizó material vegetal fresco de cada especie y se colocó en el destilador por arrastre de vapor de agua. Los pesos destilados y sus rendimientos se detallan en la Tabla 5.

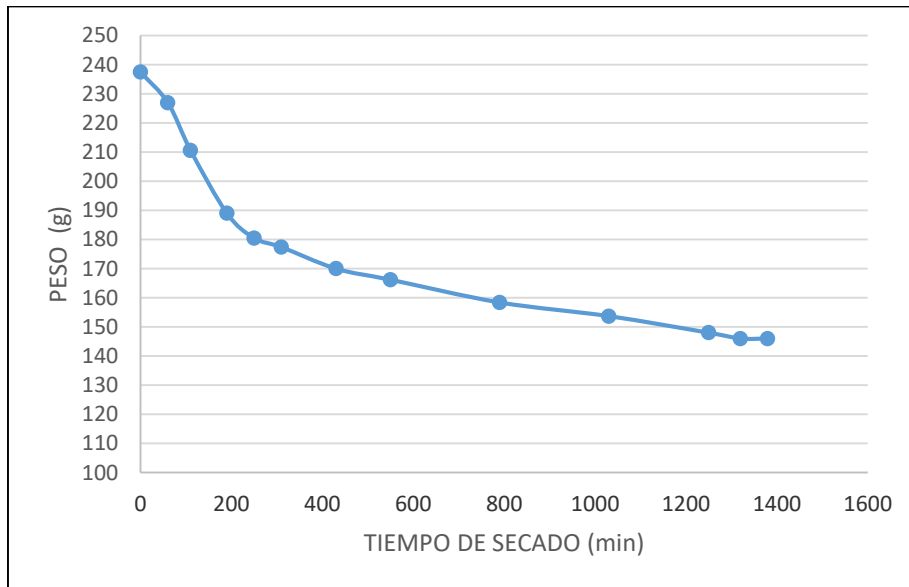
**Tabla 5:** Pesos de los aceites esenciales destilados (g) y rendimiento (%(w/w)) de los aceites esenciales obtenidos por el método de destilación por arrastre de vapor de agua

Destilación por arrastre de vapor de agua			
Muestra vegetal	Peso fresco (g)	Peso de aceite esencial destilado (g)	Rendimiento (% (w/w))
<i>Schinus molle</i>	60.0	1.79	2.99%
<i>Senecio calvus</i>	264.0	1.61	0.61%
<i>Clinopodium pulchellum</i>	209.5	1.27	0.61%

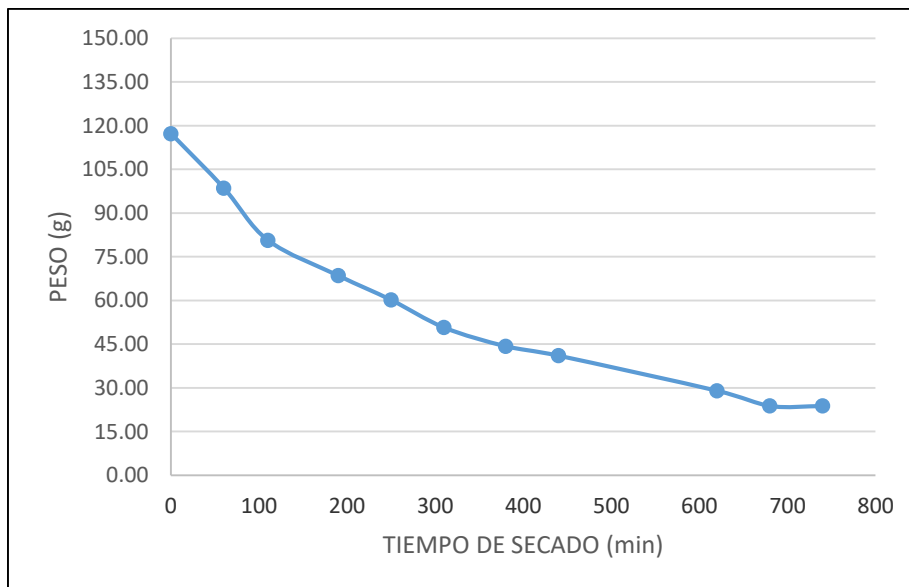
### 4.3.2. Hidrodestilación con equipo Clevenger

Para este proceso primero fue necesario la estabilización de la muestra, para ello, se secaron las muestras en una estufa con aire circulante a 40 °C y se realizó una curva de

secado cuyos valores se detallan en la Figura 6 para *Schinus molle*; en la Figura 7 para *Senecio calvus* y en la Figura 8 para *Clinopodium pulchellum*.

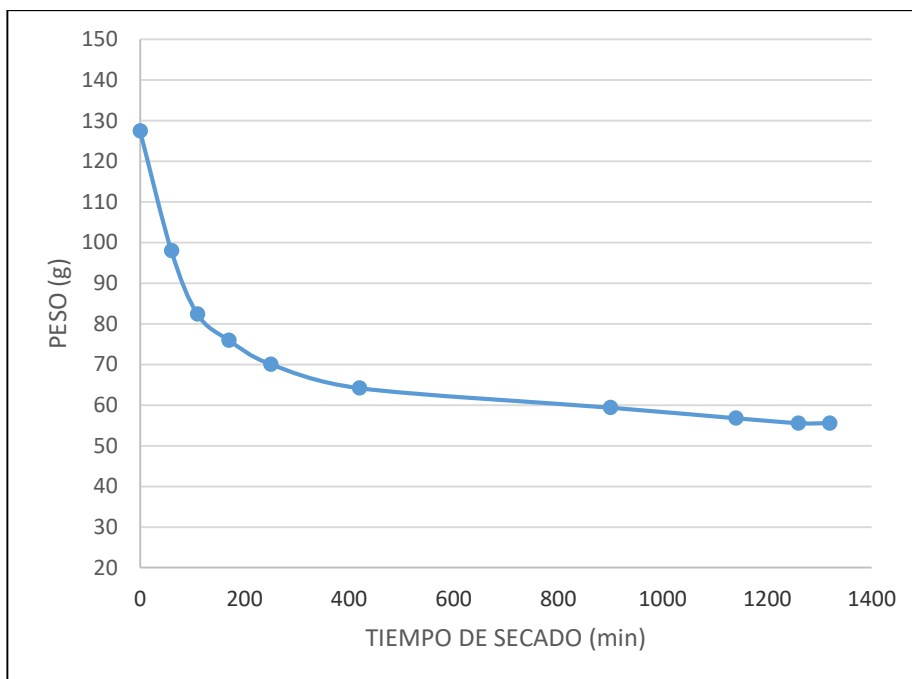


**Figura 8:** Curva de secado de los frutos frescos de *Schinus molle*, a temperatura constante de 40 °C



**Figura 9:** Curva de secado de las hojas frescas de *Senecio calvus*, a temperatura constante de 40 °C





**Figura 10:** Curva de secado de las hojas frescas de *Clinopodium pulchellum*, a temperatura constante de 40 °C

Luego las muestras secas fueron molidas para obtener muestra particulada y procesadas con agua destilada en un hidrodestilador con equipo Clevenger, obteniéndose los pesos destilados y sus rendimientos detallados en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Pesos de los aceites esenciales destilados (g) y rendimiento (%(w/w)) de los aceites esenciales obtenidos por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger

Destilación por arrastre de vapor de agua			
Muestra vegetal	Peso fresco (g)	Peso de aceite esencial destilado (g)	Rendimiento (% (w/w))
<i>Schinus molle</i>	97.60	2.48	2.54%
<i>Senecio calvus</i>	138.58	0.7	0.53%
<i>Clinopodium pulchellum</i>	91.72	0.5	0.53%

**Tabla 7: Tabla comparativa de los rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* obtenidos por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger**

Aceite esencial	Rendimiento de extracción (% (w/w))	
	Destilación por arrastre de vapor de agua	Hidrodestilación con equipo Clevenger
<i>Schinus molle</i>	2.99%	2.54%
<i>Senecio calvus</i>	0.61%	0.53%
<i>Clinopodium pulchellum</i>	0.61%	0.53%

El rendimiento de un aceite esencial no solo depende del volumen de aceite esencial destilado y el peso de la muestra, sino que también hay factores ambientales que intervienen en éste como la edad del cultivo, condiciones climáticas, labores agrícolas, métodos de extracción (Angulo, 2015). Sin duda todos estos factores son importantes y permiten que la calidad y rendimiento de los aceites esenciales sean óptimos.

En este estudio se puede observar que el rendimiento de extracción de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por el método de destilación por arrastre de vapor de agua es mayor que con el método de hidrodestilación con equipo Clevenger (Tabla 7). Esto podría deberse a que en el proceso de secado de la muestra parte del aceite esencial se ha evaporado, si no es así este resultado podría sugerir que se obtiene una mejor calidad de aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, sin embargo, para llegar a esta conclusión es necesario realizar más estudios controlando las variables ambientales antes mencionadas que intervienen en el rendimiento de extracción del aceite esencial y hacer repeticiones para su respectivo análisis estadístico. A su vez se midieron los índices de refracción de cada aceite esencial obtenido (Tabla 8).

**Tabla 8: Índice de refracción de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum***

Aceite esencial	Rendimiento de extracción (% (w/w))	
	Destilación por arrastre de vapor de agua	Hidrodestilación con equipo Clevenger
<i>Schinus molle</i>	1.4752	1.4779
<i>Senecio calvus</i>	1.5092	1.4987
<i>Clinopodium pulchellum</i>	1.4768	1.4841

El índice de refracción del aceite esencial de *Schinus molle* obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua es 1.4752 y se encuentran dentro de los rangos reportados (1.476 - 1.484) por Plaza & Ricalde (2015). Por otro lado, el índice de refracción del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* extraído por el método de destilación por arrastre de vapor de agua en este estudio es 1.4768, cuyo valor es similar a los reportados anteriormente: 1.475 (Tapia, 2018), 1.489 (Cueva, 2017), 1.494 (Carhuampoma *et al.*, 2014). Sin embargo, no se han reportado valores de índices de refracción para el aceite esencial de *Senecio calvus* hasta el momento. Cabe resaltar que tampoco se han reportado valores de índices de refracción para ningún aceite esencial de las especies vegetales en estudio por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger.

#### 4.4. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) del Instituto Nacional de Salud (INS), en la sede de Jesús María (Anexo 2). El agente microbiológico utilizado fue *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, brindado por dicha institución.

La cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 liofilizada fue activada y preparada para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Figura 9), considerando todos los estándares de Bioseguridad tipo II (INS - IRA, 2005). Se realizó la prueba por triplicado.



**Figura 11: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, cultivada en agar sangre de cordero al 5% (AS)**

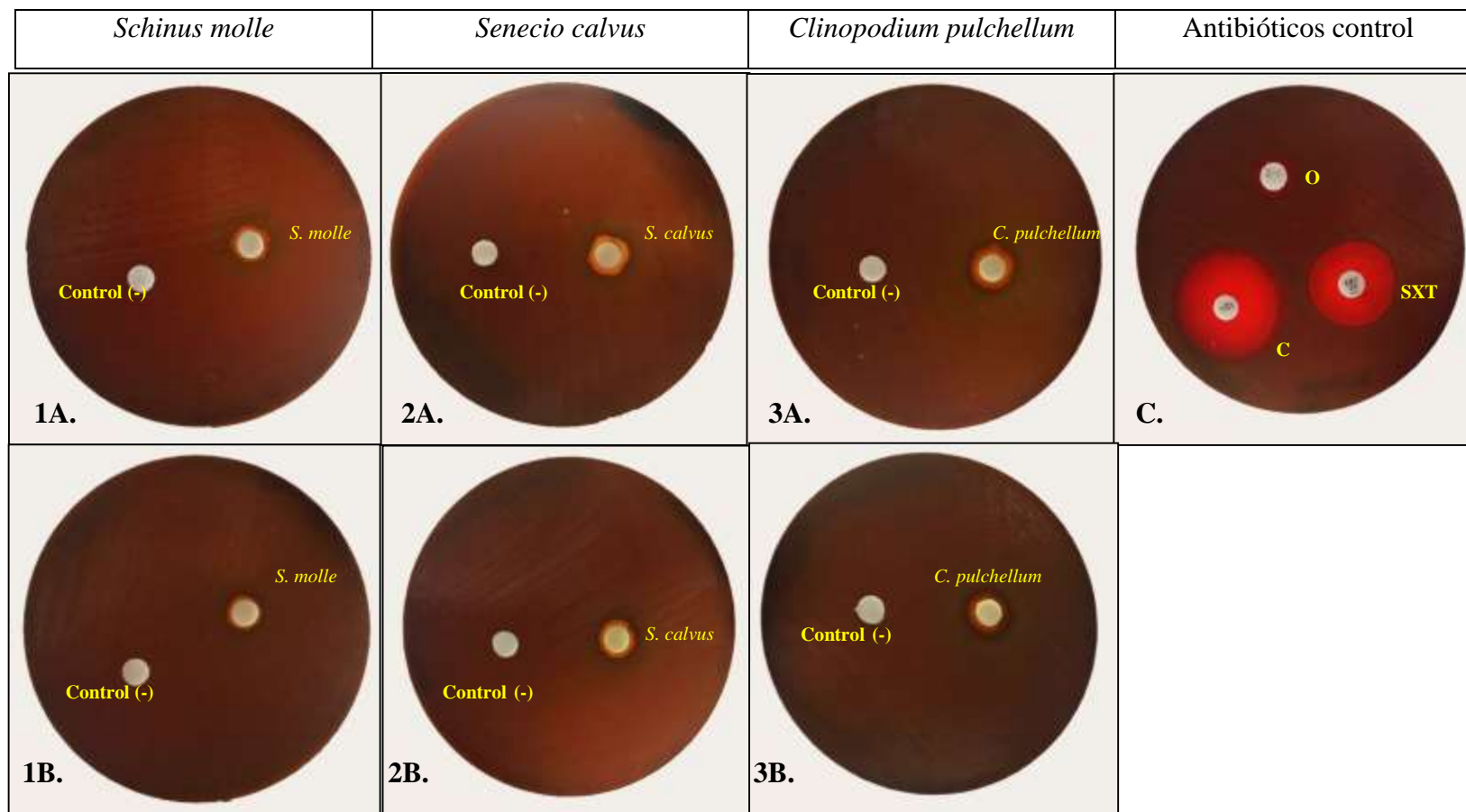
Los halos de inhibición se midieron con un Vernier en mm, detallado en las Tablas 9 y 10, y se muestran en la Figura 10.

**Tabla 9: Medida de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por el método de destilación por arrastre de vapor de agua**

Aceite esencial	Actividad antimicrobiana					
	Destilación por arrastre de vapor de agua					
	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Promedio (mm)	Escala de Duraffourd	Interpretación
<i>Schinus molle</i>	9.26	9.2	9.18	9.21	+	Sensibilidad límite
<i>Senecio calvus</i>	9.46	10.4	9.82	9.89	+	Sensibilidad límite
<i>Clinopodium pulchellum</i>	10.6	10.7	10.88	10.73	+	Sensibilidad límite

**Tabla 10: Medida de los halos de inhibición de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger**

Aceite esencial	Actividad antimicrobiana					
	Hidrodestilación con equipo Clevenger					
	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Promedio (mm)	Escala de Duraffourd	Interpretación
<i>Schinus molle</i>	9.24	8.72	9.06	9.01	+	Sensibilidad límite
<i>Senecio calvus</i>	8.92	9.02	9.74	9.23	+	Sensibilidad límite
<i>Clinopodium pulchellum</i>	9.86	9.84	9.92	9.87	+	Sensibilidad límite



**Figura 12:** Halos de inhibición de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* destilado por el método de arrastre de vapor de agua (1A, 2A y 3A respectivamente) y por hidrodestilación con equipo Clevenger (1B, 2B y 3B respectivamente), frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. C. Halos de inhibición de los controles positivos, antibióticos SXT (Trimetropin – Sulfametoxazol 25µg), C (Cloranfenicol 30µg) y OX (Oxacilina 1µg)

La interpretación de la actividad antimicrobiana según la escala de Duraffourd para el aceite esencial de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* obtenidos por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 es sensibilidad límite, estos resultados determinan que si hay actividad antimicrobiana, aunque baja.

Se ha reportado actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* frente a *Streptococcus mutans* (Rivadeneira-Cajas & Alvarez-Velazco, 2015), *Escherichia coli* (Ramirez & Soto, 2018), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Rocha *et al.*, 2012) y también de actividad antimicrobiana nula contra *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* según Moncada (2013).

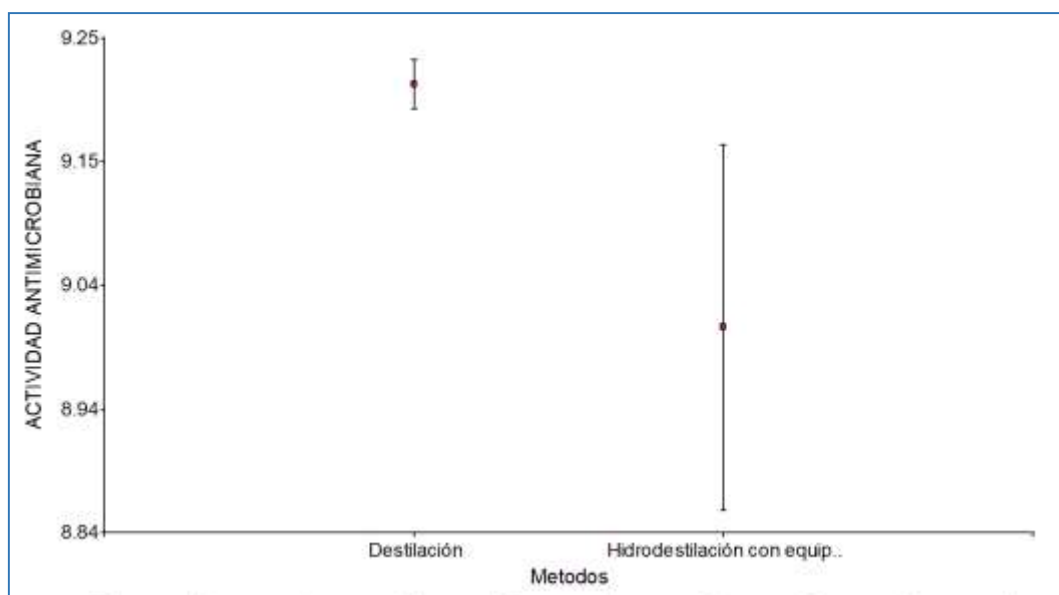
En el 2017, se reportó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Senecio calvus* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI: 10ug/ml) y *Bacillus subtilis* (CMI: 0.625ug/ml) por Alderete (2017). A su vez, se ha reportado actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* frente a *Candida albicans* (Tapia, 2018), *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Cueva, 2017).

Cabe resaltar que no se ha reportado anteriormente actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* frente a *Streptococcus pneumoniae* por lo que esta investigación constituye conocimiento generado para estudios posteriores.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales dependen de su composición; en el caso del aceite esencial de *Schinus molle* se ha registrado predominancia del biciclogermacreno (20.5%), betaacariofileno (19.7%) y el espatulenol (19.2%) en su composición (Muhr *et al.*, 2015); así también, para el aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* se ha reportado que la pulegona es su compuesto mayoritario (Velasco-Neueruela & Alonso, 1983); y recientemente se ha determinado que en el aceite esencial de *Senecio calvus* predomina el  $\gamma$ -terpineno (Alderete, 2017). Sin embargo, hay autores que refieren que estos no actúan solos, sino que hay una sinergia entre otros compuestos no mayoritarios, dando como resultado su actividad antimicrobiana.

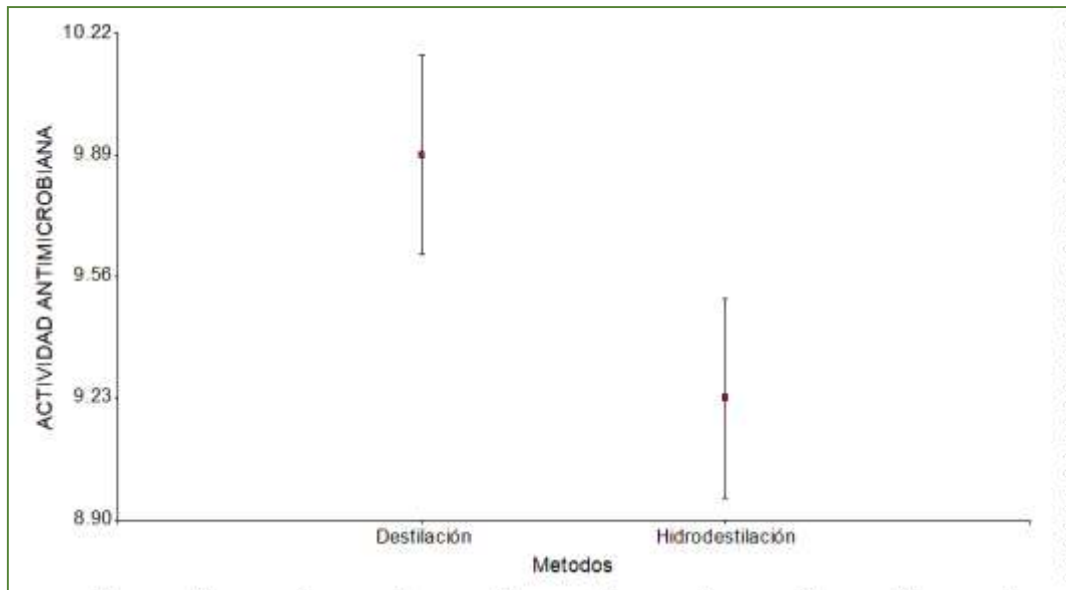
Con este estudio se abren investigaciones futuras para evaluar los posibles usos alternativos o complementarios de los aceites esenciales de *Schinus molle*, *Clinopodium pulchellum* y *Senecio calvus* frente a *Streptococcus pneumoniae*.

Según el análisis estadístico realizado, para *Schinus molle* y *Senecio Calvus*, con el análisis de varianzas (ANOVA), se obtiene un p-valor  $> 0.05$ , por lo que se interpreta que no hay diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de los aceites obtenidos por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger (Figuras 13 y 14).



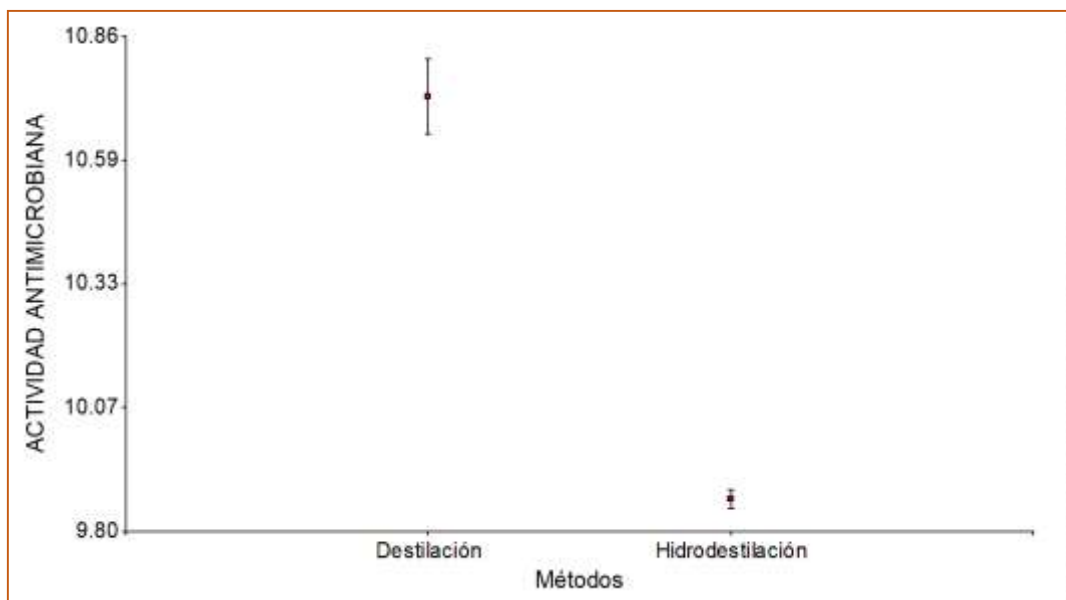
**Figura 13:** Comparación de la extracción del aceite esencial de *Schinus molle* por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger





**Figura 14:** Comparación de la extracción del aceite esencial de *Senecio calvus* por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger

Sin embargo, para *Clinopodium pulchellum* el  $p$ -valor  $< 0.05$ , por lo tanto si hay diferencias significativas entre la destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger (Figura 15).



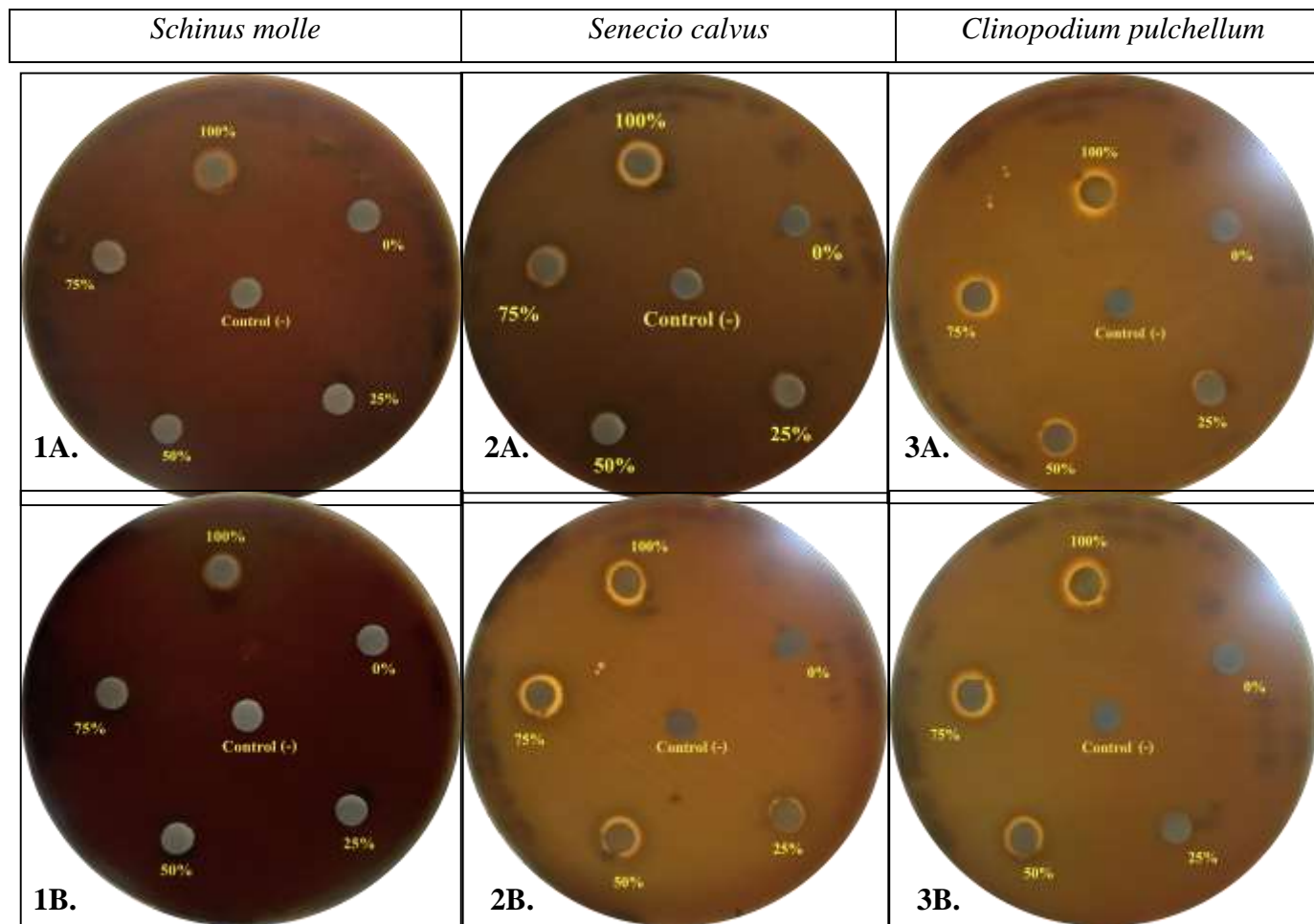
**Figura 15:** Comparación de la extracción del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger

Esto quiere decir que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* obtenido por el método de destilación por arrastre de vapor de agua presenta mayor halo de inhibición frente a *Streptococcus pneumoniae* que el obtenido por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger.

#### **4.5. Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria se llevó a cabo en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) del Instituto Nacional de Salud (INS), sede de Jesus Maria. El agente microbiológico utilizado fue *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 de la siembra anterior.

La prueba se realizó por triplicado, los halos de inhibición fueron medidos con un vernier en mm y se muestran en la Figura 16. La concentración mínima inhibitoria para el aceite esencial de *Schinus molle* extraído por destilación por arrastre de vapor de agua fue del 100 por ciento, para *Senecio calvus* del 75 por ciento y *Clinopodium pulchellum* del 50 por ciento (Tabla 11). Del mismo modo, la concentración mínima inhibitoria para el aceite esencial de *Schinus molle* extraído por hidrodestilación con equipo Clevenger fue del 100 por ciento, para *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* del 50 por ciento cada uno (Tabla 12).



**Figura 16:** Halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* destilado por el método de arrastre de vapor de agua (1A, 2A y 3A respectivamente) y por hidrodestilación con equipo Clevenger (1B, 2B y 3B respectivamente) frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

**Tabla 11: Medida de los halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por el método de destilación por arrastre de vapor de agua**

<b>DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA</b>			
<b>Aceite esencial</b>	<i>Schinus molle</i>	<i>Senecio calvus</i>	<i>Clinopodium pulchellum</i>
<b>Dilución</b>		<b>100%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	9.22	9.96	10.38
<b>R2 (mm)</b>	9.50	9.44	10.50
<b>R3 (mm)</b>	9.34	9.64	10.72
<b>Promedio (mm)</b>	9.35	9.68	10.53
<b>Escala de Duraffourd</b>	+	+	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>75%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	6.96	8.04	9.22
<b>R2 (mm)</b>	7.10	7.86	9.44
<b>R3 (mm)</b>	7.00	8.22	9.12
<b>Promedio (mm)</b>	7.02	8.04	9.26
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	+	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>50%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	0.00	7.20	8.26
<b>R2 (mm)</b>	0.00	7.36	8.72
<b>R3 (mm)</b>	0.00	7.42	7.94
<b>Promedio (mm)</b>	0.00	7.33	8.31
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	-	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad nula	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>25%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	0.25	7.74	6.96
<b>R2 (mm)</b>	0.25	6.82	6.20
<b>R3 (mm)</b>	0.25	7.56	7.00
<b>Promedio (mm)</b>	0.25	7.37	6.72
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	-	-
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad nula	Sensibilidad nula

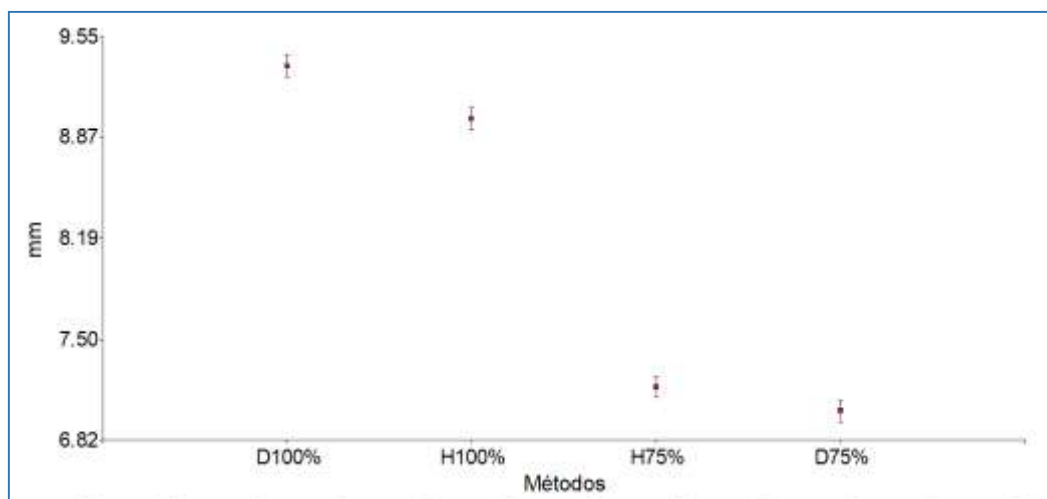
**Tabla 12: Medida de los halos de inhibición de las diluciones del aceite esencial de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* por el método de hidrodestilación con equipo Clevenger**

<b>HIDRODESTILACIÓN CON EQUIPO CLEVINGER</b>			
<b>Aceite esencial</b>	<i>Schinus molle</i>	<i>Senecio calvus</i>	<i>Clinopodium pulchellum</i>
<b>Dilución</b>		<b>100%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	8.96	9.44	10.00
<b>R2 (mm)</b>	8.98	9.18	9.86
<b>R3 (mm)</b>	9.05	9.02	9.92
<b>Promedio (mm)</b>	9.00	9.21	9.93
<b>Escala de Duraffourd</b>	+	+	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>75%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	6.98	8.96	9.02
<b>R2 (mm)</b>	7.20	8.70	8.98
<b>R3 (mm)</b>	7.36	8.70	8.90
<b>Promedio (mm)</b>	7.18	8.79	8.97
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	+	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>50%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	0.00	8.92	8.52
<b>R2 (mm)</b>	0.00	8.14	8.10
<b>R3 (mm)</b>	0.00	8.04	7.86
<b>Promedio (mm)</b>	0.00	8.37	8.16
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	+	+
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad límite	Sensibilidad límite
<b>Dilución</b>		<b>25%</b>	
<b>R1 (mm)</b>	0.00	7.52	6.30
<b>R2 (mm)</b>	0.00	7.84	6.42
<b>R3 (mm)</b>	0.00	7.88	6.20
<b>Promedio (mm)</b>	0.00	7.75	6.31
<b>Escala de Duraffourd</b>	-	-	-
<b>Interpretación</b>	Sensibilidad nula	Sensibilidad nula	Sensibilidad nula

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Schinus molle*, obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua, frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 es del 100 por ciento y resulta el mismo valor (100%) por hidrodestilación con equipo Clevenger. Esto quiere decir que su uso se limita a su estado más puro. Por otra parte, la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Senecio calvus* obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 es del 75 por ciento, no obstante, el mismo obtenido por hidrodestilación con equipo Clevenger es del 50 por ciento. Es así que su uso más conveniente sería el obtenido por hidrodestilación con equipo Clevenger.

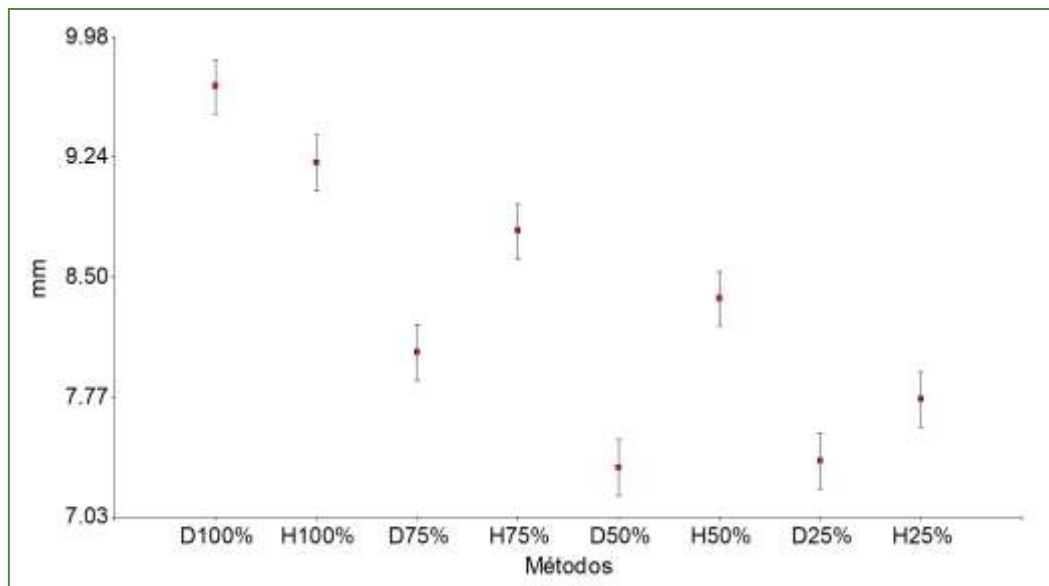
Por último, la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* obtenido por destilación por arrastre de vapor de agua frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 es del 50 por ciento y de igual forma obteniéndose por hidrodestilación con equipo Clevenger.

Estadísticamente, *Schinus molle* obtuvo un p-valor  $> 0.05$  en el análisis de varianzas (ANOVA), por lo que no hay diferencias significativas entre el método de extracción por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger (Figura 17).



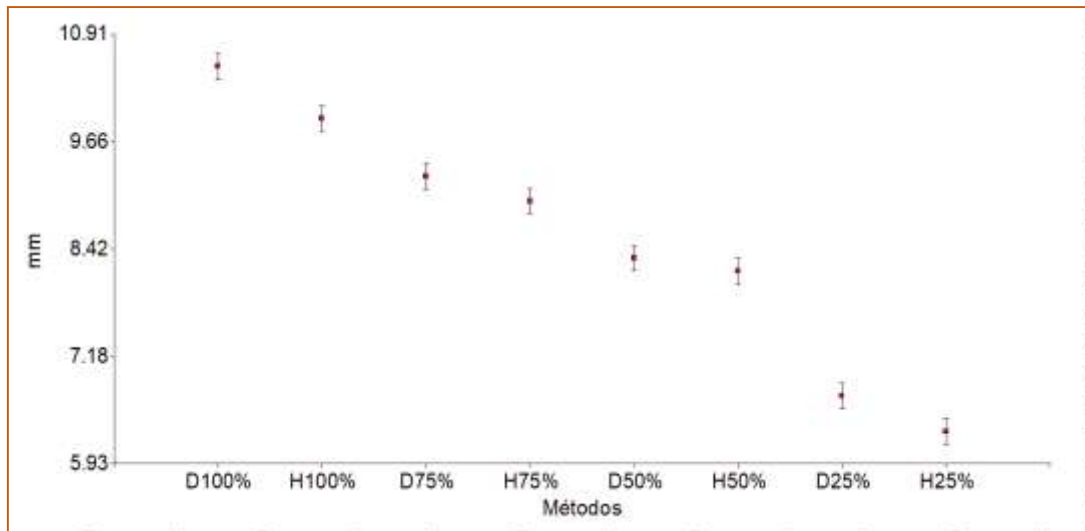
**Figura 17: Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Schinus molle* extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger**

Sin embargo, *Senecio Calvus* obtuvo un p-valor  $< 0.05$  en el análisis de varianzas (ANOVA), por lo que si hay diferencias significativas entre el método de extracción por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger (Figura 18).



**Figura 18:** Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Senecio calvus* extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger

Finalmente, *Clinopodium pulchellum* obtuvo un p-valor  $> 0.05$  en el análisis de varianzas (ANOVA), por lo que no hay diferencias significativas entre el método de extracción por destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger (Figura 19).



**Figura 19:** Comparación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* extraído por destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación con equipo Clevenger



## V. CONCLUSIONES

1. Se determinó que si existe actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por **destilación por arrastre de vapor de agua** de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, según la escala de Duraffourd tienen sensibilidad límite (+).
2. Se determinó que si existe actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por **hidrodestilación con equipo Clevenger** de *Schinus molle*, *Senecio calvus* y *Clinopodium pulchellum* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, según la escala de Duraffourd tienen sensibilidad límite (+).
3. En la comparación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor de agua y por hidrodestilación con equipo Clevenger de *Schinus molle* y *Senecio calvus* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, con un intervalo de confianza del 95 por ciento, se estableció que no hay diferencias significativas entre estos dos métodos de extracción. Sin embargo, se demostró que si hay diferencias significativas entre el método de destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger para *Clinopodium pulchellum*, con un intervalo de confianza del 95 por ciento.
4. Se estableció que la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial obtenido por **destilación por arrastre de vapor de agua** de *Schinus molle* es 100 por ciento, de *Senecio calvus* 75 por ciento y de *Clinopodium pulchellum* 50 por ciento, frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

5. Se estableció que la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial obtenido por **hidrodestilación con equipo Clevenger** de *Schinus molle* es 100 por ciento, de *Senecio calvus* 50 por ciento y de *Clinopodium pulchellum* 50 por ciento, frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
  
6. Con un intervalo de confianza del 95 por ciento se determinó que no hay diferencias significativas entre el método de destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger para obtener la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *Schinus molle* y *Clinopodium pulchellum* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Sin embargo, se demostró que si hay diferencias significativas entre el método de destilación por arrastre de vapor de agua e hidrodestilación con equipo Clevenger para la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Senecio calvus* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, con un intervalo de confianza del 95 por ciento.
  
7. Cabe resaltar que, en esta investigación se determinó por primera vez la actividad antimicrobiana de *Senecio calvus*, *Schinus molle* y *Clinopodium pulchellum* y su respectiva concentración mínima inhibitoria frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización química de la composición de los aceites esenciales extraídos para un mejor entendimiento del comportamiento de su actividad antimicrobiana.
- Realizar estudios sobre actividad antimicrobiana de mezclas de aceites esenciales, para potenciar sus efectos frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- Con los datos obtenidos en esta investigación, se podría considerar al aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts para futuras investigaciones como antimicrobiano frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- Realizar estudios con otras especies vegetales medicinales del Perú, para evaluar la actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar A. (2012). Destilación por arrastre de vapor. Guía de Laboratorio de Química Orgánica. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. pp 10-12.
- Alzamora, L.; Morales, L.; Armas, L.; Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú, Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales de la facultad de Medicina. UNMSM. Lima, Perú. Vol. 62 (2): 156 – 161.
- Alderete Espejo, H. (2017). Actividad antimicrobiana, antioxidante in vitro y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú. (Tesis de título de Químico Farmacéutico). Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú. pp 39,55.
- Angulo Gutierrez, O. (2015). Extracción y caracterización de aceite esencial del molle *Schinus molle* por medio de fluidos supercríticos. (Tesis de Doctorado). Escuela de Post Grado, Facultad de Ingeniería Química. UNCP. Huancayo, Perú. pp 40.
- Arellano, P. (1992). El libro verde – Guía de Recursos Terapéuticos Vegetales. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Medicina Tradicional. Lima, Perú. pp. 26, 41-42.
- Benzo, M.; Gilardoni, G.; Gandini, C.; Caccialanza, G.; Finzi, P.V.; Vidari, G.; Layedra, P. (2007). Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography-olfactometry incremental dilution technique. *Journal of Chromatography A*, 1150 (1-2), 131–135.

- Bussmann Rainer, W.; Glenn, A. (2010). Plantas medicinales utilizadas en Perú para el tratamiento de enfermedades respiratorias. *Revista peruana de biología*, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. 17(2): 331 – 346.
- Bussmann, R.; Sharon, D. (2011). Antibacterial activity of northern-peruvian medicinal plants. *Ethnobotany*, 15(1), 127–148.
- Carhuapoma, M.; López, S.; Veliz, F.; Inostrosa, L.; Yuli, R.; Carlos, N. (2014). Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja pulchella* “Panizara”. *Theorema-UNMSM*. Vol. I (1): 57–63.
- Cavalieri, S.; Rankin, I.D.; Herbeck, R.J. (2005). Manual of antimicrobial susceptibility testing. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington Seattle, Washington.
- Cerpa, M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y Caracterización. Tesis de grado para la obtención del título de Doctor. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. España. pp. 14.
- Chase, M.; Reveal, J. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. USA. 161, 122–127.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-eight informational supplement. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Córdor, G. (2014). Evaluación de la actividad expectorante de molle (*Schinus molle*). (Tesis de grado). Ecuador.
- Cueva Julca, E. (2017). Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”. (Tesis de título de Químico Farmaceutico). Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina Humana. Universidad San Pedro. Chimbote, Perú. pp 2.

- Rocha, P.M.; Rodilla, J.M.; Díez, D.; Elder, H.; Guala, M.S.; Silva, L.A. & Pombo, E.B. (2012). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(10).
- Deveci, O.; Sukan, A.; Tuzun, N. & Kocabas, E. (2010). Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 2211-2216.
- Dikshit, A.; Naqvi, A.A.; Husain, A. (1986). *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5): 1085-88.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. & Robledo, C.W. (2008). InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 1, 84–144. <https://doi.org/10.1203/00006450-199904020-00234>.
- Di Rienzo, J.A.; Macchiavelli, R.E.; Casanoves, F. (2017). Modelos Lineales Mixtos: aplicaciones en InfoStat, 3.
- Fonseca Chasipanta, E. (2016). Evaluación in vitro de la actividad del aceite esencial de Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175). (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador. pp 32-40.
- Galán, A.; Sánchez, I. (2013). Principios de botánica farmacéutica. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. Cajamarca. pp 49-50.
- Garcia, R.J.A.; Cartón, R., Garcia, S.J.E.; Gómez-Lus, M.L.; Martínez, M.L.; Rodríguez-Avial, C.; Vila, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España. 11: 4-5.

- Guevara, J.M.; Fuertes, C.; Valencia, E.; Guevara, G.J.M.M.; Zerpa, R.; Béjar, V.; Patiño, L.; Celis, J.C. (2012). Acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de *Streptococcus pneumoniae*. *Anales de la Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Peru.* 73(4): 28 1-3.
- Gundidza, M. (1993). Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Cent. Afric. J. Med.* 39:231-234 pp.
- Ibarz, A.; Barbosa-Cánovas, G. (2011). *Tecnología de alimentos. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos.* Ediciones Mundi- Prensa. México. pp. 587-590.
- Loja Herrera, B. (2002). Contribución al estudio florístico de la provincia de Concepción, Junín: Dicotiledóneas. (Tesis de Maestría). Escuela de Post Grado, Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima, Perú. pp 81.
- Ministerio de Salud (MINSA). (2016). Neumonías. Lima, Perú. Recuperado de <http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2016/neumonia/index.asp?op=1>
- Ministerio de Salud (MINSA) – INS (Instituto Nacional de Salud). (2005). Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. (3a ed.). Lima, Perú. pp 12 – 108.
- Moncada Valerio, F. (2013). Determinación de la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) de Arequipa y Moquegua contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. pp 93.
- Muhl, P.; Cuelho, C.; Brondani, J. & Manfron, M. (2015). Chemical composition of the *Schinus molle* L. essential oil and their biological activities. *Revista Cubana de Farmacia.* 49. 1-10.

- Neira Llerena, J. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de Tuctumpaya, Quequeña y Chiguata, frente a bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* - *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones de importancia médica Arequipa – Perú 2017. (Tesis de grado). Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú. pp 37 - 59.
  
- Tapia Manrique, E. (2018). Composición química, actividad antioxidante y anti *Candida albicans* del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "Panizara". (Tesis de Doctorado). Unidad de Posgrado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú. pp 71.
  
- The Field Museum. (2009). Muestras Neotropicales del Herbario. Chicago, USA. Recuperado de: <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/index.php?language=esp&page=view&id=65934&PHPSESSID=b85&PHPSESSID=b85>.
  
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) - Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012). Procedimientos para el diagnóstico de Neumonías y Meningitis bacterianas y la caracterización de cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, SIREVA II. Bogotá, Colombia. pp 4-5.
  
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) - Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Infecciones Respiratorias Agudas en el Perú: Experiencia frente a las bajas temperaturas. Lima, Perú. Recuperado de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28549/iras2014-spa.pdf>
  
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) - Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
  
- Peña, D.; Gutierrez, M. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthontachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas.



- Pérez, J.; Isaza, G.; Acosta, S. (2007). Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia crisantha*. *Revista Biosalud*. Colombia. Vol. 6. pp 59-68
- Plaza, M.; Ricalde, M. (2015). Establecer parámetros de control de calidad físico-químicos del aceite esencial de *Schinus molle* l. obtenido por arrastre de vapor. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación*. 11 (12): 693-696.
- Preado Jiménez, V. (2001). Conceptos Microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. ISSN: 0716-1018, *Revista Chilena de Infectología*. Santiago, Chile. Vol. 18, supl. 1. pp 6-9.
- Ramirez Heredia, R.; Soto Macetas R. (2018). Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de molle (*Schinus molle* L.) frente a cepas de *Escherichia coli* in vitro. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. Universidad Inca Garcilazo De La Vega. Lima, Perú. pp 68-86.
- Rivadeneira Cajas, D.; Álvarez Velásco, P. (2015). Potencial biosida del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) frente al gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans*, principal agente cariogénico. Estudio in vitro. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. pp 79.
- Rodríguez, C.; Zarate, A.; Sánchez, L. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Revista NOVA* 15(27). Colombia. pp 119-129.
- Rodríguez, M. (2006). Lamiaceae endémicas del Perú. *Rev. Perú. biol.* Número especial 13(2): 339–355.
- Román, M.; Rivera, C.; Cardona, L.; Muñoz, L.; Gómez, D.; Carvalho, C.; Quinceno, J. (2016). Guía de Extracción por Fluidos Supercríticos: Fundamentos y Aplicaciones. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Rionegro, Antioquía. pp 8-10.

- Romero, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Médica Panamericana. (3a ed.). México. pp 673.
- Romero Márquez, M. (2004). Plantas aromáticas: Tratado de aromaterapia científica. Editorial Kier. (1a ed.). Argentina. pp 109.
- Rzedowski, J.; Calderón, G. (1999). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes – Anacardiaceae. Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 78.
- Sánchez Pérez, J. (2019). Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* – Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM. (Tesis de grado). Facultad de Medicina, Escuela profesional de Tecnología Médica. UNMSM. Lima, Perú. pp 39 - 60.
- Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). (2012). Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales Extraídos de las Plantas Medicinales Aromáticas. Bogotá, Colombia. pp 42-43
- Servicio Nacional de Áreas Protegidas por el Estado (SERNARP). (s.f.). Nuestra Flora, La Flora Peruana. Recuperado de <http://www.sernanp.gob.pe/nuestra-flora>.
- Shapiro, S.S., Francia, R.S. (1972). An approximate analysis of variance test for normality. Journal of the American Statistical Association.
- Slavkovska, V.; Zlatković, B.; Bräuchler, C.; Stojanović, D.; Tzakou, O. & Couladis, M. (2013). Variations of essential oil characteristics of *Clinopodium* sp. (Lamiaceae) depending on phenological stage. *Bot Serb*, 37(2), 97-104.
- Tapia Manrique, E. (2018). Composición química, actividad antioxidante y anti *Candida albicans* del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts

“panizara”. (Tesis de Doctorado). Escuela de Post Grado, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú. pp 39.

- Velasco-Negueruela, A. & Alonso, M. J. P. (1983). Estudio químico del aceite esencial de diversas "Saturejae" ibéricas. In Anales Del Jardín Botánico de Madrid. 40(1), 107-118.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (2010). Manual de Prácticas de Química Orgánica I. Facultad de Química. Recuperado de [http://organica1.org/1311/1311\\_10.pdf](http://organica1.org/1311/1311_10.pdf).
- Velasco-Negueruela, A. & Alonso, M.J.P. (1983). Estudio químico del aceite esencial de diversas “Saturejae” ibéricas. In Anales del Jardín Botánico de Madrid. 40(1), 107-118.
- Yarupaitán, G.; Albán, J. (2003). Flora silvestre de los Andes centrales del Perú: un estudio en la zona de Quilcas, Junín. Revista peruana de biología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. 10(2): 155 - 162
- Wankat, P.C. (1988). Equilibrium Staged Separations. Separations in Chemical yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. Food Chemistry. 99:19-23.
- Zapata Miranda, E. (2017). Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica “in vitro” del extracto hidro-alcohólico de *Cestrum hediondinum* Dun. “Hierba Santa” en bacterias patógenas gram negativas, gram positivas y hongos. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela profesional de Biología. Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú. pp 60 - 104.

## **VIII. ANEXOS**

# Anexo 1: Certificados de Identificación de las muestras vegetales en estudio en el Herbario MOL “Augusto Weberbauer” de la Universidad Nacional Agraria La Molina



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento Académico de Biología



La Molina, 27 de noviembre de 2019

## CONSTANCIA 029-2019-IJM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra remitida por la Srta. Roxana Betsabé Vega Abad proveniente del Área de Conservación Regional Huaytapallana, provincia de Huancayo, departamento de Junín, a 4720 m s. n. m. (coordenadas 11°55'34.0"S, 75°04'10.1"W), correspondiente al proyecto de investigación «ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*», ha sido estudiada en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal espécimen permiten concluir que corresponde a la especie *Senecio calvus* Cuatrec. de la familia Asteraceae.

La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente:

Clado	:	angiospermas (≡ Angiospermae)
Clado	:	mesangiospermas (≡ Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (≡ Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunnéridas (≡ Gunneridae)
Clado	:	pentapétalas (≡ Pentapetalae)
Clado	:	superastéridas
Clado	:	astéridas
Clado	:	euastéridas (≡ genciánidas)
Clado	:	campanúlidas
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	<i>Senecio</i> L.
Especie	:	<i>Senecio calvus</i> Cuatrec.

Atentamente,

**Mercedes Flores Pimentel**  
Jefe  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



**Arturo Grandá Paucar**  
Investigador Adjunto  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento Académico de Biología



La Molina, 27 de noviembre de 2019

CONSTANCIA  
030-2019-IIM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra remitida por la Srta. Roxana Betsabé Vega Abad proveniente del distrito de Cieneguilla, provincia de Lima, departamento de Lima (coordenadas 12°05'53.9"S, 76°47'04.6"W) correspondiente al proyecto de investigación «ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*», ha sido estudiada en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal espécimen permiten concluir que corresponde a la especie *Schinus molle* L. de la familia Anacardiaceae.

La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente:

Clado	:	angiospermas (≡ Angiospermae)
Clado	:	mcsangiospermas (≡ Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (≡ Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunnéridas (≡ Gunneridae)
Clado	:	pentapétalas (≡ Pentapetales)
Clado	:	superrósidas
Clado	:	rósidas
Clado	:	eurrósidas
Clado	:	málvidas
Orden	:	Sapindales
Familia	:	Anacardiaceae
Género	:	<i>Schinus</i> L.
Especie	:	<i>Schinus molle</i> L.

Atentamente,

Mercedes Flores Pimentel  
Jefe  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



Arturo Granda Paucar  
Investigador Adjunto  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento Académico de Biología



La Molina, 27 de noviembre de 2019

CONSTANCIA  
031-2019-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra remitida por la Srta. Roxana Betsabé Vega Abad proveniente del distrito de Yungay, provincia de Yungay, departamento de Áncash, a 2500 m s. n. m. (coordenadas 9°07'56.6"S, 77°44'45.8"W), correspondiente al proyecto de investigación «ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A *Streptococcus pneumoniae*», ha sido estudiada en el Herbario del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en tal espécimen permiten concluir que corresponde a la especie *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts de la familia Lamiaceae. La clasificación taxonómica de la especie según el sistema APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, 2016) es la siguiente:

Clado	:	angiospermas (≡ Angiospermae)
Clado	:	mesangiospermas (≡ Mesangiospermae)
Clado	:	eudicotiledóneas (≡ Eudicotyledoneae)
Clado	:	gunnéridas (≡ Gunneridae)
Clado	:	pentapétalas (≡ Pentapetales)
Clado	:	superastéridas
Clado	:	astéridas
Clado	:	euastéridas (≡ genciánidas)
Clado	:	lámidas
Orden	:	Lamiales
Familia	:	Lamiaceae
Género	:	<i>Clinopodium</i> L.
Especie	:	<i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts

Atentamente,


Mercedes Flores Pimentel  
Jefe  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



Arturo Grandá Paudar  
Investigador Adjunto  
Herbario del Dpto. de Biología (MOL)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina

**Anexo 2: Resolución de aprobación y consentimiento del desarrollo de proyecto de tesis en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del Instituto Nacional de Salud – Jesus Maria**

SECTOR SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



Nº. 039-2019-OGITT/INS

**RESOLUCIÓN DIRECTORAL**

Lima, **18 ENE. 2019**

Visto, el expediente N° 00019250-18 y Nota Informativa N° 003-2019-OEI-OGITT-OPE/INS, de la Oficina Ejecutiva de Investigación, de la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica del Instituto Nacional de Salud, por el cual solicita aprobación de proyecto de investigación;

**CONSIDERANDO:**

Que, el Manual de Organización y Funciones aprobado por RJ N° 267-2003-J-OPD/INS establece que la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica (OGITT), órgano asesor de la Alta Dirección, tiene como función el promover el desarrollo y ejecución de la investigación y la tecnología apropiada en salud y de su transferencia en el sector salud a la comunidad;


Que, según se desprende de la Nota Informativa del visto, conteniendo la opinión favorable del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud (INS), se ha emitido conformidad al proyecto de tesis de Investigación titulado: **"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE", versión 1, Código OT-023-18;**

Que, de conformidad con las atribuciones establecidas en el punto 6.2.2.4 de la Directiva N° 045-INS/OGITT-V.01 "Directiva para la Gestión de Proyectos de Investigación en Salud en el Instituto Nacional de Salud" aprobada por Resolución Jefatural N° 133-2016-J-OPE/INS; así como lo establecido en el punto 5.3.8 en concordancia con el punto 5.3.6 del Procedimiento Técnico Planificación de Proyectos de Investigación PRT-INS-003 Ed.1, aprobado por Resolución Jefatural N° 195-2016-J-OPE/INS,

Con el visto bueno del Director Ejecutivo de la Oficina Ejecutiva de Investigación de la OGITT del INS;

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.- APROBAR** el proyecto de tesis de Investigación **"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE", versión 1, de fecha 31.12.2018, Código: OT-0023-18;** detallado en el anexo No.1 adjunto, que forma parte integrante de la presente Resolución por los fundamentos expuestos en la parte considerativa de la presente Resolución.

  
P. M. HERNÁNDEZ S.



Artículo 2°.- REGISTRAR el proyecto de tesis de Investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE", versión 1, de fecha 31.12.2018, Código: OT-0023-18; en la base de datos de la Oficina de Investigación de la OGITT.

Artículo 3°.- El Director General del Centro Nacional de Salud Pública es responsable del seguimiento y evaluación del desarrollo del proyecto aprobado en la presente Resolución.

Artículo 4°.- NOTIFICAR la presente resolución al Centro Nacional de Salud Pública, al Comité Institucional de Ética en Investigación, así como a los órganos y oficinas involucradas en el presente proceso de aprobación.

Regístrese y comuníquese,



Med. NORA ESPIRITU SALAZAR  
Directora General  
Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

SECTOR SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



Nº. 039-2019-06/IT/INS

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

ANEXO Nº 1

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN APROBADO METODOLÓGICA, TÉCNICA Y ÉTICAMENTE

Nº	Código OGITT	AÑO	PROCEDENCIA	TITULO DE LA INVESTIGACIÓN	INVESTIGADORES	PRESUPUESTO SOLICITADO
01	OT-0023-18	2018	INS CNSP	"ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DIFERENTES DE TRES ESPECIES VEGETALES MEDICINALES PERUANAS, FRENTE A STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE", versión 1.	Investigador principal: Roxana Betsabé Vega Abad	S/. 0.00 (INS)



## Anexo 3: Certificado de análisis de la cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619



### CERTIFICATE OF ANALYSIS

ATCC® Number: 49619™  
Lot Number: 70002256

Organism: *Streptococcus pneumoniae* 262  
Product Format: Bacterial cells suspended in an appropriate cryoprotectant  
Expiration Date: Not applicable  
Storage Conditions: 2 °C to 8 °C for freeze-dried cultures; - 80 °C or colder for frozen cultures

Note: Do not store frozen vials in freezers with a defrost cycle, as this will expose the vials to increased temperatures.

Test / Method	Specification	Result
<b>Gram stain and cell morphology</b> (Visual observation method)	Gram stain (when applicable) and cell morphology are consistent with the organism being tested.	Gram positive, non-motile, cocci in singles, pairs, clusters and chains with lancelet shaped diplococci
<b>Colony description</b> (Visual observation method)	Colony description is consistent with the organism being tested.	Flat, opaque, smooth, entire, glistening
<b>Purity</b> (Visual observation method)	Sample material is inoculated onto non-selective media. Cultures are examined macroscopically and microscopically after incubation. Cultures show no evidence of aberrant growth.	No evidence of aberrant growth
<b>Viability (confluency plate)</b> (Visual observation method)	Sample material is viable.	Discrete colonies (300+) on dilution plate, >10 <sup>4</sup> cfu/vial
<b>Phenotypic testing</b>	Sample material is evaluated with a defined battery of phenotypic tests including evaluation by bioMérieux VITEK® 2 Compact. Results are consistent with the organism being tested.	95% identification to <i>Streptococcus pneumoniae</i> using Vitek 2 Compact
<b>Identification by MALDI-TOF technology</b>	Sample material is evaluated by MALDI-TOF MS testing. Identification is consistent with the organism being tested.	Using the <i>in vitro</i> diagnostic (IVD) database, identification is consistent with the organism being tested
<b>Genotypic testing</b>	Sample material is evaluated by 16S ribosomal gene sequencing. Results are consistent with the organism being tested.	Identification is consistent with the organism being tested
<b>Antibiotic susceptibility testing</b> (E-test, microbroth dilution, Kirby Bauer, disk diffusion, bioMérieux VITEK® 2 AST card, or other)	Sample material is evaluated for antibiotic susceptibility and interpreted following CLSI guidelines (when applicable). Results are consistent with the organism being tested.	Consistent with the organism being tested

**Robbin L Smith**

Digitally signed by Robbin L Smith  
DN: cn=Robbin L Smith, o=ATCC, ou=Quality Assurance Specialist, email=robbin@atcc.org, c=US  
Date: 2017.09.20 13:29:35 -0400

Quality Assurance Specialist; Quality Assurance

ATCC  
10801 University Boulevard  
Manassas, VA 20110-2209 USA  
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
E-mail: tech@atcc.org  
or contact your local distributor

- Page 1 of 2 -

Template Doc ID: 31194

Template Revision: 4

Template Effective Date: 12/31/2014



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**ATCC® Number:** 49619™  
**Lot Number:** 70002256

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate is pure and has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief. This certificate does not extend to the growth and/or passage of any living organism or cell line beyond what is supplied within the container received from ATCC.

This product is intended to be used for laboratory research use only. It is not intended for use in humans, animals, or for diagnostics. Appropriate Biosafety Level (BSL) practices should always be used with this material. Refer to the Product Information Sheet for instructions on the correct use of this product.

ATCC products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services, or to manufacture commercial products without prior written agreement from ATCC.

© 2014 American Type Culture Collection. The ATCC trademark and trade name are owned by the American Type Culture Collection.

**ATCC**  
10801 University Boulevard  
Manassas, VA 20110-2209 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800-638-6597 or 703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
E-mail: [tech@atcc.org](mailto:tech@atcc.org)  
or contact your local distributor

- Page 2 of 2 -

Template Doc ID: 31194

Template Revision: 4

Template Effective Date: 12/31/2014