

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS**  
**FACULTAD DE INGENIERIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Govaerts "RUNTUWAYRA", FRENTE  
A LA SUPERVIVENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25922 Y  
*Salmonella typhi*.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

**AUTOR:** Bach. SOTELO CAÑARI, María del Carmen.

**ASESOR:** Blga. M.Sc. TORRES GARCÍA, Luz Azucena.

**ANDAHUAYLAS – PERÚ**

**2014**

**TESIS FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA UNAJMA**

*A **Dios**, por regalarme el milagro de la vida y ser mi maestro ante cualquier circunstancia.*

*A mi querida familia: **Wilbert, María Teresa** y **Gabriela** por su amor, esfuerzo y apoyarme en cada momento de mi vida.*

*A mi tío **Dr. Oscar Paredes Pando** quien con su sapiencia me brindó su apoyo incondicional, paciencia, y sobre todo su confianza.*

*A las personas que me estiman por su amistad, su paciencia, su confianza y apoyo incondicional:  
Gracias por creer en mí.*

## PRESENTACIÓN

Desde épocas muy remotas el hombre siempre ha buscado y encontrado remedios para sus enfermedades en la naturaleza, especialmente en el reino vegetal, constituyendo hoy en día el uso de los recursos florísticos una gran alternativa para preservar y recuperar la salud sobre todo en comunidades aisladas geográficamente o culturalmente, constituyendo motivos suficientes para profundizar el conocimiento de nuestras especies vegetales medicinales. El presente trabajo de investigación se basa en la Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** "Runtuwayra", frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***; el cual fue desarrollado en la Universidad Nacional José María Arguedas, en la Facultad de Ingeniería, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.

Este trabajo de investigación contiene información científica producto de datos obtenidos del desarrollo de la tesis sobre la actividad antibacteriana de una hierba nativa "Runtuwayra", recurso que constituye el primer registro sur peruano y que actúa inhibiendo el desarrollo sobre las principales bacterias patógenas causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. La culminación de esta tesis es suma importancia para corroborar, aplicar y desarrollar los conocimientos teóricos y prácticos adquiridos durante la formación profesional, aportando criterios en los procesos tecnológicos desarrollados. Toda la información científica que se brinda a través de la tesis, contribuirá al mejor conocimiento de nuestra realidad y esperamos que estimule a futuros trabajos de investigación a fin de ir resolviendo gradualmente la validación científica de estos importantes recursos florísticos de la zona sur peruana.

## AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional José María Arguedas quien me acogió formándome en sus aulas de la EPIA, y al apoyo brindado por medio de su personal de laboratorio, durante la ejecución del trabajo de investigación.
- Al “Instituto Nacional de Salud” representado por el *Dr. César Cabezas Sánchez*, quienes proporcionaron cepas puras de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***.
- A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, que a través del Herbario Vargas (CUZ); y de sus laboratorios, apoyaron en el desarrollo de la presente investigación.
- A mi asesora, *M.Sc. Luz Azucena Torres García*, docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por sus conocimientos, apoyo, gran colaboración y sobre todo su amistad; sin los cuales no se hubiera podido realizar la presente investigación.
- Al *M.Sc. David Choque*, docente de la Facultad de Ingeniería de la UNAJMA, por su colaboración, orientación en la elaboración de la parte metodológica y estadística.
- A la Dirección de Investigación, Creación Intelectual y Artística de la Universidad Nacional José María Arguedas, por su apoyo financiero para la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
PRESENTACIÓN	ii
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE GENERAL	iv
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii

### CAPITULO I

INTRODUCCIÓN	1
--------------	---

### CAPITULO II

#### MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes generales de la especie <i>Clinopodium</i> <i>weberbaueri</i> (runtuwayra)	5
A. Descripción botánica	5
B. Estudio taxonómico de la planta de runtuwayra	7
C. Biodiversidad del género <i>Satureja</i>	7
D. Distribución geográfica	8
E. Antecedentes etnobotánicas	8
2.2. <i>Escherichia coli</i>	9

2.2.1. Grupos virulentos identificados	10
2.2.1.1. <i>E. coli</i> enteroagregante (EAggEC)	11
2.2.1.2. <i>E. coli</i> enterohemorrágico (EHEC)	11
<i>E. coli</i> O157H7	12
2.2.1.3. <i>E. coli</i> enteroinvasivo (EIEC)	17
2.2.1.4. <i>E. coli</i> enteropatógeno (EPEC)	18
2.2.1.5. <i>E. coli</i> enterotoxigénico (ETEC)	19
2.2.2. Patogenia	19
• Virulencia	20
2.3. <i>Salmonella typhi</i>	20
2.3.1. Epidemiología	21
2.3.2. Patogenia	23
2.4. Principio activo de las plantas medicinales	23
2.5. Aceites esenciales (AE)	24
2.6. Actividad antibacteriana	25
2.7. Aceite esencial como conservante	28
2.7.1. Problemática del uso de compuestos antimicrobianos y antioxidantes naturales	28
2.7.2. Optimización del uso de compuestos naturales como antimicrobianos	29
• Encapsulación	29
• Películas comestibles	30

OBJETIVOS	31
-----------	----

### **CAPITULO III**

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1. Población	32
3.2. Muestra	32
3.2.1. Unidad de análisis	32
3.3. Lugar de ejecución	33
3.4. Materiales, equipos y reactivos	33
3.5. Métodos	36
3.5.1. Obtención de la muestra vegetal	37
3.5.2. Procesamiento de la muestra	37
3.5.3. Obtención del aceite esencial (AE)	38
3.5.4. Determinación del rendimiento del aceite esencial (AE)	40
3.5.5. Determinación de las constantes fisicoquímicas del aceite esencial (AE)	41
3.5.6. Análisis fitoquímico del aceite esencial (AE)	43
3.5.7. Caracterización de los componentes químicos del aceite esencial (AE)	43
3.5.8. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial (AE)	44
3.5.9. Análisis estadísticos de los resultados	47

### **CAPITULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

4.1. Extracción del aceite esencial (AE)	50
4.2. Características organolépticas del AE	50
4.3. Características fisicoquímicas del AE	51

4.4.	Caracterización fitoquímica del AE	52
4.5.	Determinación de los componentes químicos del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> “runtuwayra”	53
4.6.	Método de agar en difusión	56
A.	Primer ensayo	56
B.	Segundo ensayo	59
4.7.	Determinación antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> “runtuwayra” frente a <b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 25922 y <b><i>Salmonella typhi</i></b>	61
4.7.1.	Evaluación del diámetro de halo	61
a.	Diámetro de halo para <b><i>E. Coli</i></b> ATCC 25922	61
b.	Diámetro de halo para <b><i>S typhi</i></b>	67
4.7.2.	Determinación de los valores óptimos antibacterianos del porcentaje de dilución del aceite esencial de “runtuwayra”, mediante la medición de los halos de inhibición.	73
	<b>CONCLUSIONES</b>	79
	<b>RECOMENDACIONES</b>	80
	<b>REEFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	81
	<b>ANEXOS</b>	90



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
01	Principales constantes fisicoquímicas del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> .	51
02	Principales características fitoquímicas del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> .	52
03	Composición química del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> "Runtuwayra" determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM).	55
04	Diámetro de halo para crecimiento de <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922 cultivados en los diferentes bactericidas.	62
05	ANOVA de un factor para el diámetro de halo de <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922 en los tratamientos.	63
06	Valore de <i>p-value</i> en la comparación de tratamientos bactericidas para el <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922 a través del test Tukey.	64
07	Diámetro de halo para crecimiento de <b><i>S. typhi</i></b> cultivado en los diferentes bactericidas.	67
08	ANOVA de un factor para el diámetro de halo de <b><i>S. typhi</i></b> en los tratamientos.	69
09	Valore de <i>p-value</i> en la comparación de tratamientos bactericidas para el <b><i>S. typhi</i></b> a través del test Tukey.	70
10	Modelos matemáticos y sus coeficientes para el AE	74
11	Valores óptimos de AE como agente bactericida del <b><i>S. typhi</i></b> y <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922.	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
01	Talluelos de Runtuwayra.	06
02	Detalles de la flor y planta de Runtuwayra.	06
03	Mapa de distribución de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> - Runtuwayra.	08
04	<b><i>Escherichia coli</i></b> .	10
05	<b><i>Salmonella sp.</i></b>	22
06	Diagrama de preparación de la muestra para el estudio fisicoquímico y microbiológico.	39
07	Cromatograma de Gases del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> "Runtuwayra".	53
08	Placa Petri mostrando halos de inhibición del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> (Mansf.) Govaerts "runtuwayra", con cultivos de <b><i>Salmonella typhi</i></b> en agar de Müller Hinton.	57
09	Placa Petri mostrando halos de inhibición del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> (Mansf.) Govaerts "runtuwayra", con cultivos de <b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 25922 en agar de Müller Hinton.	57
10	Placa Petri mostrando halos de inhibición del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> (Mansf.) Govaerts "runtuwayra", con cultivos de <b><i>Salmonella typhi</i></b> en agar de Müller Hinton.	59
11	Placa Petri mostrando halos de inhibición del aceite esencial de <b><i>Clinopodium weberbaueri</i></b> (Mansf.) Govaerts "runtuwayra", con cultivos de <b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 25922 en agar de Müller Hinton.	60
12	Diagrama de medias para el diámetro de halo de <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922 para los diferentes tratamientos – primer ensayo.	65
13	Diagrama de medias para el diámetro de halo de <b><i>E. coli</i></b> ATCC 25922 para los diferentes tratamientos – segundo ensayo.	66

14	Diagrama de medias para el diámetro de halo de <b>S. typhi</b> para los diferentes tratamientos – primer ensayo.	72
15	Diagrama de medias para el diámetro de halo de <b>S. typhi</b> para los diferentes tratamientos – segundo ensayo.	72
16	Curva experimental y de los modelos propuestos para el diámetro de halo del <b>S. typhi</b> .	75
17	Curva experimental y de los modelos propuestos para el diámetro de halo del <b>E. coli</b> ATCC 25922.	76
18	Reconocimiento de la planta de <b>Clinopodium weberbaueri</b> “runtuwayra” en los cerros provenientes del Centro Poblado Menor de Manchaybamba (3450 m.s.n.m.).	91
19	Talluelo de <b>Clinopodium weberbaueri</b> “runtuwayra”.	91
20	Separando la parte aérea de la planta (talluelos y hojas) de <b>Clinopodium weberbaueri</b> “runtuwayra”.	92
21	Equipo extractor de aceites esenciales, Laboratorio de Procesos – UNAJMA.	92
22	Florentino conteniendo mezcla de aceite esencial de <b>Clinopodium weberbaueri</b> “runtuwayra”, agua y impurezas.	93
23	Pesando el picnómetro (con aceite esencial deshidratado) en la balanza analítica; laboratorio de fitoquímica - UNSAAC.	93
24	Polarímetro conteniendo el tubo de contención con aceite esencial con alcohol a 96°; laboratorio de fitoquímica - UNSAAC.	94
25	Midiendo el pH con el pH-metro; laboratorio de fitoquímica - UNSAAC.	94
26	Midiendo el índice de acidez con solución de hidróxido de potasio al 0.1N; laboratorio de fitoquímica - UNSAAC.	95
27	Cromatógrafo de gases AGILENT 6890N – acoplado a un espectrómetro de masas; laboratorio de cromatografía - UNSAAC.	95

28	Estériles: agar Müller Hinton, agar Soya Tripticasa (TSA), agar Mac Conkey y agua destilada; laboratorio de biotecnología - UNAJMA.	96
29	Difusión del agar Müller Hinton en las placas petri; laboratorio de biotecnología - UNAJMA.	96
30	Actividad antibacteriana: placas petri sembradas con <b><i>Salmonella typhi</i></b> conteniendo papeles filtro con AE (100%, al 50% y al 25%), alcohol a 70° y bactrim (sulfametoxazol más trimetoprim); laboratorio de biotecnología - UNAJMA.	97
31	Actividad antibacteriana: placas petri sembradas con <b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b> conteniendo papeles filtro con AE (100%, al 50% y al 25%), alcohol a 70° y bactrim (sulfametoxazol más trimetoprim); laboratorio de biotecnología - UNAJMA.	97

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** “Runtuwayra”, frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi*** procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS). Se obtuvo el aceite esencial de las hojas y talluelos de la runtuwayra, por arrastre de vapor de agua, el aceite esencial puro se diluyó en alcohol etílico de 70° a 50% y 25%; y fueron comparadas con Sulfametoxazol más Trimetoprim como control (+) y alcohol etílico al 70°, como control (-); para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* mediante el método de Difusión en Agar con Discos. Lográndose un rendimiento (0.33%v/p), rotación óptica (+0.05 a -0), densidad (0.9355 g/ml), índice de acidez - Acido Oleico (0.1128), índice de refracción (1.4811), dobles enlaces - KMnO<sub>4</sub> (+++) e compuestos aromáticos – FeCl<sub>3</sub> al 1% (-) en el aceite esencial. El aceite esencial puro y al 50% tiene efecto antibacteriano frente a la ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi*** con un halo de inhibición de 86.96 %, mientras al 25% no, comparando con Sulfametoxazol más Trimetoprim a una concentración de 30 ug como control positivo, evidenciándose mayor sensibilidad en ***Salmonella typhi***.

**Palabras clave:** ***Clinopodium weberbaueri***, aceite esencial, actividad antibacteriana.

## ABSTRACT

The in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Clinopodium weberbaueri* "Runtuwayra" compared to the survival of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhi* from the National Institute of Health (INS) was to determine. The essential oil of the leaves and the runtuwayra seedstalks was obtained by steam distillation of water, pure essential oil was diluted in 70° ethyl alcohol at 50% and 25%; were compared and Trimethoprim more Sulfamethoxazole as control (+) and ethyl alcohol 70°, and (-) control; for in vitro susceptibility testing by the method of diffusion in agar with discs. Achieving yield (0.33% v/p), optical rotation (at -0 +0.05), density (0.9355 g / ml), acid - Oleic acid (0.1128), refractive index (1.4811), double bonds - KMnO<sub>4</sub> (+++) and aromatic compounds - 1% FeCl<sub>3</sub> (-) in the essential oil. The pure essential oil and 50% have antibacterial effect against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhi* with an inhibition of 86.96%, while 25% did not, compared with Sulfamethoxazole more Trimethoprim at a concentration of 30 ug as a positive control, showing greater sensitivity in *Salmonella typhi*.

**Keywords:** *Clinopodium weberbaueri*, essential oil, antibacterial activity.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

El Perú es conocido como el tercer país megadiverso del mundo, algunos científicos lo catalogan como el segundo o primero, porque posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de moléculas bioactivas. En cuanto a la diversidad vegetal llega, aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones nos sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, validándolos científica y tecnológicamente (Carhuapoma, 2006).

Las plantas han sido capaces de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios, antes que el hombre jugara un papel activo en su protección, mediante sustancias químicas con actividad antimicrobiana (Dixon, 2001). En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de compuestos orgánicos biológicamente activos, extraídos de especies de plantas que presentan la capacidad de eliminar a microorganismos patógenos por sí mismas, esto debido principalmente a la resistencia, que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos (Daferera *et al.*, 2003). Es importante resaltar el estudio de sustancias de origen natural tales como extractos y aceites esenciales para evaluar su efecto antimicrobiano, antioxidante, antimicótico, fungicida, insecticida y plaguicida (Güisa & Rincón, 2007). Los aceites esenciales son en su mayoría sustancias terpénicas y fenilpropánicas, que se almacenan en los tejidos secretores de vegetales aromáticos. Una especie aromática puede contener más de 150 componentes como parte de su aceite esencial (Carhuapoma, 2007).

Los mecanismos de acción de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos, los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana, a través de los compuestos lipofílicos; se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN, mientras que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la exclusión competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999). Otro estudio indican que los componentes de los aceites esenciales interfieren con las funciones de permeabilidad de la membrana celular (Lambert *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales también llamados compuestos volátiles, son líquidos de consistencia aceitosa, aromáticos, obtenidos de material vegetal (flores, los brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces). Pueden ser obtenidos por varios métodos, pero el más utilizado en la producción comercial es por destilación con vapor. Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004); Kordali *et al.*, 2005).

La ***Clinopodium weberbaueri*** “runtuwayra”, es una planta nativa de la serranía de los andes peruanos; que reporta virtudes terapéuticas en enfermedades de las vías respiratorias, digestiva, dolores de cabeza, cólicos menstruales, entre otras (Agencia de Cooperación Técnica del Perú, 1999; Palacios, 1997).



Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) como: cólera, fiebre tifoidea, gastroenterocolitis, bacteriemia; son de origen microbiano, siendo unos de los problemas con mayor impacto en el mundo. Debido a que estas enfermedades se adquieren por el consumo de alimentos y/o contaminados que representan un gran riesgo para la población en general. Es importante realizar el estudio de microorganismos patógenos siendo los principales responsables de dichas enfermedades y aparición de graves intoxicaciones alimentarias (Thompson, 1981).

La ***Escherichia coli*** es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por ***E. coli*** se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte. La ***Escherichia coli***, se adhiere a las mucosidades del intestino grueso, el periodo de incubación es de 3 a 9 días. La enfermedad puede llevar una pérdida permanente de la función renal debido al desarrollo en las personas del Síndrome Hemolítico Urémico (Contreras, 1983) y (Tórtora, 2007). Mientras que la ***Salmonella typhi***, es una bacteria móvil, que ocasiona la fiebre tifoidea; esta bacteria produce sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), fermenta glucosa por poseer una enzima especializada, pero no fermenta la lactosa, no produce ureasa y puede sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno (Tórtora, 2007). El período de incubación para ***S. typhi*** abarca de una semana a un mes, siendo principalmente de dos semanas, a partir de la ingesta de la bacteria proveniente de alimentos o agua

contaminada. No siempre ocurre la diarrea, pero generalmente hay ulceración. **S. typhi** se multiplica en el epitelio de la submucosa, después de lo cual entra el torrente circulatorio y se disemina por el cuerpo. La multiplicación ocurre otra vez en el bazo y en el hígado, para que después la bacteria sea liberada en grandes cantidades al torrente sanguíneo. Esta septicemia o invasión generalizada puede confirmarse por el cultivo de la bacteria de la sangre, lo cual refleja una bacteriemia. Este estadio de la infección, que puede durar 2 a 3 semanas, se caracteriza por una tos seca, fiebre alta, e intenso dolor de cabeza. La fiebre puede ser cíclica, es decir, la temperatura puede incrementarse por las tardes, acompañada de escalofríos, convulsiones y delirio. La Organización Mundial de la Salud expresa que, para prevenir las infecciones de origen alimentario, hay que aplicar medidas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria, desde la producción agropecuaria en la granja hasta la elaboración, fabricación y preparación de los alimentos en las cocinas de establecimientos comerciales y hogares (FAO/WHO, 2008).

Por tal razón, se realizó el presente trabajo planteándose el siguiente objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Govaerts “runtuwayra” al 100%, 50% y 25%, frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.3. Antecedentes generales de la especie *Clinopodium weberbaueri* (runtuwayra)

##### A. Descripción botánica

En las figuras 01 y 02, se observa la planta de porte arbustiva estrictamente erectos, ramificados, de ramas delgadas diminutamente hirtellas o puberulentas, no grisáceas; hojas oblongo – elípticas, revolutas, casi igualmente reducidas en ambos extremos, subagudas, 7 – 12 mm de largo, 1 – 3 mm de ancho, haz verde medio brillante; envés blanquecino; flor bilabiada; pedicelos de 1 – 3 en las axilas, alrededor de 1 mm de largo; corola rozada y fruto tetraquenio (Galiano - UNSAAC, 2014).

**Figura 01.** Talluelos de runtuwayra.



**Fuente:** Galiano - UNSAAC, 2014.

**Figura 02.** Detalles de la flor y planta de runtuwayra.



**Fuente:** Galiano - UNSAAC, 2014.

## B. Estudio taxonómico de la planta de runtuwayra

El material vegetal fue identificado científicamente el 07 de enero de 2014, según las exigencias del Herbario Vargas (CUZ) de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco - UNSAAC, en donde fue clasificado por el sistema APG III (Angiosperm Phylogenetic Group), la ubicación taxonómica corresponde a:

CLASE: Equisetopsida C. Agardh.

SUBCLASE: Magnoliidae Novák ex Takht.

SUPERORDEN: Asteraceae Takht.

ORDEN: Lamiales Bromhead.

FAMILIA: Lamiaceae Martinov.

TRIBU: Mentheae.

GENERO: *Clinopodium* L.

ESPECIE: ***Clinopodium weberbaueri* (Mansf.)**

**Govaerts**

NOMBRE COMÚN: Runtuwayra

## C. Biodiversidad del género *Satureja*

El género ***Satureja*** actualmente siendo ***Clinopodium*** cuenta con unas 200 especies en el mundo, estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. La ***Clinopodium weberbaueri*** es una especie endémica de las regiones altoandinas del Perú.

#### D. Distribución geográfica

La *Clinopodium weberbaueri*, se desarrolla en Bosque tropical Estacionalmente Seco (BTES) de valles interandinos, matorral seco, de piedra arenisca, seco, a modo de pendientes pronunciadas de roca caliza; entre altitudes de 1500 – 3600 m como: Amazonas, Ancash, Cajamarca, La Libertad y Apurímac en la **provincia de Andahuaylas**; constituyendo el **primer registro nuevo para la flora sur peruana** (Figura 03).

**Figura 03.** Mapa de distribución de *Clinopodium weberbaueri* - runtuwayra.



**Fuente:** Elaboración propia, 2013.

#### E. Antecedentes etnobotánicas

Según informaciones es usada para resolver problemas gastrointestinales, respiratorios, dolores de cabeza, cólicos menstruales, para ahuyentar las pulgas y para el susto (Kancha, 1995). Es digestivo, flatulencia, también es

usado como analgésico usando las hojas en caso de dolores musculares y si se toma en elevadas concentraciones puede producir aborto.

#### 2.4. ***Escherichia coli***

La ***Escherichia coli***, bacteria en forma de bastón (bacilo) Gram negativo de la familia ***Enterobacteriaceae*** (Carrillo, 1984). La mayoría de las ***E. coli*** son comensales normales que se encuentran en el tracto digestivo. Las cepas patógenas de este organismo se distinguen de la flora normal por poseer factores de virulencia, como exotoxinas. Los factores de virulencia específicos pueden utilizarse, junto al tipo de enfermedad, para separar dichos organismos en patotipos (Peter, 1995). La bacteria ***Escherichia coli*** si no adquiere elementos genéticos virulentos, actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes (CDC, 2014) (Figura 04).

#### **Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*.**

REINO: Bacteria.

FILO: Proteobacteria.

CLASE: Gammaproteobacteria.

ORDEN: Enterobacteriales.

FAMILIA: Enterobacteriaceae.

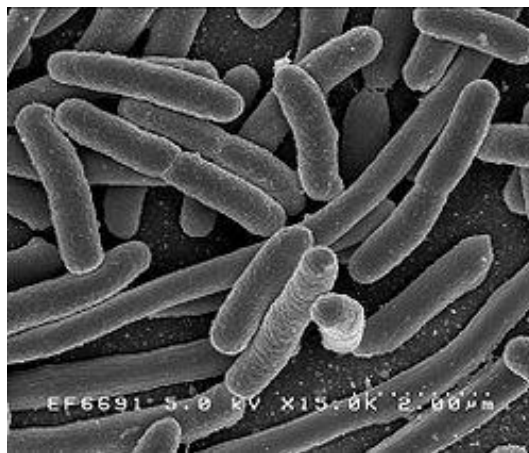
GÉNERO: *Escherichia*.

ESPECIE: ***Escherichia coli***.

**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention, 2014.

La ***Escherichia coli*** ATCC 25922, es una bacteria que se transmite por alimentos contaminados, asociados a la carne bovina cruda o molida (hamburguesas), leche cruda, lechuga, jugos de manzana y todo alimento que se haya contaminado con materia fecal (Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2014).

**Figura 04. *Escherichia coli*.**



**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention, 2014.

### 2.7.3. Grupos virulentos de ***Escherichia coli***

La clasificación de los grupos virulentos de ***Escherichia coli*** se basa en los síndromes, características de las enfermedades, efecto en determinados cultivos celulares y en los grupos serológicos; se han identificado cinco grupos virulentos de ***E. coli*** que son: ***E. coli*** enteroagregante (EAggEC), ***E. coli*** enterohemorrágico (EHEC), ***E. coli*** enteroinvasivo (EIEC), ***E. coli*** enteropatógeno (EPEC) y ***E. coli*** enterotoxigénico (ETEC).



#### 2.7.3.1. ***E. coli* enteroagregante (EAggEC)**

Este grupo (también denominado enteroadherente) está relacionado con el EPEC, pero la adherencia agregante que muestran estas cepas es única. Las cepas muestran una adherencia “en forma de ladrillos apilados” frente a las células HEp-2, y llevan un plásmido de 60 MDa que es necesario para la formación de fimbrias que son responsables de la expresión de la agregación, así como de una proteína de la membrana externa (OMP). La característica clínica diferencial de las cepas de EAggEC es una diarrea persistente que dura más de 14 días, especialmente en niños. Estas cepas no son la causa principal de la diarrea del viajero.

#### 2.7.3.2. ***E. coli* enterohemorrágico (EHEC)**

Estas cepas tienen tanto características similares como diferentes de las cepas EPEC. Son similares a las EPEC porque poseen el gen cromosómico *eaeA* (o uno similar) y porque producen lesiones de unión-borrado. A diferencia de las EPEC, las cepas EHEC sólo afectan al intestino grueso (en modelos con cerdo lactante) y producen grandes cantidades de la toxina similar a la Shiga. Las EHEC producen un plásmido de 60 MDa que codifica fimbrias que participan en la unión a las células de los cultivos celulares, y no invaden las líneas celulares HEp-2 o INT407, aunque algunas cepas tienen la capacidad para invadir algunas líneas de células de

epitelio humano. Algunas cepas EHEC producen fimbrias rizadas que facilitan la unión de las células a superficies.

Las *E. coli* enterohemorrágicas, son *Escherichia coli* productoras de verocitotoxina (ECVT) que poseen factores de virulencia adicionales, lo que les proporciona la capacidad para provocar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en los humanos. Una característica fundamental que se encuentra en la ECEH, pero que no es exclusiva de estos organismos, es la capacidad para causar lesiones de adherencia/destrucción (A/E) en el epitelio intestinal humano. Las lesiones de A/E se caracterizan por una adhesión bacteriana estrecha, con la membrana celular epitelial y la destrucción de los microvellosidades en el lugar de adherencia. Algunos de los genes que están involucrados en la producción de las lesiones de A/E se pueden utilizar, junto con la presencia de verocitotoxina, para ayudar en identificar la ECEH (The Center Food Security and Public Health 2014).

#### ***E. coli* O:157,H:7**

Esta bacteria Gram negativa tiene como hábitat natural el tubo digestivo del hombre y de los animales. Poco resistente en el medio ambiente, la encontramos principalmente en la carne y en los productos de origen animal, más raramente en las verduras. En general, no está presente en cantidad suficiente en las materias primas; para producir intoxicaciones es necesario que se

multiplique (Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2104).

Las *E. coli* están serotipadas según los antígenos O (lipopolisacáridos somáticos), H (flagelares) y K (capsulares). Los serotipos que se conocen por contener ECEH incluyen a *E. coli* O157:H7, el organismo no móvil *E. coli* O157: H, y los miembros de otros serogrupos, en particular O26, O103, O111 y O145 pero también O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128 y otros. La *E. coli* O157: H está estrechamente relacionada con la *E. coli* O157:H7, pero no es simplemente una versión inmóvil de este organismo; también posee una combinación distintiva de rasgos fenotípicos y de virulencia. El serotipeado, no es suficiente para la identificación de un organismo como una ECEH; también deben estar presentes factores de virulencia característicos de dichos organismos. Las cepas de *E. coli* O157:H7 son relativamente homogéneas, y casi todos estos organismos llevan factores de virulencia asociados con colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico. Los miembros de otros serotipos pueden ser más heterogéneos. Las infecciones por ECEH O157:H7 se producen en todo el mundo, se han informado infecciones en todos los continentes, excepto en la Antártida. Otras ECEH probablemente también estén ampliamente distribuidas. La importancia de algunos serotipos puede variar con la región geográfica (Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2104).

Las ECEH se transmiten por vía fecal–oral. Se pueden propagar entre animales por contacto directo o a través de bebederos, alimento compartido, lugares de pastaje contaminados u otras fuentes ambientales. Las aves y las moscas son vectores potenciales. Los huéspedes reservorios y la epidemiología pueden variar con el organismo. Los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, son los reservorios más importantes de la ECEH O157:H7. Los animales que no son reservorios habituales de la ECEH O157:H7 pueden funcionar como reservorios secundarios después del contacto con rumiantes. La ECEH O157:H7 se transmite principalmente a los humanos a través del consumo de alimentos y agua contaminados, o por el contacto con animales, heces y suelo contaminado. La transmisión de persona a persona puede contribuir con la propagación de la enfermedad durante los brotes; sin embargo, los humanos no parecen ser huésped de mantenimiento de este organismo. La mayoría de los casos en humanos han estado vinculados con el contacto directo o indirecto con el ganado bovino, pero algunos han estado asociados con otras especies, entre ellas ovejas, cabras (leche de cabra no pasteurizada), cerdos (salame de cerdo seco fermentado), ciervos (venado), caballos, conejos y aves. Se calcula que la dosis infectiva para los humanos es inferior a 100 organismos y tan poco como 10. Las epidemias de ECEH O157:H7 de origen alimentario generalmente son causadas por la ingesta de productos de origen animal mal cocidos o no pasteurizados, en especial, carne molida

pero también otras carnes y embutidos, y leche y queso no pasteurizados. Otros brotes han estado vinculados a la alfalfa o brotes de rábanos, lechuga, espinaca y otros vegetales contaminados, así como también sidra no pasteurizada. El agua de riego contaminada con heces es una fuente importante de ECEH O157:H7 en los vegetales. Este organismo se puede adherir a las plantas, y sobrevive bien en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. De acuerdo con las condiciones ambientales, pequeñas cantidades de bacterias que permanecen en los vegetales lavados pueden multiplicarse de manera significativa durante varios días. La ECEH O157:H7 puede internalizarse en los tejidos de algunas plantas, entre ellas la lechuga, donde es posible que no sea susceptible al lavado. Las moscas de la fruta puede transmitir este organismo a las plantas, donde se pueden multiplicar en los tejidos dañados. La ECEH O157:H7 puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios. Puede sobrevivir durante al menos 9 meses en carne molida almacenada a -20 °C. Tolera la acidez, y permanece infecciosa de semanas a meses en alimentos ácidos tales como la mayonesa, salchichas, sidra de manzana y queso cheddar a temperaturas de refrigeración. Además, resiste la desecación. Algunos casos en humanos se producen por exposición a la tierra o al agua contaminada. Las ECEH generalmente se eliminan por el tratamiento del agua municipal, pero estos organismos se pueden producir en los suministros de

agua privados tales como pozos. Nadar en aguas contaminadas, especialmente lagos y arroyos, ha sido asociado con algunas infecciones. La contaminación del suelo ha provocado brotes en áreas para acampar y otros lugares, especialmente cuando el ganado había pastado en el sitio. El tiempo de supervivencia informado de la ECEH O157:H7 en el suelo contaminado varía de un mes a más de 7 meses. Este organismo también puede sobrevivir durante 2 meses o más tiempo en algunas fuentes de agua dulce, especialmente en temperaturas frías, y puede permanecer viable durante 2 semanas en el agua de mar. Un estudio indicó que la ECEH O157:H7 se inactiva en el barro en 2 semanas, otro sugirió que puede sobrevivir hasta 3 meses.

La *E. coli* se puede destruir con numerosos desinfectantes, tales como hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, desinfectantes fenólicos o a base de yodo, glutaraldehído y formaldehído. Además, este organismo se puede inactivar por medio de calor húmedo (121 °C durante al menos 15 min.) o calor seco (160–170 °C] durante al menos 1 hora). Los alimentos pueden ser seguros, si se cocinan a una temperatura mínima de 71 °C. La radiación ionizante o el tratamiento químico con una solución de hipoclorito de sodio pueden reducir o eliminar las bacterias en los productos alimenticios.

El periodo de incubación de la enfermedad causada por la ECEH O157:H7 varía de 1 a 16 días. La mayoría de las infecciones se manifiestan después de 3 a 4 días; sin embargo, el periodo medio de incubación fue de 8, días en un brote ocurrido en una institución. Los humanos pueden infectarse de forma asintomática o pueden desarrollar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico. La mayoría de los casos sintomáticos comienzan con diarrea. Algunos casos se resuelven sin tratamiento en aproximadamente una semana, otros evolucionan a colitis hemorrágica en unos días, que se caracteriza por diarrea con sangre profusa y visible, acompañada de distensión abdominal y, en muchos casos, espasmos abdominales. Algunos pacientes presentan fiebre baja, en otros, la fiebre está ausente. Se pueden observar náuseas y vómitos, y es posible la deshidratación. Muchos casos de colitis hemorrágica son autolimitantes y se resuelven en aproximadamente una semana. La colitis grave puede provocar necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis en el colon (Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2104).

#### 2.7.3.3. ***E. coli* enteroinvasivo (EIEC)**

Estas cepas normalmente no producen enterotoxinas como las ETEC, pero pueden penetrar y multiplicarse en las células epiteliales del colon y después dispersarse a células adyacentes de

forma similar a las shigelas. Al igual que las shigelas, las EIEC poseen plásmidos enteroinvasivos de 140 MDa que son bastantes similares a los que se encuentran en *Shigella flexneri* y son esenciales para su capacidad invasora. Las cepas sin plásmido no son invasivas. Las cepas EIEC clásicas también son Sereny positivas, los miembros de este grupo tienen una predilección por el colon, y como consecuencia se producen diarreas voluminosas sanguinolentas o no. La disentería es poco frecuente y los miembros de la población más sensibles son los más jóvenes y los más mayores. El periodo de incubación está entre 2 y 48 horas con una media de 18 horas.

#### 2.7.3.4. *E. coli* enteropatógeno (EPEC)

Estas cepas generalmente no producen enterotoxinas, aunque pueden provocar diarrea. Muestran adherencia localizada a células de cultivos celulares y autoglutinan en medios de cultivo de tejidos. Poseen plásmidos de factor de adherencia que les permite adherirse a la mucosa intestinal. Después de colonizar la mucosa intestinal, se producen las lesiones de unión-borrado. El proceso comienza con el contacto inicial, y se cree que se lleva a cabo con la ayuda de un pilus que forma haces y que está codificado en un plásmido.



#### 2.7.3.5. ***E. coli* enterotoxigénico (ETEC)**

Estas cepas se unen al intestino delgado y lo colonizan mediante los antígenos del Factor de Colonización de las Fimbrias (CFAs). Hay cuatro tipos de CFA –I, II, III y IV- y se han clonado y secuenciado. Los CFAs están codificados en un plásmido, generalmente en el mismo plásmido que codifica la enterotoxina termoestable, y no se producen a menos de 20 °C.

A diferencia de las cepas EPEC, que provocan una diarrea principalmente en los más jóvenes, las cepas ETEC provocan diarrea tanto en niños como en adultos. Estas cepas se encuentran entre las principales causas de la diarrea del viajero. Los síndromes de la enfermedad por ETEC rara vez van acompañados de fiebre, y la diarrea es repentina. Se ha calculado que se requieren  $10^8 - 10^{10}$  ufc para que una cepa ETEC provoque la diarrea en personas adultas.

#### 2.7.4. **Patogenia**

La ***Escherichia coli*** puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.

- **Virulencia**

La ***Escherichia coli*** está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte por esta bacteria. Generalmente ataca a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C (Jay, 2009).

## 2.8. ***Salmonella typhi***

La ***Salmonella sp.***, es una bacteria gram negativo, anaerobia facultativa, perteneciente a la familia ***Enterobacteriaceae***, formado por bacilos con flagelos peritricos que no desarrollan cápsula (excepto la especie ***Salmonella typhi*** que adquieren propiedades de alta peligrosidad) ni esporas (Santivañez, 1984). Producen sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, no produce ureasa, es sensible al calor y muere por calentamiento (mayor a los 70 °C). Está presente frecuentemente en los animales, especialmente en las aves y los porcinos (Jay, 2009) (Figura 05).

### **Clasificación taxonómica de *Salmonella sp.***

REINO: Bacteria.

FILO: Proteobacteria.

CLASE: Gammaproteobacteria.

ORDEN: Enterobacteriales.

FAMILIA: Enterobacteriaceae.

GÉNERO: *Salmonella*.

ESPECIE: ***Salmonella sp.***

**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention, 2014.

#### **2.8.1. Epidemiología**

La importancia clínico epidemiológico se da en más de 2000 serovariedades de ***Salmonella*** pueden agruparse en tres divisiones ecológicas (spp. son subespecies):

- ***Salmonella spp.*** adaptadas a vivir en el ser humano, entre ellas, ***Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A, B y C***;
- ***Salmonella spp.*** adaptadas a hospederos no humanos, que circunstancialmente pueden producir infección en el hombre, entre ellas, ***Salmonella dublin* y *Salmonella cholerae-suis***;
- ***Salmonella spp.*** sin adaptación específica de hospedero, que incluye a unas 1800 serovariedades de amplia distribución en la

naturaleza, las cuales causan la mayoría de las salmonelosis en el mundo (Discapnet., 2013).

**Figura 05. *Salmonella sp.***



**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention, 2014.

La ***Salmonella typhi*** bacteria móvil que desarrolla cápsula, puede sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno. Pertenece al serotipo 9 y 12, en base a los epítopes de la tivelosa; es un agente productor de zoonosis de distribución universal; causa la fiebre tifoidea en humanos entre 6 - 48 horas, quienes son sus únicos hospedantes, la tasa de mortalidad de la fiebre tifoidea es del 10% comparada con menos del 1% para la mayoría de las formas de salmonelosis. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar, también por vía sexual (Discapnet., 2013).

### 2.8.2. Patogenia

Estas bacterias pueden dar lugar a diferentes cuadros clínicos, desde cuadros intestinales como la enterocolitis por **Salmonella**, a la bien conocida fiebre tifoidea, pasando por bacteriemias y cuadros de infección localizada.

Esta bacteria puede acantonarse en la vía biliar una vez pasado el cuadro agudo y eliminarse por heces de manera regular, dando lugar al estado de portador sano, que constituyen un factor importante en la epidemiología de la enfermedad, ya que estos no manifiestan síntomas de enfermedad, pero son capaces de transmitirla (Discapnet., 2013).

### 2.9. Principio activo de las plantas medicinales

**Thompson (1981)** refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo, que produce efectos fisiológicos. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas.

## 2.10. Aceites esenciales (AE)

También llamada esencia o aceite volátil, que le da un carácter aromático a la planta que lo contiene. Son constituyentes fitoquímicos con predominio volátil y odorífero, de composición química compleja, se originan a partir de los tejidos secretores, almacenándose en pelos glandulares, cavidades esquizógenas o lisigénas. Generalmente son líquidos fluidos, más livianos que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerda a la planta de origen, incoloras o amarillentas translucidas, solubles en alcohol, éter, cloroformo e insoluble en agua, dejan manchas sobre el papel que desaparecen con el tiempo (James, 2002).

Se considera que los aceites esenciales son químicamente una mezcla compleja y muy variables de hidrocarburos alicíclicos, denominados terpenos y sus derivados oxigenados llamados alcanfores (Marques, 1997). La composición de los aceites esenciales es diversa. Están principalmente constituidos por hidrocarburos de fórmula  $C_{10}H_{16}$ . En la actualidad se refieren a un gran número de hidrocarburos que aparecen en la naturaleza con fórmula  $(C_5H_8)_n$ , sus derivados y compuestos aromáticos (Duraffourd, D' hervicourt & Lapraz, 1983; Look de Ugaz, 1988). Químicamente los aceites esenciales son sustancias terpénicas (monoterpenos y sesquiterpenos) y derivados aromáticos fenilpropánicos. Pueden ser de tipo alcohol, cetona, fenol, éter, etc. (James, 2002).

### **Propiedades Físicas de los aceites esenciales:**

- Líquidos a temperatura ambiente (a diferencia de los aceites “fijos”).
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Arrastrables en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100 °C (Agapito & Sung, 2003).

Se ha comprobado que los aceites esenciales de plantas similares a la runtuwayra como de: *Luma chequen* (arrayán), *Minthostachys mollis* (muña); poseen actividad antimicrobiana frente a: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Helicobacter pylori* (Güisa & Rincón, 2007).

#### **2.11. Actividad antibacteriana**

La mayoría de los aceites esenciales son antibacteriales “Las propiedades antibacteriales de aceites volátiles de plantas han sido reconocidas desde los tiempos antiguos; en Egipto donde eran usados empíricamente, para prevenir la descomposición bacteriana en los sarcófagos. Más recientemente, los aceites volátiles han sido usados en productos farmacéuticos y cosmetología” (Gutiérrez, 2004).

Los aceites esenciales, compuestos extraídos de varios tipos de plantas y usados para preservar alimentos y bebidas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. Se conoce de la actividad antimicrobiana de varias especies vegetales en forma de extractos o hierbas aromáticas en los alimentos, en donde inhiben la formación vegetativa de esporas, detienen el crecimiento de alimentos patógenos y levaduras (Carhuapoma, 2007). Actualmente las esencias de plantas parecidas a la runtuwayra como la punamuña, urqu muña, muña se utilizan para combatir piojos y pulgas, como también en los cultivos de hortalizas y parásitos externos del ganado (Güisa & Rincón, 2007). En numerosos estudios los aceites esenciales han mostrado actividad antibacteriana como: anti – *Escherichia coli* y anti – *Salmonella typhi*.

**Contreras (1983)** estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, demostrando cualitativamente su efecto antimicrobiano frente a *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *E. coli*, resultando *Shigella dysenteriae* la más sensible al aceite esencial de “Muña”.

**Inga & Guerra (2000)** demostraron mediante un estudio las propiedades bactericidas / bacterostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus MC*, *Salmonella typhi*, *S. sonnei MC*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031. Además de la acción fungistático / fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergiüs Níger*.



**Primo et al. (2001)** estudiaron a *Minthostachys verticillata* "Peperina", observándose buena actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. Mirabilis* y antiviral contra el virus Herpes Simplex Tipo 1 y el virus de la Pseudorrabia, aunque con escasa actividad contra *P. aeruginosa*.

**Bravo et al. (2004)** realizaron una investigación para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* "muña" y *Lepechinia millerii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Concluyendo que *Minthostachys mollis* si contiene flavonoides y que presenta actividad antibacteriana como consecuencia de la presencia de aquellos.

**Mora (2009)** examinaron y analizaron los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb var Vaught. Recogidos en enero de 2008 en la localidad de Tuñame, estado de Trujillo, Venezuela, fueron separados e identificados por el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas. El aceite esencial se obtiene por hidrodestilación y trece componentes (98,5% de la muestra) fueron identificados por comparación. Los dos componentes principales son pulegona (55,2%) y trans-mentona (31,5%). El aceite esencial mostró un efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 µg/ml).

## **2.12. Aceite esencial como conservante**

### **2.12.1. Problemática del uso de compuestos antimicrobianos y antioxidantes naturales**

Dentro de los compuestos antimicrobianos y antioxidantes naturales estudiados se encuentran los terpenos, compuestos fenólicos, compuestos azufrados y los extractos de plantas. No obstante, a pesar de sus propiedades, su aplicación a los alimentos ha entrado en controversia debido a que diversas investigaciones han demostrado que incluso a dosis bajas son capaces de inducir cambios en las características organolépticas del alimento y por tanto el rechazo por parte del consumidor.

La reactividad química de los agentes antimicrobianos naturales con los alimentos (especialmente con frutas y hortalizas frescas) y la matriz en que están embebidos, afecta significativamente las propiedades sensoriales del producto. Los aceites esenciales y compuestos azufrados han demostrado ser antibióticos eficaces, sin embargo, sus compuestos volátiles pueden ser absorbidos por el producto alimenticio y alterar sus características sensoriales. Además, las reacciones con los lípidos, proteínas, hidratos de carbono y otros aditivos, puede resultar en una disminución general de la actividad de los compuestos antimicrobianos. La actividad antioxidante de terpenos y compuestos fenólicos ha sido ampliamente estudiados, sin embargo, su utilización en la industria se ve limitada debido a las degradación de dichos

compuestos al ser expuestos a largos periodos de almacenamiento, a la luz, al oxígeno y a las altas temperaturas requeridas durante las diferentes etapas de elaboración de los alimentos (Universidad de Sonora, 2012).

#### **2.12.2. Optimización del uso de compuestos naturales como antimicrobianos**

Considerando la efectividad de los compuestos naturales como aditivos alimentarios y el promisorio éxito de ser aceptados por el consumidor, es necesario llevar a cabo una optimización en el mecanismo de aplicación, por lo que el presente apartado describe las aproximaciones realizadas para optimizar la aplicación de tales compuestos en matrices alimentarias, específicamente los casos de encapsulación de los compuestos bioactivos y su incorporación en películas comestibles.

- **Encapsulación**

La encapsulación es una tecnología con la cual se pueden atrapar compuestos sólidos, líquidos o gaseosos con propiedades específicas en una matriz sólida (cápsulas), que protegen a los compuestos activos de la degradación, aumentando su disponibilidad, debido a que bajo ciertas condiciones liberan su contenido a una velocidad, por lo que la encapsulación puede definirse como un proceso de atrapar a una sustancia (núcleo o compuesto activo) en otra sustancia (material de la pared, matriz o encapsulante), con producción de partículas con

un diámetro de un nanómetro hasta varios mm (Universidad de Sonora, 2012).

- **Películas comestibles**

El uso de películas o cubiertas comestibles es una buena alternativa para incorporar agentes antimicrobianos y antioxidantes que sean liberados gradualmente en la superficie del alimento, permaneciendo por periodos más prologados, dando mayor vida de anaquel al alimento. Modificaciones en el tipo y cantidad de plastificante pueden ayudar a controlar la liberación de antimicrobiano. Las cubiertas o películas comestibles se definen como capas delgadas elaboradas de diferentes materiales como polisacáridos, proteínas, lípidos y resinas derivados de plantas y animales. Éstas son aplicadas sobre la superficie de los alimentos en adición o reemplazo de la corteza natural y su principal función es actuar como barreras que reduzcan la difusión de gases y vapor de agua, retardando la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, grasas y aceites, para extender la vida útil del alimento. Estas películas además de ser consumidas con el alimento, pueden ser transportadoras de nutrientes y aditivos como agentes antioxidantes, antimicrobianos, entre otros (Universidad de Sonora, 2012).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Govaerts “runtuwayra” al 100%, 50% y 25%, frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente el aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Govaerts “runtuwayra” al 100%, 50% y 25%, determinando las constantes de densidad relativa (g/ml), rotación óptica, índice de acidez (mg/ml) e índice de refracción.
- Comparar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Govaerts “runtuwayra” al 100%, 50% y 25%, frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***, aplicando el antibiótico sulfametoxazol más trimetoprim 30 ug.
- Determinar los valores óptimos antibacterianos del aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Govaerts “runtuwayra”, frente a la supervivencia de cepas de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi***, mediante la medición de los halos de inhibición.

## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Población

La población estuvo constituida por las bacterias que causan las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA<sub>S</sub>), pertenecientes a la familia de la ***Enterobacteriaceae***.

#### 3.2. Muestra

Se seleccionaron dos especies diferentes de bacterias bacilos gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*: ***Escherichia coli*** ATCC 25922 (American Type Culture Collection) y ***Salmonella typhi***, proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima - Perú.

##### 3.2.1. Unidad de análisis

El método de selección será un muestreo no probabilístico por conveniencia en donde se verá el crecimiento bacteriano de ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Salmonella typhi*** frente al aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** “runtuwayra” puro y en dilución (50%, 25%).

### **3.3. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de mayo a diciembre del 2013, en los Laboratorios de Procesos, Química, y Biotecnología de la Escuela Profesional Ingeniería Agroindustrial, de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Nacional José María Arguedas (UNAJMA). La identificación de la planta fue realizada en el Herbario Vargas (CUZ) de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC). La evaluación de las constantes físicas se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica y la elucidación de los componentes químicos del aceite esencial se realizó en el Laboratorio de Cromatografía de Gases, de la UNSAAC.

### **3.4. Materiales, Equipos y Reactivos**

#### **Extracción del aceite esencial:**

- Hojas y talluelos de runtuwayra
- Balanza de precisión
- Refrigeradora
- Soporte universal
- Probeta florentino
- Frascos ámbar
- Destilador

#### **Análisis fisicoquímico y fitoquímico**

- Aceite esencial
- Vasos precipitados

- Tubos de ensayo
- Bureta
- Gotero
- Embudo de vidrio
- Soporte universal
- Balanza analítica
- Polarímetro
- Refractómetro
- Picnómetro
- pH-metro
- Agua destilada
- Alcohol a 96°
- Hidróxido de potasio (KOH) al 10 %
- Fenolftaleína
- Permanganato de Potasio (KMnO<sub>4</sub>)
- Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub> al 1%)

#### **Caracterización de los componentes químicos del aceite esencial**

- Fiola
- Micropipetas 10 ml y 10 µl
- Frascos de vidrio
- Cromatógrafo de gases – espectrómetro de Masas AGILENT 6890N
- Aceite esencial deshidratado (Sulfato de sodio anhidro al 1%,)
- Metanol



### **Actividad antimicrobiana**

- Placas petri
- Pipetas
- Probetas
- Erlenmeyer
- Matraz aforado
- Bagueta
- Tubos de prueba de 15 x 150 mm
- Discos de papel filtro estériles whatman N° 03
- Mechero de alcohol
- Algodón
- Hisopos de madera
- Asas de siembra
- Balanza de precisión
- Estufa (incubadora)
- Refrigeradora
- Nefelómetro Marc Farland
- Autoclave
- Agua destilada estéril
- Alcohol yodado
- Alcohol a 70°
- Suero fisiológico
- Medios de cultivo:      Agar TSA (Tryptone yeast Extract Agar)  
   Agar Mac Conkey  
   Agar Müller Hinton

- Bactrim (Sulfametoxazol más trimetoprim -30 µg).
- Cepas certificadas: ***Escherichia coli*** ATCC 25922  
***Salmonella typhi***

### 3.5. Métodos

El presente trabajo de investigación pertenece a un tipo de estudio analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

**Es experimental**, debido a que se trabajó con un grupo control positivo representado por los discos de papel de filtro embebidos con el antibiótico Sulfametoxazol + Trimetoprim a 30 µg, un grupo control negativo representado por discos de papel de filtro embebidos en alcohol etílico al 70%; y un grupo experimental representado por discos de papel de filtro embebidos con el aceite esencial de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Grovaerts "runtuwayra".

**Es prospectivo**, debido a que la recolección de los datos se realizó conforme la ocurrencia de los hechos.

**Es transversal**, debido a que las variables fueron observadas en un solo momento de acuerdo al objetivo de la investigación.

### 3.5.10. Obtención de la muestra vegetal

- La planta ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Grovaerts “runtuwayra” fue colectada en el cerro Uqupata a 3450 m.s.n.m. (GPS eTrex 30 marca GARMIN), provenientes de las alturas del Centro Poblado Menor de Manchaybamba (3200 m.s.n.m.), Distrito de Pacucha, Provincia de Andahuaylas (2926 m.s.n.m.), Departamento de Apurímac (2900 m.s.n.m.). Se tomó en cuenta para la colección sólo aquellas plantas que se encontraban a inicios de su floración, a partir de una población vegetal con crecimiento.
- La planta fue colectada durante el mes de febrero del 2013, tiempo en el cual la planta crece normalmente y se cortó con la ayuda de una cegadera a una altura de 30 cm al ras de la tierra; y colocada en un costalillo en cantidad aproximada de 10 kg de materia prima, y transportada al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional José María Arguedas, para luego almacenarla en un ambiente adecuado. Se separó la parte aérea (hojas y talluelos) para su uso.

### 3.5.11. Procesamiento de la muestra

- Se seleccionaron hojas y talluelos de ***Clinopodium weberbaueri*** (Mansf.) Grovaerts “runtuwayra”, en cantidad de 6.5 kg.
- Luego se agregó alcohol al 70% en spray para desinfectarla y sacar a los insectos que estuvieran en las hojas.

- Posteriormente se desecaron las hojas bajo sombra a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C), durante 07 días hasta obtener una muestra seca que fácilmente se trituró al frotar con la mano volatilizando su aroma.
- Luego fueron conservados en bolsas de papel kraft hasta su utilización. (Palacios, Mendoza & Salcedo 2004; Díaz, 2005; Siani, Franco, Sousa & Oliveira, 1998).

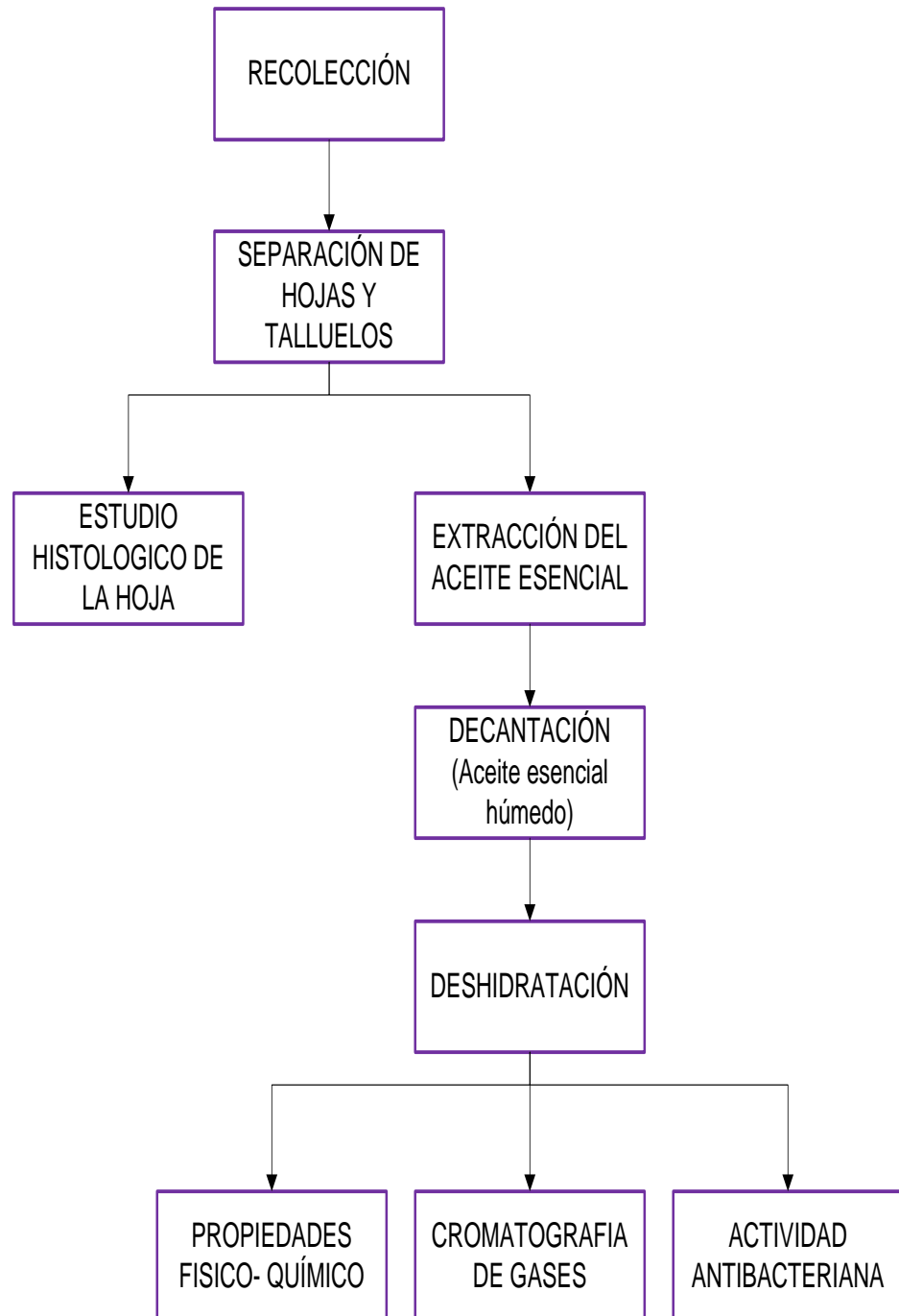
#### **3.5.12. Obtención del aceite esencial (Figura 06).**

- A partir de 6 kg de hojas secas de *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Grovaerts “runtuwayra”, fueron sometidos a destilación por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable, facilitado por el Laboratorio de Procesos de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial (EPIA) de la UNAJMA.
- El destilado se separó tomando en cuenta las propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial. Utilizando una pera de separación de vidrio, se deshidrató el aceite esencial con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró para luego ser conservado en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.  
(Bandoni, 2000).

**FIGURA 06.**

Diagrama de preparación del aceite esencial de *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.)

Grovaerts “runtuwayra”, para el estudio fisicoquímico y microbiológico.



**Fuente:** Elaboración propia, 2013.

❖ Condiciones de extracción del aceite esencial de *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Grovaerts “runtuwayra”

- Destilación a una T° constante de 95° para el agua en ebullición.
- Agua de enfriamiento de 6 °C.
- Tiempo de 2 horas.
- Presión del vapor máxima a 6 psi (Carhuapoma, 2006).

**3.5.13. Determinación del rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium weberbaueri* (Mansf.) Grovaerts “runtuwayra”**

La determinación del porcentaje de rendimiento de aceite esencial (% RAE), se realizó a escala laboratorio por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable. A partir de 6 kg de hojas de *Cl. weberbaueri*, se obtuvo un determinado volumen que fue medido con una probeta florentino.

Por el método gravimetría-volumétrico se determinó el % RAE, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RAE} = \frac{\text{Vol. AE (ml)}}{\text{Peso muestra (g)}} \times 100$$

Donde:

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

Peso muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos (Díaz, 2005).

#### **3.5.14. Determinación de las constantes fisicoquímicas del aceite esencial**

Se determinó por métodos físicos e instrumentales: rotación óptica por polarimetría; densidad relativa por picnometría; índice de refracción por refractometría, índice de acidez y pH.

- **Densidad relativa (g/ml)**

**Procedimiento:** En un picnómetro, aforado a un volumen fijo, se llena de agua, se cierra el envase para posteriormente pesarlo en una balanza analítica; luego de vaciar el agua, se llena el picnómetro con aceite esencial de “runtuwayra”, y se lleva a pesarlo a la balanza analítica. La densidad se obtiene dividiendo la masa del líquido por el aforo del frasco (Castiñeiras & Queraltó, 1998).

- **Índice de refracción**

**Procedimiento:** Previamente se calibró el refractómetro con agua bidestilada; luego se tomó aproximadamente 0.5 ml del aceite esencial y se colocó encima de la lámina del refractómetro para efectuar la lectura del valor de refracción que expresa el prisma, esto por medio del campo de imagen (Costa, 2005; Seymour & Carraher, 1996; Olsen, 1990).

- **Rotación óptica**

**Procedimiento:** Se colocó la muestra de aceite esencial en el tubo de contención, llenándolo por completo, luego de cerrarlo herméticamente, se llevo al polarímetro para efectuar la lectura correspondiente (Costa, 2005; McMurry, 2005).

- **Índice de acidez**

**Procedimiento:** En un frasco erlenmeyer se colocó 0.5 mg de muestra a 20 ml de una solución 1:1 de alcohol etílico de 96° y éter; luego en una bureta se llenó con hidróxido de potasio 0.1 N para llevar a titulación de la muestra de aceite esencial. Se obtuvo de gasto 0.2 ml de Hidróxido de potasio, y con dicho dato se procedió a calcular el Índice de Acidez (Millar, Sangines & Torre, 2003).

- **pH**

**Procedimiento:** En un vaso precipitado se colocó 0.5 ml de muestra (aceite esencial), se adicionaron 10 ml de alcohol etílico de 96°; luego con un peachímetro se mide y da un valor de 6.3 (Millar, Sangines & Torre, 2003).



### 3.5.15. Análisis fitoquímico del aceite esencial

Se determinó por métodos instrumentales: dobles enlaces con  $KMnO_4$  y compuestos aromáticos con  $FeCl_3$  al 1 %.

- **Dobles enlaces**

**Procedimiento:** En un tubo de ensayo se adiciona una gota de aceite esencial de “runtuwayra”, se enrasa a 3 ml con alcohol a 96°, se mueve para que se disuelva, una vez disuelto se adiciona una gota de permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) y si vira a color azul quiere decir que hay presencia de dobles enlaces (Skoog, 2008).

- **Compuestos aromáticos**

**Procedimiento:** En un tubo de ensayo se adiciona una gota de aceite esencial de “runtuwayra”, se enrasa a 3 ml con alcohol a 96°, se mueve para que se disuelva, una vez disuelto se adiciona una gota de cloruro férrico ( $FeCl_3$  al 1 %) y si vira a color rojo quiere decir que hay presencia de compuestos aromáticos (Skoog, 2008).

### 3.5.16. Caracterización de los componentes químicos del aceite esencial

- La caracterización se realizó por métodos cromatográficos y espectroscópicos. Se empleó el Cromatógrafo de Gases (GC) AGILENT 6890N – acoplado a un Espectrómetro de Masas, con un detector de Masas AGILENT 5975B y un Inyector automático 7683B; con columna HP – 5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane, inyector frontal (SPLIT/SPLITLESS).

- El análisis por GC fue realizada en un Hewlett-Packard 6890 computarizado con un procesador de software, Se empleó como muestra 10 µl de aceite esencial en 10 ml de etanol (1%); con columna a temperatura del horno inicial de 60 °C, temperatura de horno a 60 °C – 200 °C (39.17 minutos), gas transportador helio y a una presión 9 psi. La identificación es basada en comparación de las señales en la mezcla espectral, con datos compilados de la librería referente y con la ayuda de un software Laboratory - Made.
- El aceite esencial de “runtuwayra”, fue analizado por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas; para luego comparar los picos y espectros con estándares almacenados en “Librerías virtuales”; y así determinar la composición cualitativa del aceite esencial. La cromatografía fue analizada en el laboratorio de Cromatografía y Espectrometría – UNSAAC (Anexo XII).

### **3.5.17. Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial**

Las cepas puras y certificadas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhi*, se adquirieron del Instituto Nacional de Salud – INS (Anexo VIII y IX), y se manipularon siguiendo las normas de bioseguridad N° 2.

- ❖ Determinación de la actividad antibacteriana, método de Bauer Kirby (Cáceres, 1999).

**Fundamento:**

Llamada también método de difusión de discos. El crecimiento exponencial de bacterias (*E. coli* y *S. typhi*) en el medio de cultivo adecuado es inhibido por las moléculas bioactivas del aceite esencial que difunden del disco de papel de filtro hacia el agar. Este procedimiento se basa en el descrito por Bauer - Kirby y es usado para evaluar la actividad antibacteriana vegetal.

**Procedimiento:**

- Se emplearon medios de cultivo (agar Müller Hinton, agar Soya Trypticasa (TSA) y agar Mac Conkey (MC)), para reactivar las cepas puras de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhi*, se trabajaron por duplicado, llevándose las placas a incubación por 24 horas a 37 °C, con la finalidad de obtener colonias viables.
- Luego se preparó el inóculo de cada especie bacteriana suspendiéndose en suero fisiológico estéril y se correlacionó con una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland ( $1.5 \times 10^9$  UFC/ml).
- Se agregó 0.1 ml de este inóculo en placas conteniendo Agar Müller Hinton previamente esterilizado expandiéndose por toda la superficie utilizando el método del hisopado.