Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón"

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Cinthia MEJIA RAMOS

ASESORES

Oscar HERRERA CALDERÓN

Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mejia C. Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle “cedrón” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Cinthia Mejia Ramos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70800824
URL de ORCID	No Aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40556214
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7264-0961
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07760326
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4176-1618
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07371298
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Juan Roberto Pérez León Camborda

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06050022
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Fritz Fedor Choquesillo Peña
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06203655
Datos de investigación	
Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Jirón Puno N°1002, Cercado de Lima. Latitud: -12.05819215 Longitud: -77.0189181894387
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2022 – Febrero 2024
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón"

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

CINTHIA MEJIA RAMOS

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

18 aprobado con mención honrosa

de conformidad con el Art. 14.° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 12 de setiembre de 2024.

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente

Mg. Juan Roberto Pérez León Camborda
Miembro

Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
Miembro

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Oscar Herrera Calderón identificada con DNI **N°44789288** en mi condición de asesor(a) acreditado con la resolución Decanal **N°000806-2023-D-FFB/UNMSM**, que la Tesis cuyo título es **Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón",** presentado por la Bachiller **Cinthia Mejía Ramos**, para optar el título profesional de Química Farmacéutica.

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **8 %** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Jardín Botánico, Lima, 06 de Setiembre del 2024



Firma del asesor
DNI: **44789288**
Oscar Herrera Calderón

DEDICATORIA

A Dios**,** que me concedió el milagro de la vida y me permitió llegar hasta aquí.

A mis estimados padres: Virgilio Concepción y María Consuelo, en particular a mi querida madre, que siempre ha creído en mí y nunca me ha abandonado en este difícil camino. Aprendí de tus admirables hechos a nunca rendirme y darme cuenta de que el trabajo duro y la perseverancia son necesarios para alcanzar las metas. Este logro te pertenece más a ti que a mí ya que eres la mejor madre, amiga, colaboradora y la persona más significativa de mi vida.

A mis queridos tíos: Arsenio y Agapita, por ser mis segundos padres y brindarme un alimento y techo donde vivir, por estar siempre conmigo y considerarme como una hija más para ustedes.

A mi querida hermana: Benny Edith Flor, que ha sido mi soporte a lo largo de esta travesía, por ser mi ejemplo que seguir y hacer de mí una mujer fuerte, valiente y con principios.

A mi abuelita: Marcelina, porque siempre soñaste que terminara una carrera universitaria, ahora que estas en el cielo sé que siempre iluminas mi camino y celebras conmigo todos mis triunfos alcanzados.

A mis tíos, primos y compañero de vida, que me han brindado apoyo emocional y, lo más importante, por estar siempre allí y demostrarme su amor.

Los quiero para siempre, ¡De todo corazón!

AGRADECIMIENTO

A mi asesor**, *Dr. Oscar Herrera Calderón*,** por su inquebrantable consejo, apoyo y dirección a medida que se desarrollaba este proyecto de investigación. Mi más profundo agradecimiento por creer en mi cuando este proyecto no era más que una idea.

Quisiera expresar mi profunda gratitud a mi co-asesor***, Dr. Julio Ruiz Quiroz,*** por compartir con entusiasmo sus vastos conocimientos en el área de la microbiología y su inquebrantable apoyo en la realización de esta tesis.

Me gustaría agradecer también a todos los profesores de la E.P de Farmacia y Bioquímica, por ayudarme de diversas formas en la culminación de la tesis.

A la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) – Ecuador, por su ayuda y cooperación durante la determinación de la composición química de nuestra planta de investigación.

A mis padres, hermana, tíos y amigos les agradezco su inquebrantable apoyo, orientación e inspiración para ayudarme a cumplir mis sueños. También por haberme dado la fuerza de voluntad y la perseverancia necesaria para seguir adelante.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1

I.1. Planteamiento del problema 2

I.1.1. Determinación del problema 2

I.1.2. Formulación de problema 3

I.2. Objetivos 3

I.2.1. Objetivo general 3

I.2.2. Objetivos específicos 3

I.3. Importancia y alcance de la investigación 4

I.4. Limitaciones de la investigación 5

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 6

II.1. Marco teórico 6

II.1.1. Plantas medicinales 6

II.1.2. Plantas aromáticas 6

II.1.3. Familia Verbenaceae 6

II.1.4. Género *Aloysia* 7

II.1.5. Planta medicinal en investigación 7

II.1.6. Aceites esenciales 8

II.1.7. Radicales libres 8

II.1.8. Antioxidantes 9

II.1.9. Actividad antimicrobiana 9

II.2. Antecedentes 10

II.3. Glosario de términos 14

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 15

III.1. Hipótesis 15

III.2. Variables 15

III.3. Operacionalización de variables 15

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 16
IV.1.Área de estudio 16
IV.2.Diseño de investigación 16
IV.3.Población y muestra 16
IV.4.Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección……..16
IV.4.1. Recolección de la muestra de investigación 16
IV.4.2. Acondicionamiento de la muestra 17
IV.4.3. Clasificación taxonómica 17
IV.4.4. Extracción del aceite esencial 17
IV.4.5. Rendimiento del aceite esencial 17
IV.4.6. Análisis fisicoquímico del aceite esencial 18
IV.4.7. Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis quimico del aceite esencial. 18
IV.4.8. Evaluación de la actividad antibacteriana 18
IV.4.9. Actividad antioxidante. 22
V. RESULTADOS 28
V.1. Análisis fisicoquímico del aceite esencial 28
V.2. Composición química del aceite esencial por Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM). 28
V.3. Determinación de la actividad antibacteriana. 34
V.4. Cuantificación de la actividad antioxidante 37
VI. DISCUSIÓN 42
VII. CONCLUSIONES 49
VIII. RECOMENDACIONES 50
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51
X. ANEXOS 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluciones dobles finales del ciprofloxacino.

Tabla 2. Esquema de microdilución colorimétrica de las bacterias Gram positivas.

Tabla 3. Esquema de microdilución colorimétrica de las bacterias Gram negativas.

Tabla 4. Cálculo de la absorbancia y concentración final en µg/mL del AE - DPPH.

Tabla 5. Cálculo de la absorbancia y concentración final en µg/mL de Trolox® - DPPH.

Tabla 6. Cálculo de la absorbancia y concentración final en µg/mL del AE por el método ABTS.

Tabla 7. Preparación del estándar antioxidante Trolox® por el método ABTS.

Tabla 8. Tubos de reacción para el método ABTS.

Tabla 9. Propiedades físicas y fisicoquímicas del AE del cedrón.

Tabla 10. Cromatograma de gases de los compuestos orgánicos volátiles del cedrón.

Tabla 11. Valores de CMI del AE frente a 04 cepas.

Tabla 12. Resultados de la concentración vs absorbancia del AE – DPPH.

Tabla 13. Concentración vs absorbancia de Trolox® - DPPH.

Tabla 14. Resultados de la concentración vs absorbancia del AE - ABTS.

Tabla 15. Concentración vs Absorbancia de Trolox® - ABTS.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción y sitio diana de los aceites esenciales.

Figura 2. Prueba de la microdilución cuantitativa y control para determinar la CMI.

Figura 3. Reacción entre el radical DPPH y el sustrato (AH).

Figura 4. Reacción entre el radical DPPH y Trolox®.

Figura 5. Diagrama de flujo de la actividad antioxidante - DPPH del AE.

Figura 6. Método de eliminación de radicales ABTS para determinar la capacidad antioxidante.

Figura 7. Diagrama de flujo de la capacidad antioxidante - ABTS del AE.

Figura 8. Cromatograma de gases de los componentes orgánicos volátiles del cedrón.

Figura 9. Cálculo de la CMI sobre *Staphylococcus aureus* y *B. subtilis.*

Figura 10. Cálculo de la CMI frente a *E. coli* y *P. aeuroginosa.*

Figura 11. Curva de DPPH del AE del cedrón.

Figura 12. Curva de calibración equivalente a Trolox® para DPPH.

Figura 13. Curva de captación de ABTS del AE del cedrón.

Figura 14. Curva de calibración equivalente a Trolox® para ABTS.

Figura 15. Ubicación geográfica del distrito de Aucará.

Figura 16. Imagen de la muestra vegetal “cedrón” in situ.

Figura 17. Recolección de la muestra vegetal.

Figura 18. Acondicionamiento y secado de la muestra vegetal.

Figura 19. Extracción del AE.

Figura 20. Densitómetro DEN-1B (detector de turbidez en suspensión de los microorganismos).

Figura 21. Agitador vórtex MX-S (dispositivo para mezclar componentes líquidos en tubos utilizando un movimiento orbital).

ABREVIATURAS

AE : Aceite esencial

RL : Radical libre

CMI : Concentración Mínima Inhibitoria

DPPH : Radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

$ABTS^{+}$: Radical 2,2′-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico

IC_{50} : Concentración mínima que neutraliza el 50% de los radicales libres del DPPH.

CG/EM : Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

TROLOX® : Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)

$\%R_{AE}$: Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

CMH : Caldo Mueller Hinton

ATS : Agar Tripticasa Soya

UFC : Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" según el método DPPH y ABTS. La extracción del aceite esencial se realizó de las partes aéreas por el método de destilación por arrastre con vapor, luego se determinaron las propiedades físicas y fisicoquímicas. La composición química fue determinada por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM). La actividad antibacteriana se realizó por microdilución colorimétrica para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se evaluó la actividad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS. El rendimiento obtenido fue de 0,75%. El análisis de CG/EM mostró al (E)-Cariofileno (16,01%), β-Pineno (14,19%) y α-Pineno (9,11%) como componentes mayoritarios. La determinación de la CMI presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis,* una actividad mínima para *Escherichia coli* y no mostró actividad alguna para *Pseudomonas aeruginosa.* En el análisis de DPPH se mostró un IC_{50}=7720,0 ± 24 ug/mL y para el método de ABTS un IC_{50}=4648,60 ± 54 ug/mL, si comparamos con el patrón de referencia Trolox® para ambos casos nos muestran un alto valor antioxidante lo cual nos evidencia un prometedor efecto antioxidante natural para el cedrón. A partir de ello podemos decir que los componentes químicos muestran una actividad antibacteriana frente a las Gram positivas estudiadas, asimismo posee una buena actividad antioxidante el cual puede verse afectado por factores durante la extracción y la composición química de la muestra.

Palabras claves: *Aloysia triphylla* Royle, aceite esencial, actividad antibacteriana, análisis antioxidante.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the in vitro antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of Aloysia triphylla Royle "cedron" according to the DPPH and ABTS method. The extraction of the essential oil was carried out from the aerial parts by the steam distillation method, then the physical and physicochemical properties were determined. The chemical composition was determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The antibacterial activity was performed by colorimetric microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The antioxidant activity was evaluated by the DPPH and ABTS method. The yield obtained was 0.75%. The GC/MS analysis showed (E)-Caryophyllene (16.01%), β-pinene (14.19%) and α-pinene (9.11%) as major components. The MIC determination showed antibacterial activity against Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis. subtilis, a minimal activity for Escherichia coli and did not show any activity for Pseudomonas aeruginosa. In the DPPH analysis it was shown an IC50=7720.0 ± 24 ug/mL and for the ABTS method an IC50=4648.60 ± 54 ug/mL, if we compare with the reference pattern Trolox® for both cases they show a high antioxidant value which shows us a promising natural antioxidant effect for lemon balm. From this we can say that the chemical components show an antibacterial activity against the Gram positives studied, it also has a good antioxidant activity which can be affected by factors during the extraction and the chemical composition of the sample.

Key words: *Aloysia triphylla Royle,* essential oil, antibacterial activity, antioxidant analysis.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es una nación mega diversa situada en una de las zonas identificadas como centros mundiales de biodiversidad. Su característica más notable es la profusión de plantas medicinales de uso humano que existen desde nuestros antepasados [1]. De las 250 000 especies de plantas solo el 10% se encuentran en nuestra nación [2].

Durante mucho tiempo, una de las principales opciones en medicina han sido las plantas medicinales. Sin embargo, el crecimiento de su cadena de valor ha recibido poca atención [1,2].

Debido a sus múltiples usos, incluida la producción de fragancias, cosméticos, aromatizantes, alimentarios y productos farmacéuticos, así como a su gran valor e importancia económica, los AE derivados de plantas aromáticas son actualmente muy apreciados en el comercio [3]. Los líquidos concentrados volátiles, aromáticos e hidrófobos derivados de plantas aromáticas se denominan aceites esenciales; su composición varía y su acción biológica se atribuye a los terpenos [2,3].

En los últimos años muchos microorganismos, exhiben resistencia a las drogas causado por un uso inadecuado de los antibióticos. Para restaurar la eficacia de los antibióticos actualmente accesibles, es imperativo desarrollar modificaciones sintéticas de antibióticos establecidos y producir alternativas novedosas derivadas de fuentes naturales [4].

El significado de los AE obtenidos de plantas medicinales en el Perú ha sido demostrado anteriormente. Después del análisis etnobotánico y taxonómico fue seleccionado la especie *Aloysia triphylla* Royle “cedrón”, planta que carece de estudio en nuestro entorno bajo las consideraciones que rige el presente trabajo de investigación.

El cedrón tiene gran uso en la medicina clásica como: antiséptico, antiespasmódico, detoxificante, digestivo, hepatobiliario, estimulante, sedativo etc [5]. Por lo que este trabajo de investigación no sólo busca resaltar la riqueza

biológica de nuestro país, sino también servir como base para nuevos estudios que se desarrollarán.

Por tanto, el objetivo del presente estudio es determinar las propiedades antioxidantes y antibacterianas del AE del cedrón en un entorno *in vitro*. Esto ayudará a acelerar la investigación futura y reforzar la sabiduría convencional con datos empíricos.

1.1. Planteamiento del problema

1.1.1. Determinación del problema

Existe una creciente preocupación mundial entre la mayoría de las personas por su salud. A lo largo de la historia, las plantas medicinales han tenido una importancia significativa en el tratamiento de muchas enfermedades[1,6]. Todavía son utilizados por comunidades andinas en donde utilizan técnicas ancestrales transmitidas de generación en generación para adquirir conocimientos de selección, manejo y conservación. En los últimos cinco años, ha aumentado la investigación sobre los principios activos vegetales como moléculas químicas alternativas [6].

De toda la flora peruana que tiene el Perú sólo el 60% del total ha sido estudiada [1,2]. La población hace un uso extensivo de estas plantas, pero muchas especies aún tienen un potencial sin explorar, lo que subraya la necesidad de apoyar la investigación de acuerdo con las normas éticas internacionales [1].

El cedrón tiene diferentes usos como antiséptico, antiespasmódico, detoxificante, digestivo, hepatobiliario, estimulante, sedativo etc [5]. Sin embargo, solo se han demostrado algunas de estas aplicaciones.

El cedrón es encontrado en abundancia en el Perú especialmente en el departamento de Ayacucho, dado que el rendimiento varía en función del origen y de las circunstancias de siembra y cosecha, es crucial comprender las aplicaciones potenciales de su aceite esencial [2]. La existencia de un componente biológicamente mayoritario puede ser aprovechable para futuras investigaciones.

1.1.2. Formulación de problema

Problema general

¿Tendrá actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* el aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón"?

Problemas específicos

- ¿Cuál será los componentes químicos volátiles del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón", determinados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas GC/MS?

- ¿Cuál será el comportamiento de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" sobre *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* por microdilución colorimétrica?

- ¿Cuál será el comportamiento de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" por DPPH y ABTS+?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón".

1.2.2. Objetivos específicos

- Identificar los componentes químicos volátiles del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas GC/MS.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" sobre *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de microdilución colorimétrica.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" por DPPH y ABTS+.

1.3. Importancia y alcance de la investigación

Las plantas medicinales, especialmente las aromáticas y sus extractos han obtenido un gran interés a lo largo de los años en la industria farmacéutica e investigación científica, debido a sus cualidades antioxidantes y antimicrobianas. Esto les ha hecho competir con otros antioxidantes naturales y producidos artificialmente que se utilizan en la actualidad [3,7].

Los antioxidantes son sustancias químicas que contrarrestan al RL y evitan la destrucción oxidativa [4]. En investigaciones anteriores de laboratorio se han demostrado concentraciones más elevadas de antioxidantes exógenos que previenen los males ocasionados por los radicales libres relacionados al cáncer [4,8]. Por lo tanto este trabajo se realizó como base para futuras investigaciones que puedan contribuir a mitigar las molestias y la mortalidad relacionadas con el cáncer.

Por el contrario, estos microorganismos dominantes responsables de las infecciones del tracto uretral son las entero bacterias, en particular *E. coli*, que se considera el patógeno más común y representa el 80% de las infecciones. La problemática del tratamiento de distintas enfermedades, sobre todo las que entrañan resistencia a los antibióticos, ha dado lugar a nuevas perspectivas. Uno de estos puntos de vista es el creciente interés por utilizar componentes vegetales para encontrar sustancias químicas antimicrobianas. La OMS calcula que entre el 65 y el 80 % de la comunidad tienen restricción a la atención médica básica y dependen de la medicina clásica para tratar diversas dolencias [1,9]. Investigaciones anteriores han demostrado que plantas de uso común, como el cedrón, tienen metabolitos activos con cualidades antibacterianas que pueden matar, inhibir o limitar el desarrollo de bacterias [9].

Investigaciones posteriores también han demostrado que la composición química del AE difiere de acuerdo con el origen geográfico de la muestra [2,3]. En el distrito de Aucará, hasta el momento no se han publicado estudios relacionados al cedrón.

1.4. Limitaciones de la investigación

El alto costo de inversión ha restringido a realizar pruebas *in vivo*. Si bien los estudios *in vitro* suelen ser más barato, efectivo y brindar buenos resultados. Sin embargo, cuando se llevan a cabo en el organismo muchas veces dejan de ser efectivos e inclusive pueden llegar a ser nocivos.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Marco teórico

2.1.1. Plantas medicinales

Las plantas clasificadas como medicinales incluyen compuestos conocidos como "principios activos", que tienen efectos farmacológicos sobre los seres vivos [4]. Tienen el poder de curar y atenuar una amplia gama de enfermedades y afecciones que han afligido a la gente a lo largo de la historia. Esto se debe muy probablemente a la abundancia de compuestos bioactivos que les confieren cualidades terapéuticas, como terpenos, alcaloides, polifenoles, carotenoides y pigmentos antociánicos [10,11].

Más de 350 dolencias identificadas por los profesionales de la medicina pueden ser tratadas por estas plantas, la mayoría de ellas asociadas a los sistemas neurológicos, respiratorio, digestivo, cardiovascular, renal, etc. Además de afecciones degenerativas como la diabetes y el cáncer [12].

2.1.2. Plantas aromáticas

Se trata de plantas medicinales que contienen esencias en su totalidad o parte de sus componentes activos. Constituyen el 0,66% de todas las plantas consideradas medicinales [13].

Lo que hace que una planta sea aromática es la presencia de una concentración mínima de aceite esencial. Además, pueden tener un gran número de componentes químicos terpenoides y/o fenilpropanoide [4].

2.1.3. Familia Verbenaceae

Entre arbustos, árboles y hierbas, esta familia se reconoce en nuestro país por presentar 23 géneros y 201 especies. Su tamaño modesto y sus hojas que suelen ser opuestas, enteras o partidas, sin estípulas, y a veces muy reducidas, son sus características definitorias. En general, las floraciones son de zigomorfas a subactinomorfas.

Los árboles de esta familia se encuentran en elevaciones bajas y medias, y son más frecuentes en los trópicos. Las hierbas y los arbustos crecen en laderas secas, llanuras aluviales, riberas, pastizales y sabanas bien drenados [14].

2.1.4. Género *Aloysia*

Este género incluye a la familia de las Verbenáceas, es el orden primario de las Angiospermas, o plantas con flores. Hay 71 nombres científicos en la lista. Solo 51 de ellos tienen nombres de especies reconocidos [15].

2.1.5. Planta medicinal en investigación

2.1.5.1. *Aloysia triphylla* Royle "cedrón"

Clasificación taxonómica

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUB-CLASE : ASTERIDAE
ORDEN : LAMIALES
FAMILIA : VERBENACEAE
GÉNERO : *Aloysia*
ESPECIE : *Aloysia triphylla* Royle

Sinónimos: *Lippia citriodora* Kunth, *Aloysia citriodora* Palau, *Aloysia triphylla* (L´Hér) Britton [16].

Nombres comunes: la planta es conocida en el Perú como "Cedrón" y el sur de Sudamérica como "Hierba luisa" [17].

Descripción: planta de 1 a 3 metros de altura, ampliamente ramificado. Muy aromático con fuerte olor a limón. Tallos largos y delgados. Hojas verticiladas, tres hojas por nudo, enteras, lanceoladas. Flores de color blanco, lila o violeta claro, organizadas en inflorescencias terminales. Fruto tipo drupa [16].

Distribución geográfica: se extiende desde América del Sur hasta el norte de África y Sur de Europa [18]. Crece en climas subtropicales y es encontrada desde los 500 hasta 4000 msnm [17].

Usos tradicionales: las hojas y tallos se usan contra insomnio, estrés, dolencia del estómago, congestiones nasales, afecciones bronquiales, corazón, presión arterial alta y como calmante de los nervios [16,17].

2.1.6. Aceites esenciales

El metabolismo de las plantas produce estos compuestos y son las responsables del olor de las plantas. Se cree que en el aceite esencial de cada especie hay entre 50 y 300 componentes químicos, incluidos hidrocarburos terpénicos, aldehídos, alcoholes, ésteres, éteres, cetonas y compuestos fenólicos. La atmósfera y la región en la que se cultivan afectan su composición química [10].

2.1.6.1. Composición y extracción

Aunque los aceites esenciales proceden de dos plantas de la misma especie, su composición química varía. Normalmente, son mezclas de más de 100 componentes de varias categorías funcionales [15].

La técnica de obtención de los AE está influenciada por el tipo, variedad y el porcentaje de rendimiento de una determinada especie vegetal. Los métodos de extracción más conocidos incluyen la extracción con disolventes orgánicos, la extracción con fluidos supercríticos, la destilación por arrastre de vapor de agua entre otros [15,18].

2.1.6.2. Importancia en la salud

La industria farmacéutica es una de las fábricas más importantes de los AE y compuestos volátiles. Se utilizan grandemente para prevenir y tratar muchas afecciones humanas, tales como los tumores y problemas relacionadas al corazón, así como agentes antioxidantes, antimicrobianos, antibacterianos entre otros [4,15].

2.1.7. Radicales libres

Son sustancias muy reactivas capaces de causar daños celulares. Se forman cuando un átomo o molécula gana o pierde un electrón. El cuerpo los produce de forma natural y son cruciales para muchas funciones celulares regulares, pero en cantidades excesivas pueden ser perjudiciales para el organismo y causar daños en componentes celulares clave como el ADN, las proteínas y las membranas.

El cáncer y otros problemas de salud pueden surgir como resultado de los daños causados principalmente al ADN. Los antioxidantes, sin embargo, tienen la disposición de detener los procesos de transformación que dañan las biomoléculas [4,8].

2.1.8. Antioxidantes

Son sustancias que interactúan con los RL para neutralizarlos e impedir que causen daños. Ciertos antioxidantes denominados “endógenos” son producidos por el cuerpo, pero el cuerpo necesita de otras fuentes externas denominadas comúnmente antioxidantes dietéticos. Las vitaminas A, C y E, el licopeno y el betacaroteno son algunos ejemplos de antioxidantes externos.

Los niveles más altos de antioxidantes exógenos previenen el daño causado por los RL, que ha sido relacionado con el cáncer, según investigaciones anteriores [8].

2.1.9. Actividad antimicrobiana

Los aceites esenciales pueden mostrar una acción antimicrobiana frente a las bacterias a través de muchos métodos, entre ellos la modificación de la estructura y la función de la membrana. Las moléculas hidrófobas de los aceites esenciales se ven muy favorecidas por los extremos lipofílicos de los ácidos lipoteicoicos de la membrana celular, lo que favorece su paso a través de la membrana y provoca una desorganización de los lípidos. Sin embargo, la función protectora de los lipopolisacáridos de la pared celular o las proteínas extrínsecas de la membrana limitan la velocidad de difusión de moléculas hidrófobas como los aceites, lo que provoca una resistencia parcial en las bacterias Gram negativas. Además, la detección del Quorum Sensing puede inhibir la comunicación habitual entre células bacterianas (figura 1). Las variables ambientales, las circunstancias fisicoquímicas y las propiedades de las células bacterianas (Gram positiva, Gram negativa) pueden influir en estos métodos de acción [19].

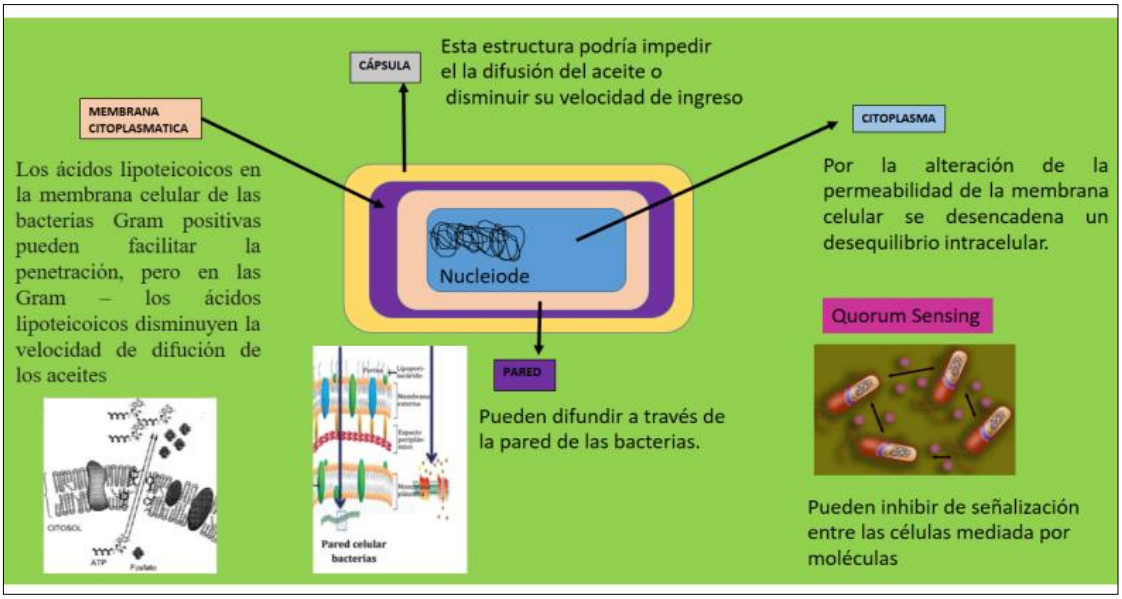


Fig. 1 Mecanismo de acción y sitio diana de los AE. [19]

2.2. Antecedentes

Internacionales

Sgarbossa *et al* (2019) determinaron el efecto en las estaciones y el riego en la estructura química del aceite esencial del cedrón en Brasil. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con un bloque al azar en un esquema factorial 4x4; es decir, que representa las cuatro estaciones del año y cuatro niveles de riego (50%, 75%, 100% y 125%) con cuatro repeticiones. La extracción se realizó con el método: destilación por arrastre de vapor de agua y la estructura química se definió por cromatografía de masas. Los resultados demostraron que la estructura química varió principalmente por el factor estación y los principales componentes fueron el α-citral, el limoneno y β-citral, con sus niveles más altos durante el invierno [20].

Rezig *et al* (2019) determinaron los compuestos químicos, actividad antioxidante y antimicrobiana del AE de *Aloysia triphylla* L recolectadas en cuatro regiones tunecinas: Kairouan, Korba, Siliana y Gabes. La extracción se realizó con el método: destilación por arrastre de vapor de agua utilizando 100 g de muestra aérea en un equipo Clevenger. El mayor rendimiento se obtuvo en la muestra de Korba al 0,56%. El análisis cromatográfico mostró el predominio de aldehídos monoterpénicos las cuales está dominado por el geraniol (24,85% en Gabes y 27,41% en Siliana) y el neral (14,81% en Korba y 18,73% en Gabes). El análisis RP-HPLC del extracto metanólico revelo el predominio del ácido p-cumárico

entre los 15 ácidos fenólicos identificados. La mayor actividad antioxidante mostró el extracto metanólico de la muestra de Kairouan (IC_{50} = 5,78 ± 0,08 ug/mL) y la mayor actividad antibacteriana se observó contra *Bacillus subtilis* (CIP 5265), con una zona de inhibición de 85 ± 7,67 mm para el aceite esencial de Kairouan [21].

Vidal *et al* (2018) extrajeron el AE del cedrón [*Aloysia triphylla* (L´Hér) Britton] y evaluaron sus propiedades antioxidantes en la ciudad de México. Realizaron la extracción mediante la técnica: destilación por arrastre de vapor de agua a dos tiempos diferentes 90 y 120 minutos. Además, experimentaron con lotes de 30, 50 y 70 gramos. Para evaluar la actividad antioxidante en relación con el ácido ascórbico se utilizaron dos técnicas de decoloración por radicales 2,2-difenil-1-picrilhidral (DPPH*) y el ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS*). En conclusión, se demostró la mayor extracción utilizando una muestra promedio de 60 gramos por 120 minutos. En cuanto a la actividad antioxidante, se encontraron 800 y 1000 mg de aceite esencial/L en las soluciones metanólicas; se trata de una cifra muy significativa que indica que la muestra tiene un alto nivel de actividad antioxidante [22].

La actividad antibacteriana y la composición química del AE de *Aloysia triphylla* (L´Hér) Britton contra las infecciones génito – urinarias en Venezuela fueron determinadas por Rojas *et al*. (2010). Utilizaron un kilogramo de hojas frescas recolectadas en la ciudad de Cacute. Se utilizó la destilación por arrastre de vapor de agua para extraer el aceite esencial, que luego se examinó mediante cromatografía de gases y CG/EM. Se encontraron 22 compuestos, los de mayor porcentaje representaron el geranial (27,3%), el neral (22,5%), el geraniol (6,2%), el bicyclogermacrene (5,2%) y el nerol (4,9%). La actividad antibacteriana contra la vaginosis y las infecciones del tracto urinario fueron evaluados con el análisis de difusión en agar. En conclusión, una dosis de 20 ug/mL y una CMI que oscilaba entre 10 y 60 ug/mL prevalecieron en el 52% del total de microorganismos. Se demostró que el aceite es una fuente importante de compuestos con potentes propiedades antibacterianas [23].

Nacionales

Huerta, J. (2021) descubrió que el aceite esencial del cedrón contiene propiedades antibacterianas que pueden ayudar a controlar la halitosis. Se recogieron muestras de la zona de Mancos y de la ciudad de Huaraz, para la extracción se usó la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua. Se analizaron los compuestos químicos mediante CG/EM y se elaboró un enjuague bucal utilizando el aceite esencial en tres dosis distintas para combatir a *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. En todo el proceso de extracción se alcanzó un rendimiento de 0,11% y se descubrieron 17 compuestos, siendo α y β – citral los de mayor proporción. En la formulación de enjuague bucal al 1,0%, se detectaron microbiológicamente halos más grandes que median en promedio 12,1 mm para *Streptococcus mutans* y 14,0 mm para *Porphyromonas gingivalis*. Cuando el aceite esencial se concentró al 1,0%, superó a clorhexidina al 0,05% en términos de actividad antibacteriana contra los dos microorganismos [24].

La gran cantidad de compuestos presentes en el AE del cedrón (*Aloysia triphylla*) procedente de Tarma del departamento de Junín fueron identificados por Bardales *et al.* (2018) mediante CG/EM. Tres criterios fueron considerados como parte integral del aparato de extracción a vapor que se utilizó para extraer el aceite esencial en conjunto con agua desionizada como solvente. Estas variables fueron la sustancia, el peso de la sustancia y las dimensiones de las partículas. Los análisis cromatográficos arrojaron 15 componentes volátiles, siendo los de mayor porcentaje el geranial (20,70%), el neral (18,53%) y el limoneno (26,41%). De los análisis fisicoquímicos realizados se obtuvieron los siguientes resultados: densidad 0,87 g/cc, índice de refracción 1,48, índice de acidez 1,08 mgKOH/g de aceite, índice de yodo 0,95 g de yodo por 100 g de muestra [25].

En el distrito de Quequeña-Arequipa, García, J. (2017) identificó y extrajo el AE del cedrón (*Aloysia triphylla*). La materia prima se sometió primero a una caracterización fisicoquímica. A continuación, se extrajo el AE utilizando fluidos supercríticos y destilación por arrastre de vapor. Por último, se utilizaron la

CG/EM para identificar los constituyentes químicos. Según los resultados, en las hojas se alcanzó una mejor tasa de extracción del 37,9%; el método de fluidos supercríticos produjo el mejor rendimiento medio; y cuando se identificaron los constituyentes, el citronelal, el neral, el geranial, el citronelol y el limoneno fueron los componentes más representativos [26].

Los extractos etanólicos de hierbaluisa, romero, menta piperita, verdolaga y diente de león fueron sometidos a pruebas de actividad antibacteriana *in vitro* contra *Salmonella enteriditis, Staphylococcus aureus y E. coli* por Reaño CK (2014). Se utilizaron hojas de diversas muestras que fueron recolectadas en Trujillo La Libertad. Para esta investigación se utilizaron como controles positivos 30 ug de azitromicina y 10 ug de cloranfenicol. De los resultados se encontró que los extractos de verdolaga y diente de león no tuvieron actividad antibacteriana frente a las muestras en estudio (10mg/mL), pero los extractos de *Rosmarinus officinalis, Aloysia triphylla* y *Mentha spicata* si presentaron efecto antibacteriano frente a *St. aureus* y no sobre los demás microorganismos [27].

Aliaga (2013) realizó una investigación para evaluar las propiedades antibacterianas *in vitro* del AE de *Aloysia triphylla P.* "cedrón" procedente de Tacna. Los microbios ensayados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Además de emplear el método de destilación por arrastre de vapor, se evaluó la sensibilidad bacteriana mediante el método de difusión en disco, el método de dilución líquida y el método de difusión en agar. Los resultados indicaron que la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 era de 15,16 mg/mL (casi el quíntuplo del valor anterior) y para *E. coli* ATCC 25922 de 3,70 mg/mL. Los valores de la concentración mínima bactericida (CBM) para *Escherichia coli* y *S. aureus* fueron de 4,18 mg/mL y 16,25 mg/mL respectivamente, lo que supone cuatro veces el valor anterior. Los resultados indican que la actividad antibacteriana del AE derivado de *Aloysia triphylla P*. es moderada cuando se prueba contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pero significativamente más fuerte cuando se prueba contra *Escherichia coli* ATCC 25922 [28].

En el INS del Perú, Rojas *et al*. (2012) evaluaron en ratones el impacto del AE de *Aloysia triphylla* sobre *Trypanosoma cruzi*. En este experimento se utilizaron ratones albinos machos de 22 ± 2 g de peso. Se les alojó por un tiempo de 12h de luz/oscuridad y se les suministró comida y bebida libremente durante una semana antes del experimento. Se recogieron muestras de hojas frescas en Huancayo y se utilizó un aparato clevenger para destilar el aceite al vapor. La terapia más eficaz consistió en comenzar el octavo día después de la infección y administrar 250 mg/kg/día por vía oral de aceite esencial del cedrón. El resultado fue una notable disminución del 85,40% del pico de parasitemia. Se concluyó que los ratones tratados con el aceite respectivo tenían un efecto anti-*Trypanosoma cruzi in vivo* [29].

2.3. Glosario de términos

- ***In vitro:*** se refiere a una contraposición *in vivo*, producido en el laboratorio por métodos experimentales [30].
- ***In vivo:*** se refiere a una contraposición in vitro, producido en un organismo vivo por métodos experimentales [31.]
- **Variable dependiente:** son las que cambian como consecuencia de la actividad de la variable independiente. Constituyen los resultados o impactos que conducen a las conclusiones del estudio [32].
- **Variable independiente:** son las que el investigador manipula a lo largo del proceso de investigación para caracterizar, explicar o cambiar el objeto de investigación. Producen y explican las variaciones de la variable dependiente [32].
- **Escala de McFarland:** se utiliza para medir la turbidez al hacer suspensiones de microorganismos. El ácido sulfúrico se agrega a una solución acuosa de $BaCl_2$ para crear un precipitado de sulfato de bario en suspensión, que es como se fabrican [33].
- **Regresión lineal:** paradigma matemático utilizado para aproximar la relacionan entre variables dependiente e independiente [34].
- **Actividad antioxidante:** capacidad de una sustancia para impedir que las células produzcan radicales libres dañinos mediante la destrucción oxidativa[35].

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle “cedrón” tiene actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro*.

3.2. Variables

- ***Variable dependiente:***

Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro.*

- ***Variable independiente:***

Aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle

3.3. Operacionalización de variables

Se presenta en el Anexo 1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

- Laboratorio del Departamento de Microbiología, Parasitología Básica y Aplicada.
- Laboratorio del Departamento de Farmacología, Bromatología y Toxicología.
- Laboratorio de la Facultad de Química Orgánica.

Coordenadas geográficas: 12°3′20.21″ S, 77°1′24.87″ W

Distrito del Cercado de Lima, Provincia y departamento de Lima

4.2. Diseño de investigación

✓ **Experimental:** se evidencia la manipulación de las variables. Es decir, se utilizaron muestras del AE del cedrón para demostrar su actividad antibacteriana y antioxidante. Se utilizó como grupo control al ciprofloxacino.

✓ **Analítico:** la investigación fue de carácter analítico, ya que su objetivo era evaluar la posible correlación entre las distintas cantidades de aceite esencial de cedrón y sus propiedades antibacterianas y antioxidantes.

✓ **Transversal:** el hecho de que los resultados de los métodos experimentales se hayan obtenido en un período determinado hace que la investigación sea transversal.

4.3. Población y muestra

En el estudio realizado no se aplica el concepto de POBLACIÓN. La muestra está formada por hojas de *Aloysia triphylla* Royle “cedrón” de origen peruano procedente del distrito de Aucará, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho (figura 15 y 16). Ubicado a 3231 msnm con una latitud: 14º16’52” y una longitud: 73º58’29”, cuyos periodos de cosecha oscilan entre los meses de enero-marzo.

4.4. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección

4.4.1. Recolección de la muestra de investigación

Se recolectó 15kg de *Aloysia triphylla* Royle “Cedrón” en el distrito de Aucará ubicado a 3231 msnm, entre enero – marzo del 2022 (figura 17). La especie es

conocida por los pobladores en la medicina tradicional, razón por la cual se seleccionó esta localidad.

Las muestras de plantas se organizaron en pliegues de papel periódico, se etiquetaron y se enviaron por vía terrestre en recipientes sellados para evitar la humedad y la contaminación, de acuerdo con las directrices para la recogida, recolección y envío de muestras de plantas [36].

4.4.2. Acondicionamiento de la muestra

En el Laboratorio de Farmacología, Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, se acondicionó y estabilizó la muestra obtenida (figura 18).

Las partes aéreas de la muestra en excelente estado de preservación se secaron a temperatura ambiente.

4.4.3. Clasificación taxonómica

La especie *Aloysia triphylla* Royle fue identificado por la Dra. Joaquina Albán Castillo del Museo de Historia Natural. (anexo 2)

4.4.4. Extracción del AE

Se desarrolló por el método de destilación por arrastre de vapor de agua en base a 10 kg de partes aéreas seleccionadas por un periodo de dos horas en un aparato de destilación tipo Clevenger. Tras decantar, se añadieron miligramos de sulfato anhidro (Na_2SO_4) para eliminar cualquier resto de agua. Después, se conservó a 4°C en un vial ámbar hasta su uso posterior (figura 19) [37].

4.4.5. Rendimiento del AE

En base a la cantidad del AE obtenido en el proceso anterior, se utilizó la técnica gravimétrica – volumétrico para calcular el % R_{AE}. La probeta graduada de 100 mililitros es utilizada para medir el volumen [4,37].

$$\%\ R_{AE} = \frac{Vol._{AE}\ (mL)}{P_{muestra}\ (g)} \times 100$$

Donde:

Vol. $_{AE}$**:** Volumen del aceite esencial en mL

P $_{muestra}$**:** Peso del aceite esencial obtenido en gramos

% R $_{AE}$ **:** Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

4.4.6. Análisis fisicoquímico del AE

Basándose en el examen visual, la solubilidad y la densidad, se realizó un estudio organoléptico del AE de acuerdo con el Método I en la USP 38 <841> [38].

4.4.7. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) para el análisis químico del AE

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado y un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C. Se utilizaron 980 µL de diclorometano para disolver 20 µL de la muestra de AE.

Es utilizado una columna capilar apolar DB-5MS (60 m x 250 µm x 0,25 µm) (J&W de fenilmetilpolisiloxano al 5%) para separar las sustancias químicas de la mezcla. Se utilizó la inyección en modo Split (20:1) y la T° del inyector se mantuvo a 250 °C.

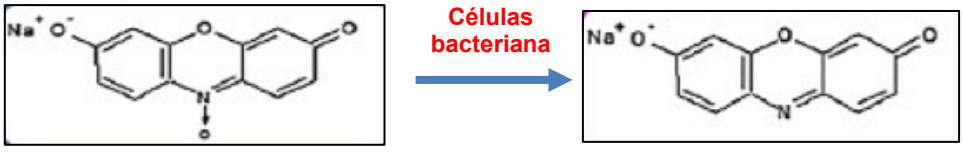
El horno se inició con una temperatura de 50 °C. Posteriormente, se incrementó en 2,5 °C cada minuto hasta alcanzar los 180 °C, en 10 °C cada minuto hasta alcanzar los 200 °C y en 20 °C cada minuto hasta alcanzar los 240 °C. Se utilizó helio como gas de extracción durante los 56 minutos que duró la prueba, con un volumen constante de 1 mL/min [37].

4.4.8. Evaluación de la actividad antibacteriana

4.4.8.1. Utilización de la técnica de microdilución colorimétrica en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

4.4.8.1.1. Fundamento

Se rige en la concentración antibiótica más baja que impide el crecimiento de la cepa bacteriana en específico (figura 2). La falta de desarrollo en los pocillos sirve como evidencia utilizando la resazurina [39].



Resazurina no fluorescente (azul-púrpura) **Resofurina fluorescente (rosa-incoloro)**

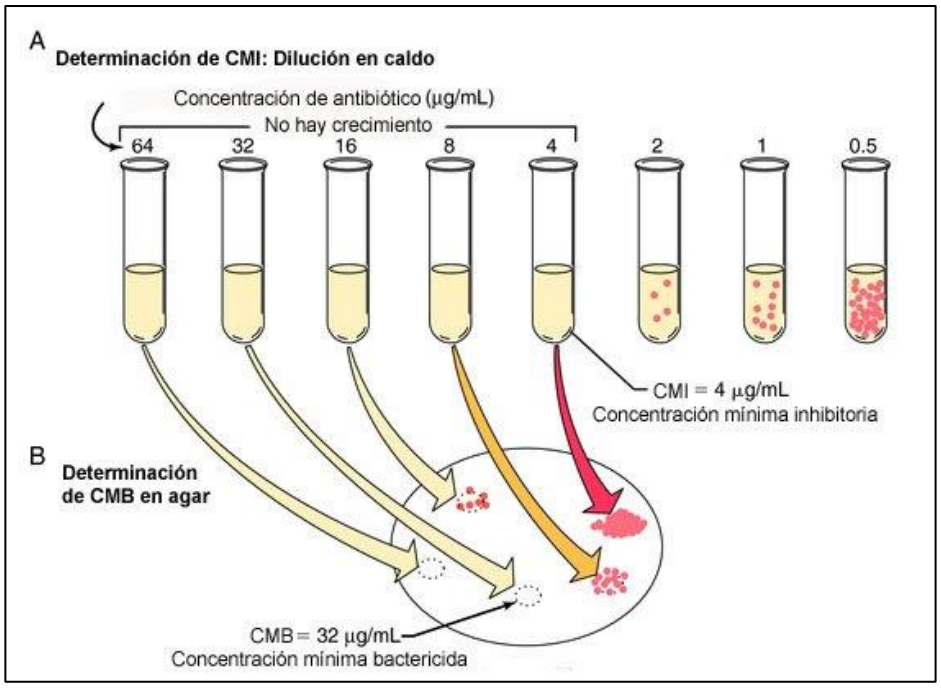


Fig. 2 Prueba de la microdilución cuantitativa y control para determinar la CMI [38].

4.4.8.1.2. Los microorganismos de la investigación

En la prueba se emplearon los siguientes microorganismos: *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC663 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.4.8.1.3. Elaboración de la muestra

La muestra madre para la microdilución en caldo se realizó diluyendo mililitros (mL) del AE de cedrón en caldo Mueller Hinton. En consecuencia, se produjeron diez diluciones finales “doblemente concentradas”.

4.4.8.1.4. Elaboración del control positivo

El ciprofloxacino es el control positivo de la prueba. De acuerdo con las directrices del CLSI se preparó a 6400 ug/mL y se solubilizó en agua. Se utilizó el caldo Mueller Hinton con resazurina como control de esterilidad, y la concentración final varió entre 0,12 – 64 ug/mL. Se utilizó caldo Mueller Hinton para las ultimas diluciones dobles finales (tabla 1) [37].

Tabla 1. Diluciones dobles finales del ciprofloxacino.

	Paso	CMH	Conc.$_{2x}$ (µg/mL)
D $_1$	1 mL stock	4 mL	128
D $_2$	D $_1$ 0,8 mL	0,8 mL	64
D $_3$	D $_1$ 0,5 mL	1,5 mL	32
D $_4$	D $_1$ 0,5 mL	3,5 mL	16
D $_5$	D $_4$ 0,8 mL	0,8 mL	8
D $_6$	D $_4$ 0,5 mL	1,5 mL	4
D $_7$	D $_4$ 0,5 mL	3,5 mL	2
D $_8$	D $_7$ 0,8 mL	0,8 mL	1
D $_9$	D $_7$ 0,5 mL	1,5 mL	0,5
D $_{10}$	D $_7$ 0,5 mL	3,5 mL	0,25

4.4.8.1.5. Preparación del inóculo

Los microorganismos se diseminaron en Agar TSA y es cultivado a 37 °C durante 24 horas antes de la prueba. Las bacterias se suspendieron en solución salina al 0,9% el día de la prueba, y la turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó de acuerdo con el tubo de 0,5 de McFarland (1-2 x 10^8 UFC/mL) [4,42]. Con el agitador vórtex MX-S se mezcló los componentes líquidos en el tubo utilizando un movimiento orbital y con el Densitómetro DEN-1B se ajustó la turbidez recomendada (figura 20 y 21).

Asimismo, se obtuvo un inóculo de 1-5 x 10^5 UFC/mL (inóculo 2x) haciendo una dilución doble con caldo Mueller Hinton a 1:30 y 1:50 [40].

En el ensayo de microdilución, se añadieron 0,03 mL de solución de resazurina a cada 6 mL de la suspensión de inóculo 2x [41].

4.4.8.1.6. Metodología de ensayo

Se consideraron microplacas estériles de 96 pocillos. La configuración de la bandeja de microdilución se ilustra en la tabla 2 y tabla 3.

En los pocillos es colocado 100 µL de dilución 2x de la muestra o control respectivo y posteriormente es agregado 100 µL del inoculo 2x que ya contenía la solución de resazurina. Tras el etiquetado, se incubaron durante 24 horas a 37°C [37,42].

Tabla 2. Esquema de microdilución colorimétrica de las bacterias Gram positivas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	*Staphylococcus aureus*
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	*Bacillus subtilis*
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	

Tabla 3. Esquema de microdilución colorimétrica de las bacterias Gram negativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	*Escherichia coli*
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	*Pseudomonas aeruginosa*
AE	CE	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	
CIP	CE	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	CC	

Dónde:

CE: Control de esterilidad

CC: Control de crecimiento

AE: Aceite esencial

CIP: Ciprofloxacino

4.4.8.1.7. Lectura de la CMI

La diferencia de tonalidad de púrpura a rosa o incoloro es considerada como resultado favorable. El valor de CMI corresponde a la concentración más baja donde no vira de color.

Cada prueba es realizada tres veces, lo que da lugar a una media de los tres resultados que se reporta como valor CMI [42].

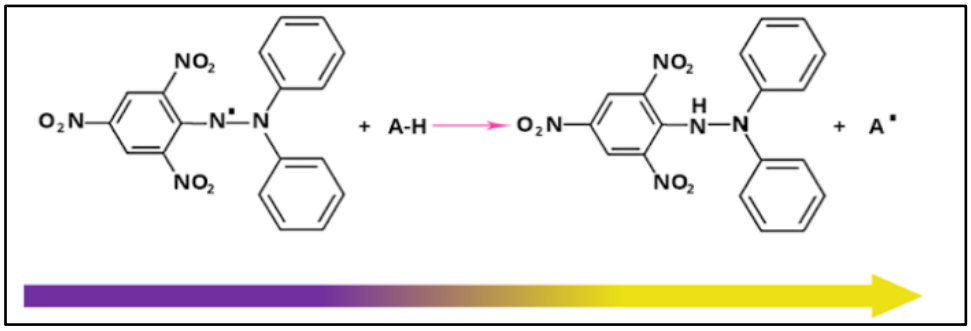
4.4.9. Actividad antioxidante

4.4.9.1. La técnica de captación del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

4.4.9.1.1. Fundamento del método.

Se fundamenta en la combinación de una solución violeta de DPPH con un sustrato AH que da un átomo de H para generar la forma reducida, lo que hace que el color se vuelva amarillo pálido (figura 3).

La deslocalización del electrón que sobra en la molécula 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo lo caracteriza por ser un radical libre estable. El color violeta vivo se debe a la deslocalización del electrón, dado por una banda de absorción de 517 nm aproximadamente [43,44].



Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) Violeta — Diphenylpicrylhydrazine (nonradical) Amarillo

Fig. 3 Reacción entre el radical DPPH y el sustrato (AH) [4,43].

Se usa al Trolox® como referencia (figura 4), los resultados son expresados como IC_{50}.

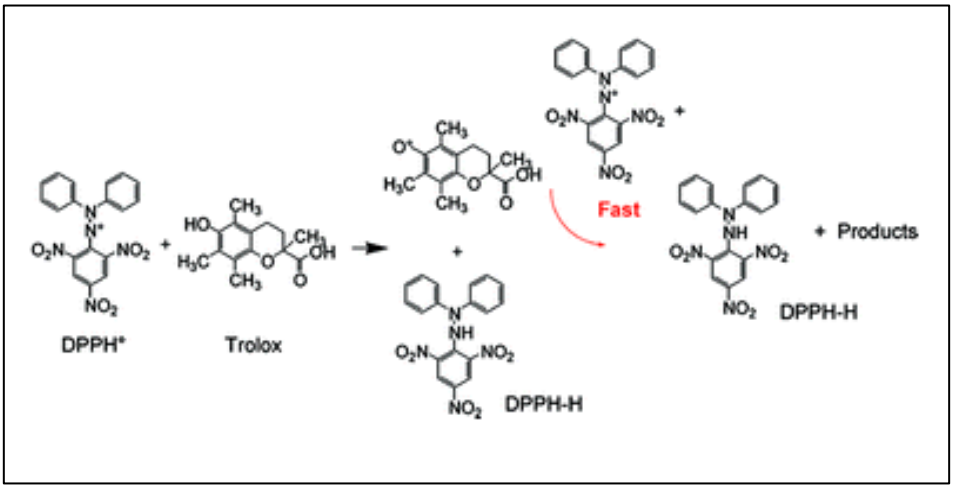


Fig. 4 Reacción entre el radical DPPH y Trolox® [45].

4.4.9.1.2. Metodología

Los pasos que seguir se especifican en la figura 5.

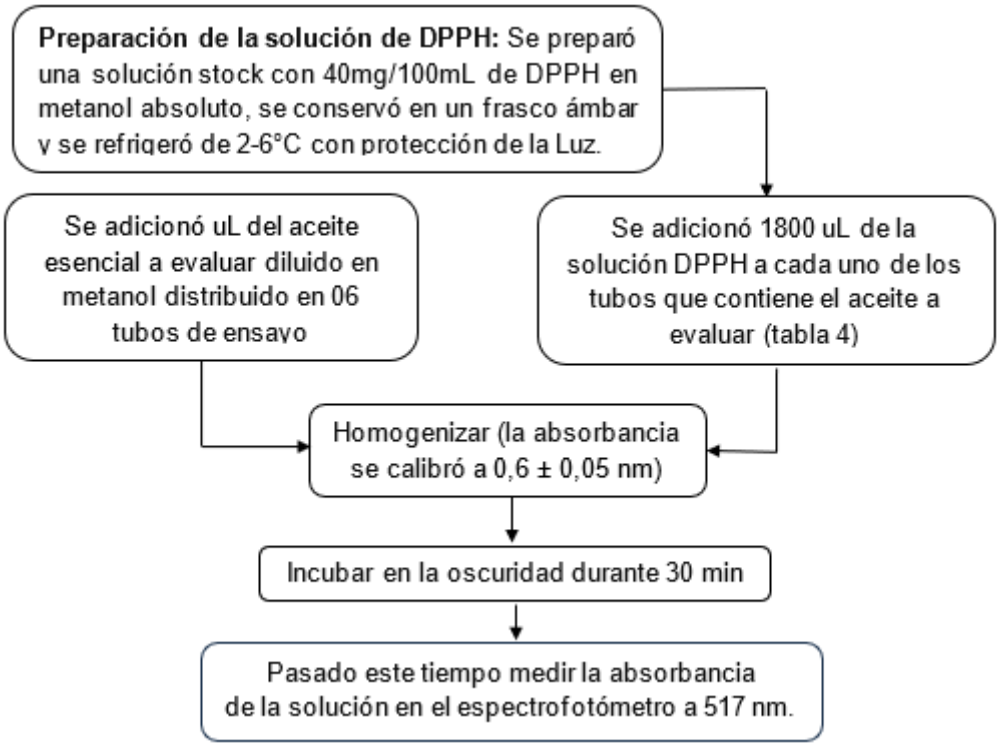


Fig. 5 Diagrama de flujo de la capacidad antioxidante - DPPH del AE

Tabla 4. Cálculo de la absorbancia y concentración final en ug/mL del AE – DPPH

	DPPH (uL)	uL de aceite	Absorbancia	Concentración final ug/mL
Tubo 1	1800	200 (Tubo 0)	0,12 ± 0,02	11625,00
Tubo 2	1800	200 (Tubo 1)	0,35 ± 0,04	5812,50
Tubo 3	1800	200 (Tubo 2)	0,49 ± 0,05	2906,25
Tubo 4	1800	200 (Tubo 3)	0,57 ± 0.01	1453,13
tubo 5	1800	se añadió metanol 200 uL	0,62 ± 0,04	0

La IC_{50} se calculó con la gráfica de la absorbancia con la concentración, asimismo, neutraliza el 50% de radicales libres del DPPH, determinada mediante regresión lineal [44].

De igual manera procedió con Trolox®. En la tabla 5 se indica el cálculo de la concentración final en µg/mL para evaluar la actividad antioxidante por el método DPPH y la especie antioxidante Trolox®.

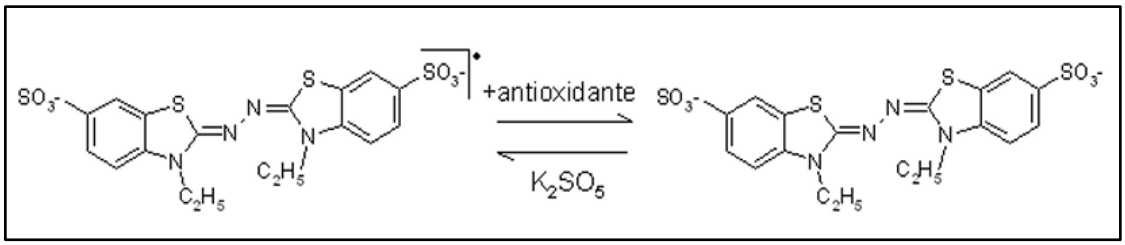
Tabla 5. Cálculo de la absorbancia y concentración final en µg/mL de Trolox® - DPPH

	DPPH (uL)	Dilución de la Batería 1	Absorbancia	Concentración final ug/mL
Tubo 0	1800	200 (Tubo 1)	0,52 ± 0,01	1,2
Tubo 1	1800	200 (Tubo 2)	0,45 ± 0,04	2,4
Tubo 2	1800	200 (Tubo 3)	0,22 ± 0,02	4,8
Tubo 3	1800	200 (Tubo 4)	0,04 ± 0,01	7,2
tubo 4	1800	metanol 200	0,63 ± 0,02	0

4.4.9.2. Técnica del radical 2,2′-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS+).

4.4.9.2.1. Fundamento del método.

Se basa en la generación de ABTS (una molécula cromófora estable y muy soluble en agua) que al reaccionar con el persulfato de potasio da un color azul verdoso. La absorción máxima del persulfato de potasio es de 645, 734 y 815 nm. Cuando se añade un antioxidante, se genera la pérdida de color del medio al reducir ABTS+ a ABTS (figura 6) [43].



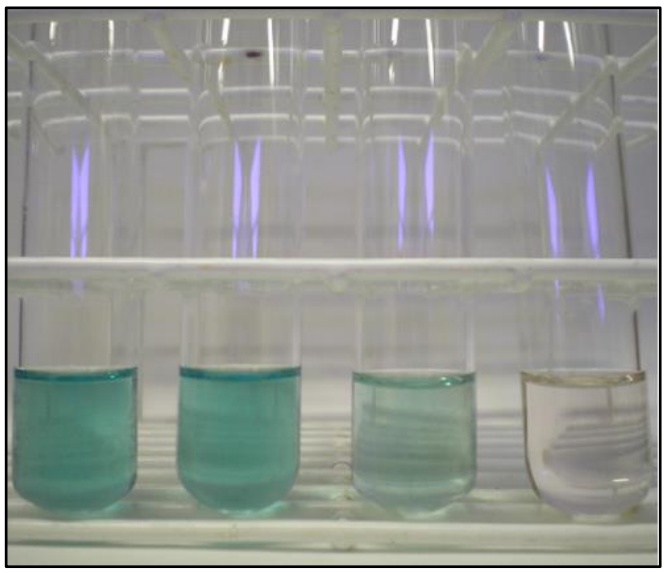


Fig. 6 Método de eliminación de radicales ABTS para determinar la capacidad antioxidante [43]

4.4.9.2.2. Metodología

Los pasos que seguir se especifican en la figura 7.

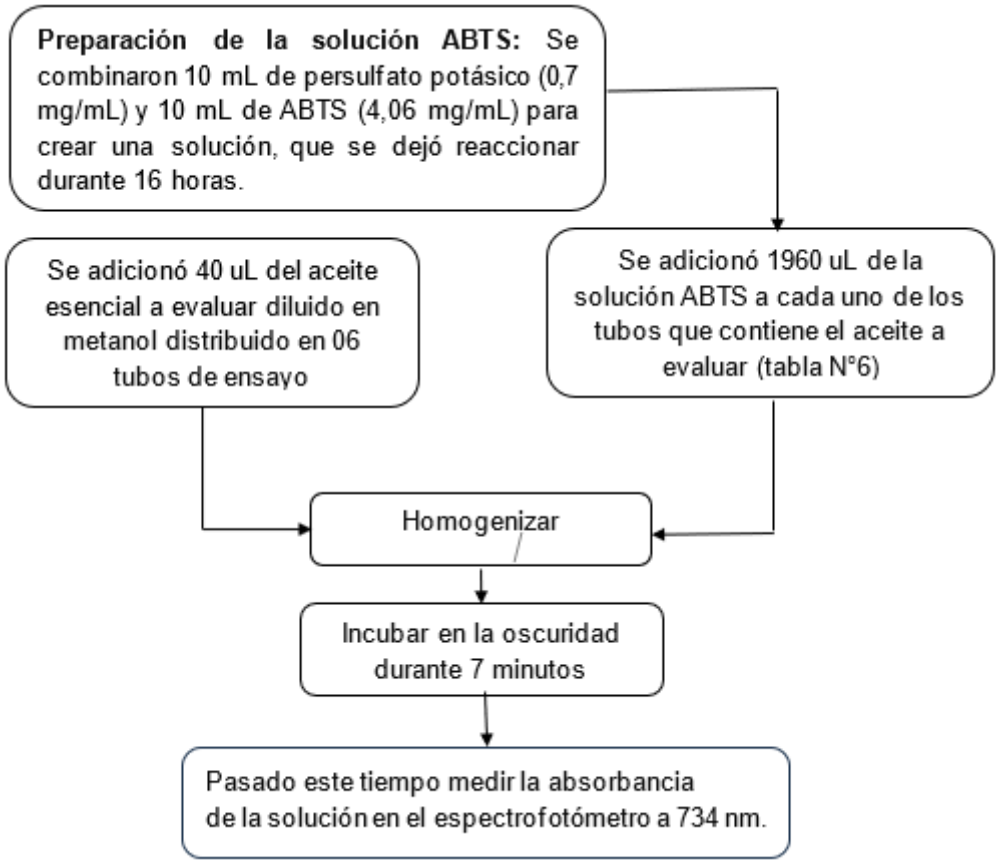


Fig. 7 Diagrama de flujo de la capacidad antioxidante - ABTS del AE

Tabla 6. Cálculo de la absorbancia y concentración final en µg/mL del AE por el método ABTS.

	ABTS (uL)	uL de aceite	Absorbancia	Concentración final ug/mL
Tubo 1	1960	40 (Tubo 0)	0,045 ± 0,002	9299
Tubo 2	1960	40 (Tubo 1)	0,345 ± 0,04	4649,5
Tubo 3	1960	40 (Tubo 2)	0,485 ± 0,04	2324,75
Tubo 4	1960	40 (Tubo 3)	0,586 ± 0,03	1162,375
Tubo 5	1960	40 (Tubo 4)	0,632 ± 0,01	581,1875
Tubo 6	1960	40 (Tubo 5)	0,682 ± 0,02	290,59375
Tubo 7	1960	se añadió metanol 40 uL	0,712 ± 0,01	0

Se aplicó el mismo proceso utilizando el estándar Trolox a 250 µg/mL o 1mM (tabla 7 y 8). La absorbancia se interpretó a 0,7 ± 0,02 con una longitud de onda

de 734 nm, con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente expresión:

$$\%\text{Inhibición} = \frac{(\text{Abs.}_{\text{DPPH}} - \text{Abs.}_{\text{muestra}})}{\text{Abs.}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

El método de regresión lineal es usado para calcular la concentración inhibitoria media (IC_{50}), basado en la concentración del aceite esencial [44].

Tabla 7. Preparación del estándar antioxidante Trolox® por el método ABTS

Tubo	250 µg/mL	H2O	Volumen total (2mL)	Tubo (µg/mL)
1	400	1600	2	50
2	600	1400	2	75
3	800	1200	2	100
4	1000	1000	2	125
5	1200	800	2	150

Tabla 8. Tubos de reacción para el método ABTS.

µL	Tubo ref.	Trolox	aceite
metanol	40	-	-
trolox	-	40	-
aceite	-	-	40
ABTS	1960	1960	1960

V.RESULTADOS

5.1. Análisis fisicoquímico del aceite esencial

La tabla 9 indica los resultados de las características organolépticas, densidad y rendimiento del AE en estudio.

Tabla 9. Propiedades físicas y fisicoquímicas del AE del cedrón.

Aceite esencial del cedrón	
Aspecto	liquido oleoso
Color	amarillo claro
Olor	aromático intenso
Sabor	característico
Solubilidad	metanol
Densidad (25°C)	0,93 g/mL
Índice de Refracción	1,48
Rendimiento	0,75%

5.2. Composición química del AE por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM)

En la figura 8 se muestra el perfil cromatográfico del AE del cedrón. Se reconocieron 49 componentes el cual representa el 100% del total [37].

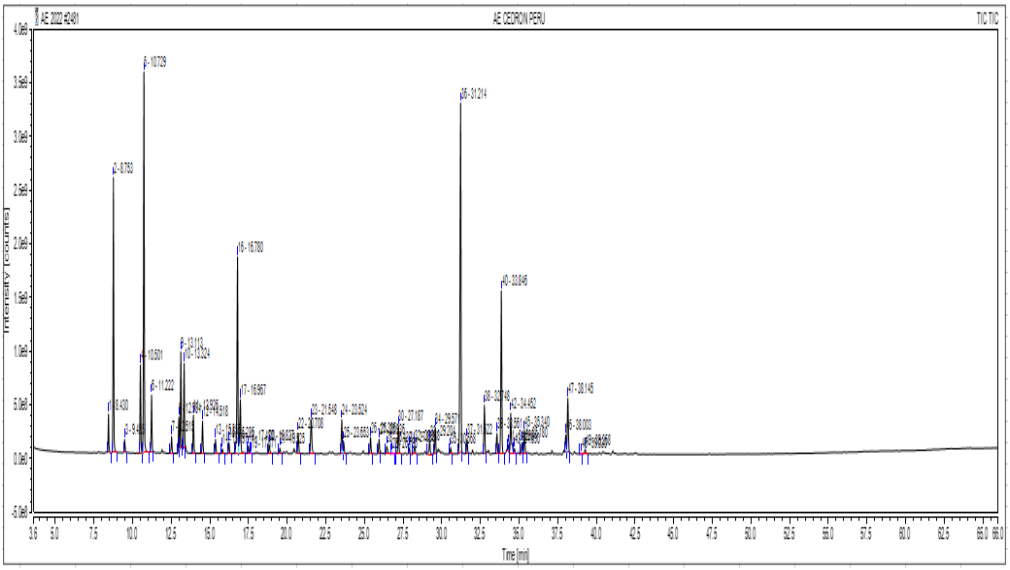
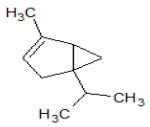
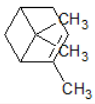
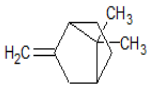
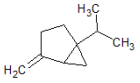
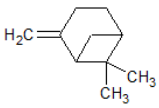
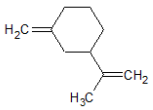
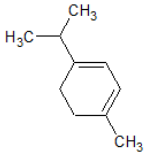
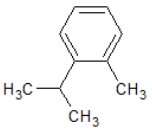
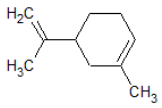
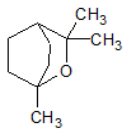
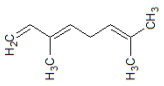
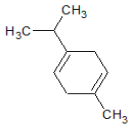
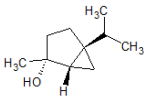
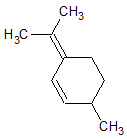
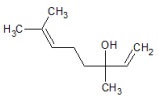
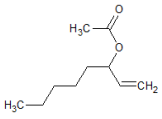
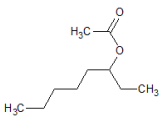
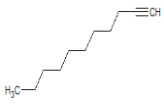


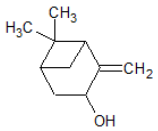
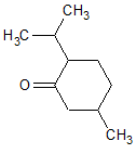
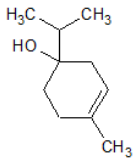
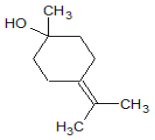
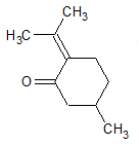
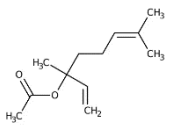
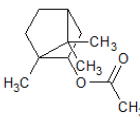
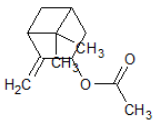
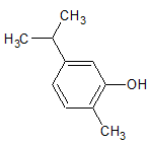
Fig. 8 Cromatograma de gases de los componentes orgánicos volátiles del cedrón.

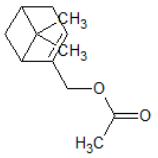
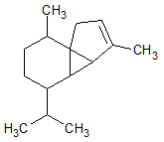
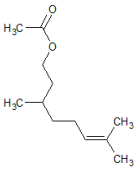
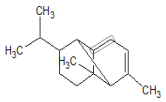
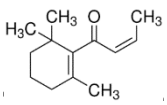
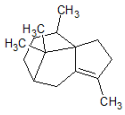
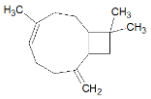
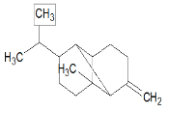
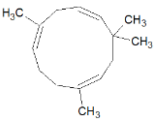
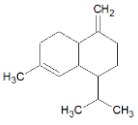
La tabla 10 muestra los componentes químicos volátiles del cedrón. Se identificó la presencia de (E)-Cariofileno como componente principal con un 16,01%, seguido del β – Pineno (14,19%) y α – Pineno (9,11%). Se reportaron 5 compuestos no identificados.

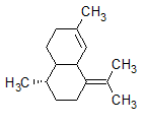
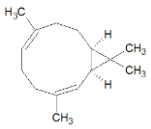
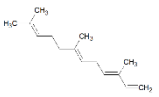
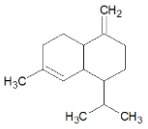
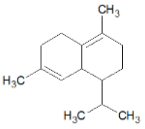
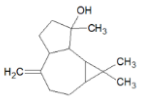
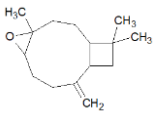
Tabla 10. Cromatograma de gases de los compuestos orgánicos volátiles del cedrón.

#	Compuesto	LRI $_{Exp.}$	LRI $_{Cal.}$	%	Formula molecular/ Masa molecular	Estructura Química	Grupo Químico
1	α -Tuyeno	928	924	1,21	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
2	α - Pineno	935	932	9,11	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
3	α – Fencheno	953	945	0,45	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
4	Sabineno	977	969	3,12	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
5	β - Pineno	983	974	14,19	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
6	ρ - Menta-1(7),8-dieno	994	1003	2,04	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
7	α - Terpineno	1022	1014	0,69	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
8	o - Cimeno	1032	1022	1,23	$C_{10}H_{14}$/134.22		Hidrocarburo monoterpénico aromático

9	Silvestreno	1035	1025	3,28	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
10	1,8 - Cineol	1039	1026	3,00	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Monoterpeno oxigenado
11	(E)-β - Ocimeno	1052	1044	1,39	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
12	γ - Terpineno	1064	1054	1,22	$C_{10}H_{16}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
13	Hidrato de cis – sabineno (IPP frente a OH)	1082	1065	0,61	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Monoterpeno oxigenado
14	ρ - Menta-2,4(8)-dieno	1091	1085	0,23	$C_{10}H_{18}$/136.23		Hidrocarburo monoterpénico
15	N.I	1095	-	0,47	-		
16	Linalol	1102	1096	8,47	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Monoterpeno oxigenado
17	Acetato de 1 – octen – 3 – ilo	1116	1110	2,70	$C_{10}H_{18}O_2$/170.25		Éster
18	3 – Octanol, acetato	1126	1120	0,29	$C_{10}H_{20}O_2$/172.26		Éster
19	1 - Undecino	1130	1125	0,04	$C_{11}H_{20}$/152.28		Compuesto acetilénico terminal

20	Trans-pinocarveol	1136	1135	0,49	$C_{10}H_{16}O$/152.23		Monoterpeno oxigenado
21	Isomentona	1159	1158	0,28	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Acetona alicíclica
22	Terpinen-4-ol	1184	1174	0,88	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Monoterpeno oxigenado
23	γ - Terpineol	1212	1199	1,96	$C_{10}H_{18}O$/154.25		Monoterpeno oxigenado
24	Pulegona	1254	1233	1,50	$C_{10}H_{16}O$/152.23		Monoterpeno oxigenado
25	Acetato de linalol	1257	1254	0,50	$C_{12}H_{20}O_2$/196.29		Monoterpeno oxigenado
26	Acetato de isobornilo	1294	1285	0,71	$C_{12}H_{20}O_2$/196.29		Monoterpeno oxigenado
27	Trans – acetato de pinocarvil	1306	1298	0,56	$C_{12}H_{18}O_2$/194.27		Monoterpeno oxigenado
28	Carvacrol	1318	1299	0,57	$C_{10}H_{14}O$/150.22		Hidrocarburo monoterpénico aromático

29	N.I	1326	-	0,09	-		
30	Acetato de mirtenilo	1335	1324	1,28	$C_{12}H_{18}O_2$/194.27		Monoterpeno oxigenado
31	α - Cubebeno	1351	1348	0,28	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
32	Acetato de citronelilo	1359	1350	0,46	$C_{12}H_{22}O_2$/198.30		Monoterpeno oxigenado
33	α - Illangeno	1381	1373	0,67	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
34	(Z)-β-Damascona	1386	1376	1,08	$C_{13}H_{20}O$/192.30		Monoterpeno oxigenado
35	Cipereno	1412	1398	0,29	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
36	(E)-Cariofileno	1427	1417	16,01	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
37	β - Copaeno	1437	1430	0,64	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
38	α - Humeleno	1464	1452	2,08	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
39	γ - Muuroleno	1483	1478	0,86	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico

40	Amorfo-4,7(11)-dieno	1489	1479	7,28	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo monoterpénico
41	N.I	1500	-	0,25	-		
42	Biciclogermacreno	1504	1500	2,20	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
43	(E,E)-α-Farneseno	1510	1505	0,19	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo sesquiterpénico
44	γ - Cadideno	1523	1513	0,48	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburos sesquiterpénico
45	δ - Cadineno	1527	1522	1,04	$C_{15}H_{24}$/204.35		Hidrocarburo Sesquiterpénico
46	Espatulenol	1584	1577	0,75	$C_{15}H_{24}O$/220.35		Hidrocarburo Sesquiterpeno
47	Oxido de cariofileno	1592	1582	2,51	$C_{15}H_{24}O$/220.35		Hidrocarburo Sesquiterpeno
48	N.I	1620	-	0.04	-		
49	NI	1623	-	0.32	-		

Hidrocarburo monoterpénico	26.53%
Hidrocarburo monoterpénico aromático	4.08%
Monoterpeno oxigenado	26.53%

Hidrocarburo sesquiterpénico	24.49%
No identificados	10.20%
Otros	8.16%
Total, identificado:	**100%**

Donde:

%: se refiere al porcentaje relativo de cada compuesto.

LRI $_{exp}$: es el índice de retención experimental

LRI $_{cal}$: es el índice de retención calculada.

N.I: no identificado.

5.3. Determinación de la actividad antibacteriana.

La tabla 11 y las figuras 9 y 10 indican los resultados de la técnica de microdilución utilizada para calcular la CMI del AE investigado.

Tabla 11. Valores de CMI del AE frente 04 cepas

AE de planta en estudio	**CMI (µg/mL)**			
	Microorganismos			
	Escherichia coli ATCC 25922	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923
Aloysia triphylla Royle "Cedrón"	320 ± 0,58	0 ± 0,00	*5* ± 1,00	80 ± 2,00
Control: ciprofloxacino	0,625 ± 0,01	1,25 ± 0,05	0,625 ± 0,01	1,25 ± 0,05
Prueba de ANOVA de 2 factores	P < 0,0001			
Prueba de comparación múltiple de Sidak	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001

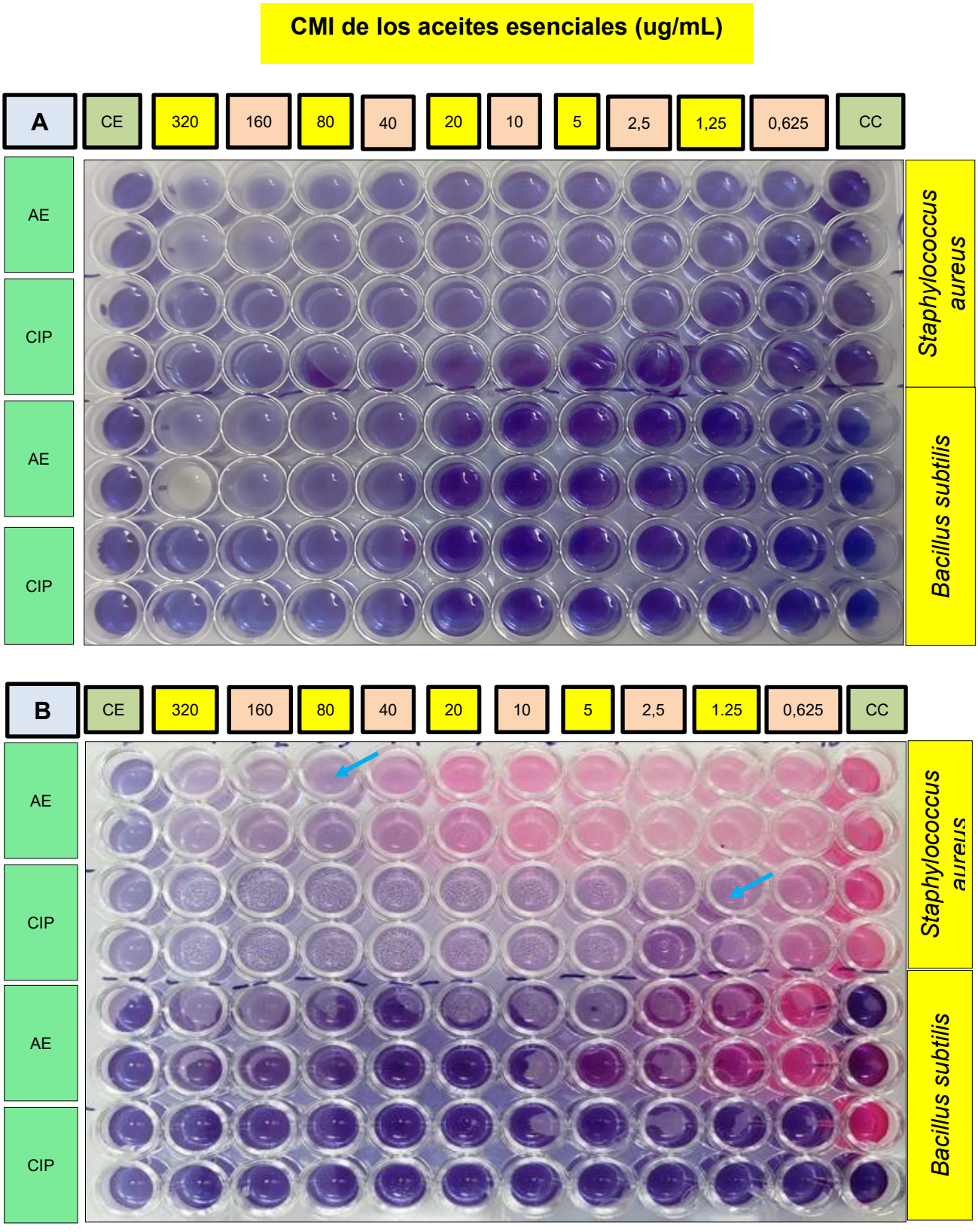


Fig. 9 Calculo de la CMI sobre *S. aureus* y *B. subtilis*

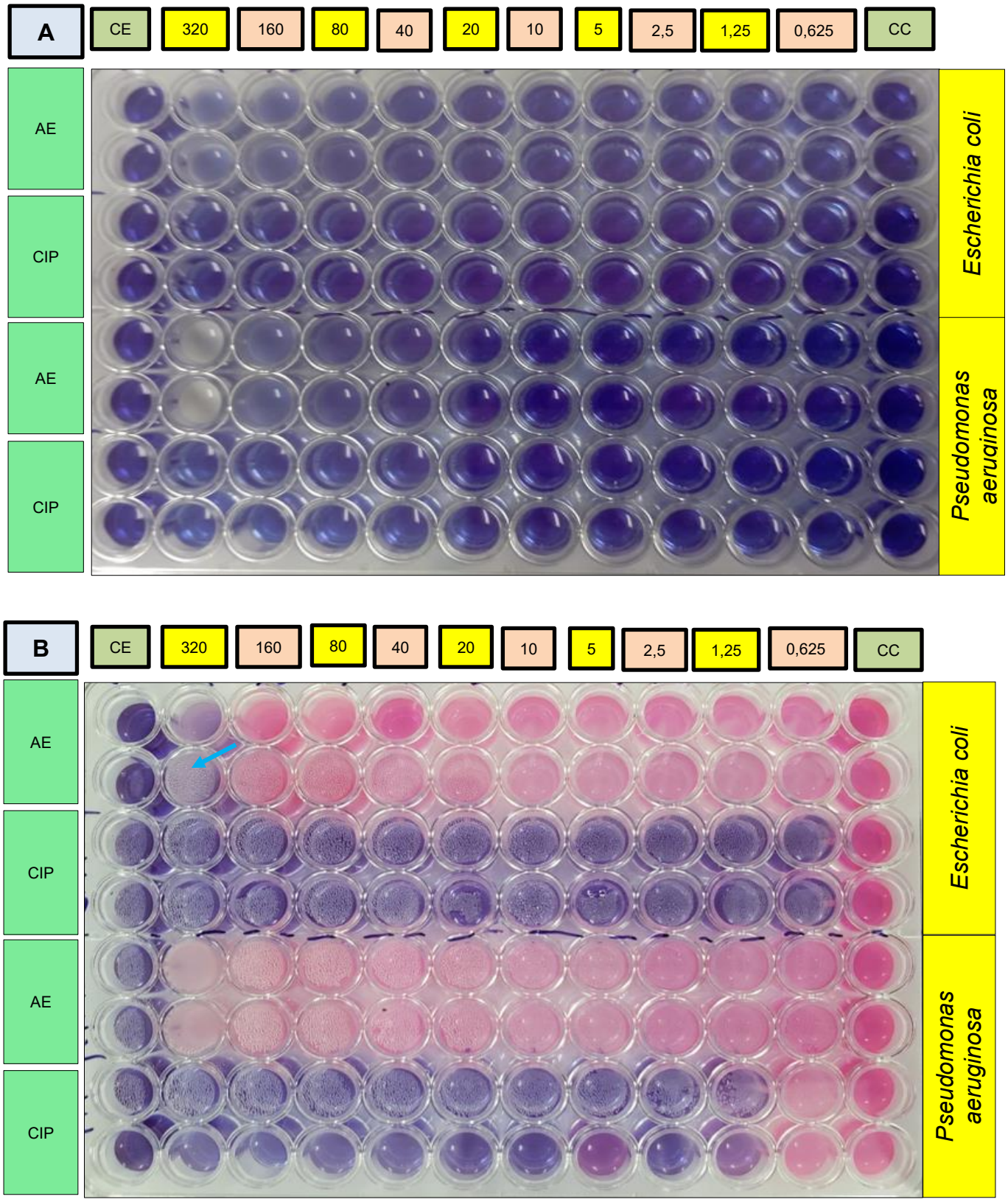


Fig. 10 Cálculo de la CMI frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa.*

Dónde:

A: placa de inicio

B: placa final de la prueba

CE: control de esterilidad.

CC: control de crecimiento.

AE: aceite esencial

CIP: ciprofloxacino

5.3.1. Análisis estadístico de la actividad antibacteriana

Se usó el modelo factorial de Análisis de Varianza (ANOVA) al 95% de confianza, se consideraron significativos valores de $P < 0,0001$ [4]. Cada prueba fue realizada por triplicado y cada resultado se reportó como el valor promedio ± la desviación estándar [21] (Anexo 3).

5.4. Cuantificación de la actividad antioxidante.

5.4.1. Procedimiento de captación del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) del AE de cedrón.

La tabla 12 y figura 11 muestran los resultados:

Tabla 12. Resultados de la concentración vs absorbancia del AE – DPPH

concentración ug/mL (aceite)	Absorbancia ± DE	Porcentaje de actividad antioxidante (%)
11625,00	0,12 ± 0,02	80,16
5812,50	0,35 ± 0,04	43,71
2906,25	0,49 ± 0,05	21,77
1453,13	0,57 ± 0.01	7,90
0	0,62 ± 0,04	0

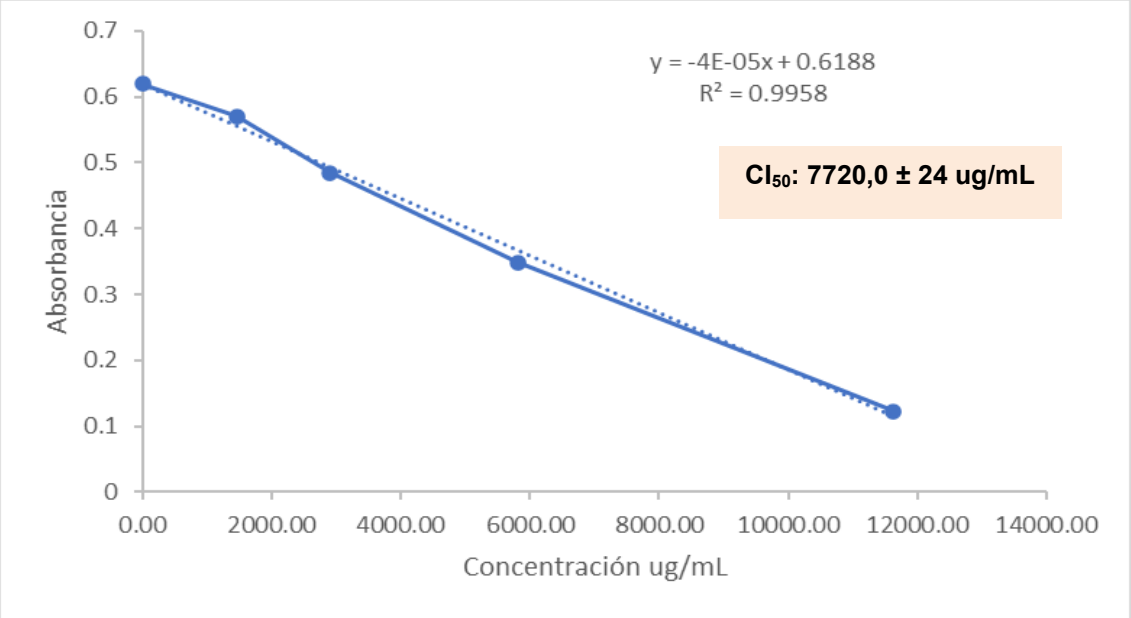


Fig.11 Curva de DPPH del AE del cedrón.

5.4.2. Procedimiento de captación del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de la solución estándar Trolox®.

Los análisis se evidencian en la tabla 13 y figura12.

Tabla 13. Concentración vs absorbancia de Trolox® - DPPH.

concentración ug/mL (Trolox®)	absorbancia ± DE	Porcentaje de actividad antioxidante (%)
0	0,63 ± 0,02	0
1,2	0,52 ± 0,01	17,72
2,4	0,45 ± 0,04	28,48
4,8	0,22 ± 0,02	64,56
7,2	0,04 ± 0,01	93,99

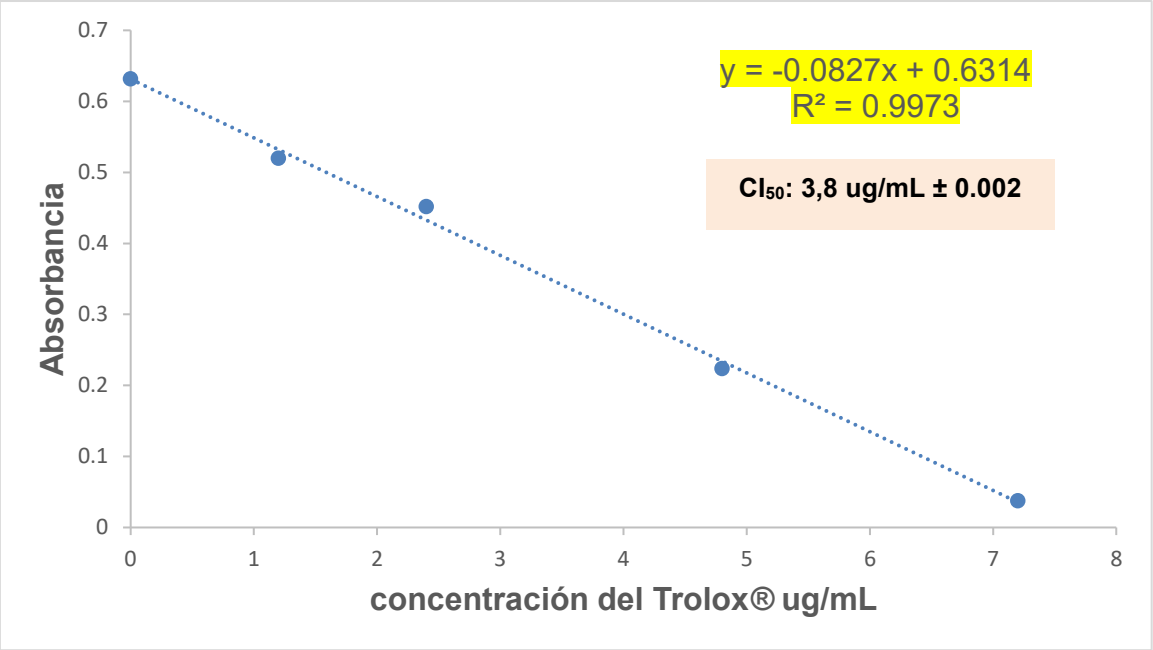


Fig. 12 Curva de calibración equivalente a Trolox® para DPPH.

5.4.3. Procedimiento del radical 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS+) del aceite esencial del cedrón.

La tabla 14 y figura 13 evidencian los resultados:

Tabla 14. Resultados de la concentración vs absorbancia del AE -ABTS.

Concentración	Absorbancia	Porcentaje de inhibición del radical ABTS (%)
9299	0,045 ± 0,002	93,68
4649,5	0,345 ± 0,04	51,54
2324,75	0,485 ± 0,04	31,88
1162,375	0,586 ± 0,03	17,69
581,1875	0,632 ± 0,01	11,24
290,59375	0,682 ± 0,02	4,21
0	0,712 ± 0,01	0,00

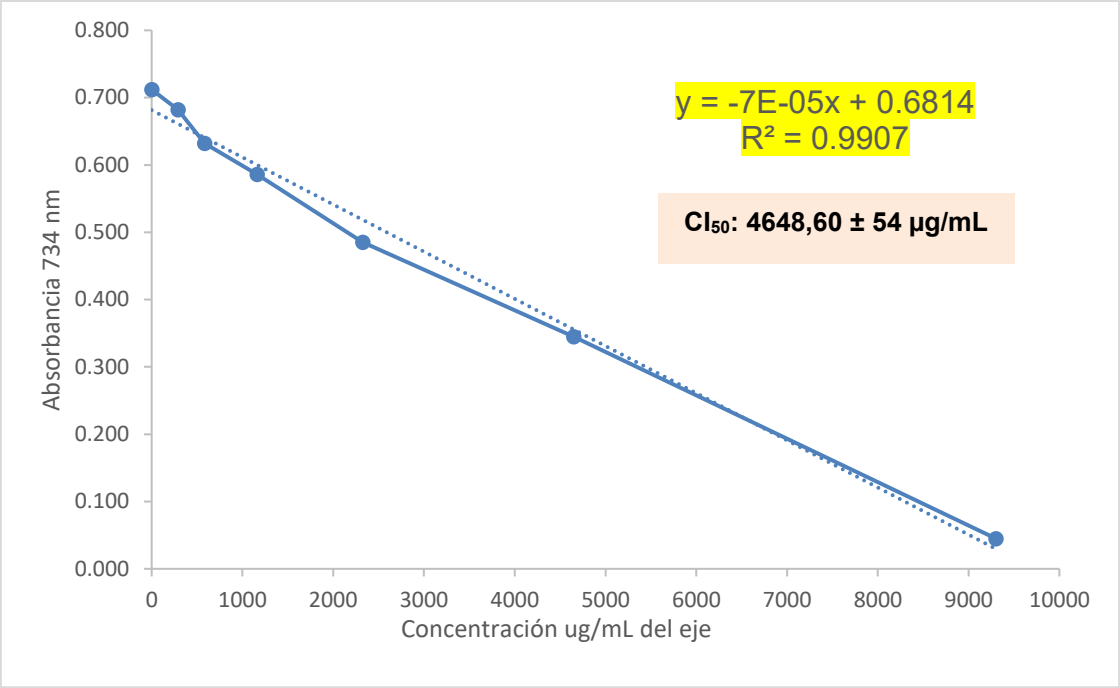


Fig. 13 Curva de captación de ABTS del AE de cedrón.

5.4.4. Procedimiento del radical 2,2′-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS+) de la solución estándar Trolox®.

La tabla 15 y en figura 14 muestran los resultados:

Tabla 15. Concentración vs Absorbancia de Trolox® - ABTS

Tubo	trolox ug/mL	Absorbancia ± DE	porcentaje de inhibición
Blanco	0	0,752 ± 0,02	0
1	1	0,61 ± 0,01	18,88297872
2	1.5	0,545 ± 0,03	27,52659574
3	2	0,416 ± 0,04	44,68085106
4	2.5	0,344 ± 0,02	54,25531915
5	3	0,251 ± 0,04	66,62234043

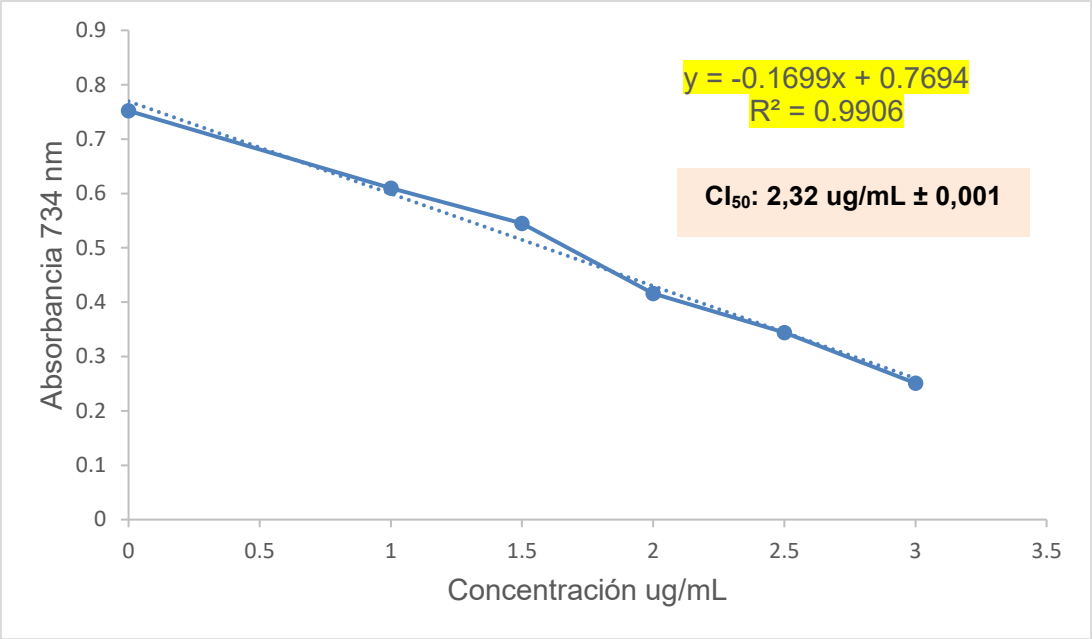


Fig. 14 Curva de calibración equivalente a Trolox® para ABTS.

5.4.5. Análisis estadístico.

Los valores de IC_{50} fueron estimados mediante estadísticas de regresión lineal. Se calculó con coeficiente Rho de Spearman para establecer una correlación entre las concentraciones evaluadas y la respuesta antioxidante [57] (Anexo 4,5,6 y 7).

VI. DISCUSIÓN

La *Aloysia triphylla* Royle "cedrón" es una especie que pertenece al género *Aloysia* y familia Verbenaceae*,* el cual ha sido motivo de estudio fotoquímico y biológico por las numerosas aplicaciones etnobotánicas[18,24].

Se extrajo el aceite esencial del cedrón proveniente del distrito de Aucará, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho por el método de destilación por arrastre de vapor. El análisis fisicoquímico nos dió lugar a conocer las características organolépticas, densidad y rendimiento de la muestra vegetal. De las partes áreas del cedrón se ha obtenido un rendimiento de 0,75%, el cual depende del tiempo de cosecha, factores climatológicos, tipo de suelo, lugar geográfico entre otros [4,26].

Los resultados se asemejan a lo obtenido por Vidal *et al* (2018) el cual muestra un rendimiento cercano a 0,80% cuando se trabajó con una muestra de 70g de materia prima molida en un equipo tipo Clevenger por el método de destilación por arrastre de vapor por un periodo de 120 minutos [22].

Según García J (2017) En la teoría de los aceites esenciales se destaca que estos comparten una característica común: un aroma agradable y fácilmente perceptible para el ser humano, aunque intensamente pronunciado y penetrante, evocando el olor de la planta de la cual provienen. En términos de color, suelen variar en tonalidades de amarillo, aunque en algunos casos pueden ser transparentes. Su sabor es caústico, acre e irritante, y en ocasiones puede ser aromático, dulce y delicado. Por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con las características establecidas en los resultados [26].

El valor de la densidad de la muestra en estudio fue de 0,93g/cm^3, este valor es similar a lo obtenido por García J (2017) en la que se establece que los aceites esenciales varían entre 0,8 y 1,2 g/cm^3. A temperatura ambiente son líquidos menos densos que el agua, pero muy viscosos, el cual al ser menos denso que el agua facilita la separación de fases y comparando con estudios previos se encuentra dentro de los valores permitidos [26].

El índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura y es proporcional a la densidad. La teoría del índice de refracción nos indica el rango

de parámetro para los aceites esenciales de 1,45 – 1,46. El resultado obtenido fue de 1,48 un valor elevado para los parámetros establecidos. Este resultado es similar a lo obtenido por García (2017) el cual muestra un valor muy elevado indicando que el grado de concentración de los componentes terpénicos es debido a la descomposición de sus componentes, este a su vez podría bajar la calidad del aceite obtenido [26].

Al utilizar CG/EM para determinar la composición química del AE del cedrón se consideró el tiempo de retención, encontrando como componentes mayoritarios al (E)-Cariofileno (16,01%), β – pineno (14,19%), α- pineno (9,11%), Linalool (8,47%) y Amorfo-4,7(11)-dieno (7,28%) como componentes mayoritarios en la composición química, no se evidencia estudios anteriores que muestre como componentes mayoritarios a estos compuestos. Estos resultados variaron principalmente por el factor estación y riego tal como lo menciona Sgarbossa *et al* (2019) al realizar un estudio en diferentes estaciones de año y con diferentes niveles de riego [20].

Es importante mencionar también que diferentes factores geográficos y ecológicos pueden dar lugar a diferencias cualitativas y cuantitativas, la composición química del AE puede verse afectado por factores como la fase de crecimiento de la planta, fisiología, antigüedad de las hojas y las condiciones de cultivo tal como lo explica Rezig *et al* (2019) en su estudio [21].

Por otro lado, el estudio nos muestra el predominio de hidrocarburos monoterpénicos y monoterpénicos oxigenados en la misma proporción 26,53% para cada uno, estos resultados son similares a lo obtenido por Rezig *et al* (2019) [21]. Los hidrocarburos sesquiterpénicos también se encuentran en segundo lugar con un 24,49%, en concordancia a lo mencionado por Montalván *et al* (2023) estos compuestos tienen efectos antitumorales y antimicrobianos sobre el sistema nervioso central. En general, los terpenos son compuestos económicamente importantes debido a sus aplicaciones como fragancias, sabores y productos farmacéuticos de gran importancia económica ya que especifican la actividad biológica de un AE [46].

El (E)-Cariofileno representa el 16,01%, el cual se cita como uno de los sesquiterpenos más significativos debido a sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anestésico local, usado en diferentes industrias de acuerdo con lo descrito por Montalván *et al* (2023) [46]. Este compuesto es conocido también como beta – Cariofileno [47]. Considerado como el único terpeno que tiene la capacidad de activar un receptor de cannabinoides, en particular su capacidad para unirse a los receptores CB2. Estudios recientes demuestran que tiene un gran potencial terapéutico ya que exhibe un papel analgésico y actúa como protector en varias enfermedades relacionadas al sistema nervioso como el dolor, ansiedad, espasmos, convulsiones, depresión entre otros [48].

En cuanto al análisis antibacteriano *in vitro* por microdilución colorimétrica se realizó frente 04 microorganismos ATCC: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa,* las cuales fueron elegidas de acuerdo con el impacto hospitalario que generan, ya que en la actualidad estas cepas son cada vez más resistentes a los tratamientos[1,9].

Estudios recientes han demostrado que la *E. coli* presenta un importante aumento de la resistencia en las cepas hospitalarias a nivel de las comunidades especialmente con los antibióticos vía oral y frecuentemente recetados en infecciones urinarias no complicadas: trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino y amoxicilina [49]. Mientras que *Staphylococcus aureus* ha demostrado ser resistente a oxacilina y sigue siendo una causa importante de infecciones nosocomiales a nivel mundial. Por lo tanto, la prevención de su diseminación se ha convertido en una de las principales metas estableciendo programas de detección activa a nivel mundial [50].

Pseudomonas aeruginosa ha demostrado ser uno de los patógenos principales que causa infecciones asociadas a la atención de la salud, ya que tiene un alto nivel de resistencia casi a todos los antimicrobianos. Por lo que se necesita el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que sean capaces de bloquear o inhibir estas enzimas [51].

Los resultados de la CMI frente cepas ATCC a *E. coli* fue de 320 ± 0,58 ug/mL, se evidencia que su actividad es mínima, presenta una acción marginal. Para *S. aureus* y *B. subtilis* fue de 80 ± 2,00 ug/mL y 5 ± 1,00 ug/mL respectivamente, estos resultados muestran actividad antibacteriana para estos microorganismos. No se mostró actividad alguna para *P. aeruginosa,* lo cual nos demuestra que es el microorganismo más resistente dentro de los 4 probados.

Estos resultados coinciden con lo obtenido por Aliaga PA (2013), el cual evidencia actividad antibacteriana moderada frente a *S. aureus,* según la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz (1983) [52]. La posible razón para que el crecimiento se vea poco afectado esta la compleja estructura de la pared celular multicapa y la existencia de diferentes mecanismos de resistencia [28].

Reaño CK (2014) en su estudio también evidencio la actividad antibacteriana del extracto de cedrón frente *S. aureus* por el método de difusión en agar (10mg/mL) [27]. Sin embargo, en otra investigación realizado en Ecuador por Azuero *et al* (2016) demostró un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli* y *P. aeruginosa,* pero *S. aureus* no presentó sensibilidad frente al extracto de esta especie [53].

En referencia a *B. subtilis* los estudios son mínimos; Sin embargo, se ha reportado gran efectividad antibacteriana del género *Bacillus* en el extracto acetónico de las partes aéreas del cedrón [24]. Así como lo demuestra también nuestros resultados. Por otra parte, Rezig *et al* (2019) demostró no tener actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* y una mayor actividad contra *B. subtilis* con una zona de inhibición de 85 ± 7,67mm [21].

En otra investigación realizado por Rojas *et al* (2010) realizado en Venezuela los resultados demostraron actividad antibacteriana para *S. aureus* (18,75 ± 0,25) y *E. coli* (12,50 ± 0,50) y ninguna actividad para *P. aeruginosa* [23]. En base a estos resultados podemos mencionar que la actividad biológica observada en el presente estudio fue menor a los resultados obtenidos por nosotros.

De lo mencionado anteriormente se puede confirmar, que *B. subtilis y S. aureus* son más susceptibles porque tienen la capa externa de peptidoglucano [21,54]. En las bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa y E. coli)* pasa lo contrario la ausencia

de la susceptibilidad puede deberse a la presencia de la membrana dual (lipopolisacáridos, fosfolípidos y algunas proteínas), este detiene el ingreso de diversos agentes antimicrobianos [21,55].

La técnica de microdilución colorimétrica nos permitió determinar la CMI de manera más rápida y precisa que los métodos tradicionales. Esto no solo reduce significativamente los costos de laboratorio y hospitalización, sino que también acelera la obtención de resultados [39].

La actividad antioxidante es la capacidad de ciertos compuestos de neutralizar o reducir los efectos nocivos del RL presente en el organismo al donar electrones y estabilizarlos [56]. La determinación de la actividad antioxidante se realizó mediante el método DPPH y ABTS, obteniendo valores expresados en % de inhibición ± desviación estándar.

El DPPH es un compuesto que permite evidenciar la deslocalización del electrón en combinación con un sustrato AH. Es un método sencillo, fácil y económico ampliamente usado [43,44]. El método ABTS evidencia la pérdida del color cuando se añade un antioxidante al reducir ABTS+ a ABTS. Es el método más indicado para realizar ensayos de compuestos coloreados, el radical al poseer solubilidad en medios polares y apolares no se ve afectado por la fuerza iónica por lo que permite evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y de fluidos biológicos [57].

Los resultados para DPPH indican un IC_{50} de 7720,0 ± 24 ug/mL de AE de cedrón y el patrón de referencia Trolox® muestra un IC_{50} = 3,8 ug/mL ± 0,002. Para el método ABTS muestra un IC_{50} de 4648,60 ± 54 ug/mL de AE de cedrón y el patrón de referencia Trolox® un IC_{50} = 2,32 ug/mL ± 0,001. Estos resultados obtenidos se ajustaron mediante regresión lineal, con coeficientes de correlación muy cercanos a uno, por lo que se consideran precisos y confiables [58].

No se han reportado muchas investigaciones de la actividad antioxidante específicamente para *Aloysia triphylla* Royle “cedrón”. Sin embargo, existen estudios previos del cedrón que hace referencia a su potencial antioxidante para esta especie conocida también como Lemon Verbena (*Aloysia citriodora*) [57,58].

Nidal *et al* (2021) evidenció la actividad antioxidante por el método DPPH para el AE de *Aloysia citriodora* recolectadas en dos regiones palestinas Umm al-Fahm y Baqa al-Gharbiyye. Los valores de IC_{50} fueron de 11,74 ± 0,18 y 35,48 ± 0,14 ug/mL respectivamente, en comparación con Trolox® que tenía un valor de IC_{50} de 2,45 ± 0,01 µg/mL. La presencia de compuestos que contienen heteroátomos en la composición química puede inducir a la actividad antioxidante, otros compuestos como los fenoles que contienen oxígenos o hidroxilos tienen una actividad antioxidante aún más potente que las estructuras que contienen nitrógeno. La presencia del citral como componente principal para este estudio fue reportado también como agente antioxidante para este AE [59].

Hosseini *et al* (2019) en su investigación demostró su mayor contenido de fenoles en el AE de Lemon Verbena, lo que confirma la mayor actividad de eliminación de radicales libres en el ensayo DPPH, los resultados muestran un IC_{50} de 11,33 ± 01 para esta especie y para el control positivo BHT un IC_{50} de 27,43 ± 04. La concentración de fenol puede variar en diferentes especies de plantas debido a los factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos que afectan de distinta manera a las partes de la planta [60].

Estudios previos también demuestran la actividad antioxidante en diferentes extractos de *Aloysia citriodora.* Rashid *et al* (2022) demostró la actividad de barrido radical contra DPPH. En comparación con el ácido ascórbico (IC_{50}: 2,783 mg/mL), el extracto de etanol presentó actividad antioxidante más potente (IC_{50}: 22,85 mg/mL) seguido de los extractos acuoso y de acetato de etilo con IC_{50} de 49,9 mg/mL y 107,04 mg/mL, respectivamente. Su mayor actividad antioxidante podría deberse a la cantidad de fenoles y flavonoides que se presentan en abundancia en este tipo de extractos. En el caso del aceite esencial no se demostró ninguna actividad antioxidante para este estudio [61].

Una investigación actual realizado por Athanasiadis *et al* (2024) confirmó la capacidad antioxidante de los extractos influenciado por la cantidad de polifenoles presentes. La utilización de metanol dió lugar a extractos hidroetanólicos que

demostraron ser potentes secuestradores del radical DPPH. En cuanto a los ensayos antioxidantes para DPPH fue de 438,94-958,98 µmol AAE/g [62].

El tiempo y la temperatura de extracción del aceite esencial son factores importantes que influyen en los fitoconstituyentes responsables del efecto antioxidante en el cedrón [63,64]. Asimismo, la composición química como (E)-Cariofileno (16,01%), β – pineno (14,19%), α- pineno (9,11%) como componentes mayoritarios pueden hacer referencia a la buena actividad antioxidante de nuestros resultados.

VII. CONCLUSIONES

1. Se identificaron en total 49 componentes químicos volátiles para el AE del cedrón por GC/MS siendo los de mayor porcentaje el (E)-Cariofileno (16,01%), β – pineno (14.19%) y α- pineno (9.11%).

2. La prueba de microdilución colorimétrica, del AE del cedrón presentó actividad antibacteriana a través de la CMI para *S. aureus y B. subtilis* (bacterias Gram positivas). Mínima actividad frente a *E. coli* y ninguna actividad frente a *P. aeruginosa* (bacterias Gram negativas).

3. El análisis antioxidante presento una IC_{50} de 7720,0 ± 24 ug/mL para el método DPPH y un IC_{50} de 4648,60 ± 54 ug/mL para el método ABTS+. En comparación a la sustancia de referencia Trolox® y componentes químicos mayoritarios del cedrón podemos mencionar su actividad antioxidante del cedrón para ambos métodos.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda en futuras investigaciones tomar en cuenta también el estado vegetativo de la planta del cedrón como una variable de estudio más, de esa manera se pueda evaluar su efecto en el rendimiento y establecer un estudio más completo.

- Utilizar el método de concentración mínima inhibitoria al máximo para realizar investigaciones de otras plantas medicinales con mucho potencial, ya que este método resulta ser rápida, menos laboriosa, disminuye el costo y tiempo empleado.

- Se recomienda la continuidad de la investigación, utilizando los datos obtenidos en la presente investigación y así brindarle mayor valor agregado al cedrón.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud. Situación de las plantas medicinales en Perú. [Internet]. Lima: OPS; 2019 [Revisado el 26 de marzo del 2024. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50479/OPSPER19001_spa.pdf.
2. Castro M, Chávez G, Auquiñivin A. Aceites esenciales de plantas nativas del Perú: Efecto del lugar de cultivo en las características fisicoquímicas y actividad antioxidante. Scientia Agropecuaria. 2019; 10(4): 479-487.
3. Ruiz C, Díaz C, Rojas R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Rev Soc Quim Perú. 2015; 81(2): 81-94.
4. Alderete H. Actividad antimicrobiana, antioxidante *in vitro* y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.
5. Barrios I, Miltos V, Piris A, Piris G, Centurión C. Efecto Antidepresivo del Extracto Hidroalcohólico de *Aloysia citriodora* (cedrón Paraguay) usando Test de Suspensión de la Cola en Ratones Albinos Suizos. Rev Scientifica. 2016; 14(1): 9-12.
6. Instituto Nacional de Salud. Plantas Medicinales. [Internet]. Lima: MINSA; 2023 [Revisado el 17 de marzo del 2024]. Disponible en: https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional/plantas-medicinales.
7. Gallego MG. Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya; 2016.
8. Instituto Nacional del Cáncer. Antioxidantes y prevención del cáncer. [Internet]. Lima: INS; 2017 [Revisado el 21 de abril del 2024]. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta/hoja-informativa-antioxidantes#:~:text=Los%20antioxidantes%20son%20compuestos%20qu%C3%ADmicos,para%20neutralizar%20los%20radicales%20libres.
9. Poffo F, Siebert D, Tenfen A, Mendes CM, Debiasi M, Guedes A. Evaluación de la actividad antibacteriana de plantas medicinales de uso popular: *Alternanthera*

brasiliana (Alternantera), *Plantago major* (Llantén), *Arctostaphylos uva-ursi* (Uva-ursi) y *Phyllanthus niruri* (Chanca piedra). Rev Pan-Amaz Saude. 2020; 11: e202000127. doi: 10.5123/s2176-6223202000127.

10. Salaverry O, Cabrera J. Florística de algunas plantas medicinales [galería]. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 2014; 31(1): 165-168.

11. De la cruz A, Mostacero J. Uso de plantas medicinales para la cura de enfermedades y/o dolencias: El caso del poblador de la provincia de Trujillo, Perú. Manglar. 2019;16(2): 119-124.

12. Mostacero J, Peláez F, Alarcón N, De La Cruz A, Alva R, Charcape M. Plantas utilizadas para el tratamiento del cáncer expendidas en los principales mercados de la provincia de Trujillo, Perú, 2016 – 2017. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2019; 18(1): 81 – 94.

13. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. Definiciones: plantas aromáticas. [Internet]. Lima: MIDAGRI; 2020 [Revisado el 21 de febrero del 2024]. Disponible en: https://www.midagri.gob.pe/portal/59-sector-agrario/plantas-medicinales.

14. Jardín Botánico UNMSM. Clasificación por familia: VERBENACEAE. [Internet]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2019 [Revisado el 24 de mayo del 2024. Disponible en: https://jardinbotanicoffybb.jimdofree.com/clasificaci%C3%B3n-por-nombre-com%C3%BAn/.

15. Huanca C. Estudio fitoquímico del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides Loes & Moldenke* y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química; 2021.

16. Fonnegra R, Villa J. Monsalve Z. Plantas usadas como medicinales en el altiplano del oriente antioqueño: Cedrón. 1ra. Ed. Medellín Colombia: Universidad de Antioquia; 2012, 108 p.

17. Rudas D. Composición química, fraccionamiento y actividad *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau (“Cedrón”) sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium.* [Tesis para obtener el Título de

Licenciado en Química]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía; 2017.

18. Saavedra M. Estudio etnobotánico de las especies vegetales usadas contra la inflamación en el municipio de Ocuilan, Estado de México. [Tesis para obtener el grado de Licenciado en Farmacia]. México: Universidad Autónoma del estado de Morelos, Facultad de Farmacia; 2023.

19. Rudas D. Composición química, fraccionamiento y actividad *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau ("Cedrón") sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium.* [Tesis para obtener el Título de Licenciado en Química]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía; 2017.

20. Sin C, Britos MR, Chamorro E, Cáceres M, Fernández D, Ortega S. Aceites esenciales con actividad antibacteriana: posible aplicación y administración en odontología. Odont Vital. 2021; 35(2): 32 – 43.

21. Sgarbossa J, Schimidt D, Schwers F, Schwers L, Prochnow D, Otomar B. Effect of season and irrigation on the chemical composition of *Aloysia triphylla* essential oil. Céres. 2019; 66(2): 85-93.

22. Rezig L, Saada M, Trabelsi N, Tammar S, Limam H, Bettaieb I, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Aloysia triphylla L. essential oils and methanolic extract. Ital J Food Sci. 2019; 31: 556 – 572.

23. Vidal E, García JL, Bañuelos F, Conde LA, Alonso AI. Extracción de aceite esencial de cedrón *[Aloysia triphylla (*L'Hér*.)* Britton*]* y evaluación de su actividad antioxidante". Memorias del Congreso Internacional de Investigación. Celaya, Guanajuato, México: Academia Journals; 2018. 5944-5949.

24. Rojas LB, Velasco J, Diaz T, Gil R, Carmona J, Usubillaga A. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia Triphylla* (L´Her.) Britton contra patógenos génito – urinarios. B Latinoam Caribe PL. 2010; 9(1):56-62.

25. Huerta J. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* "cedrón" y su aplicación para el control de la halitosis. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021.

26. Bardales M, Farfán MR. Determinación de los componentes mayoritarios del aceite esencial del cedrón *(Aloysia triphylla)* mediante destilación por arrastre de vapor. [Tesis para optar el grado de Título profesional]. Callao: Universidad Nacional del Callao; 2017.

27. García J. Extracción de aceite esencial por fluidos supercríticos y arrastre con vapor de cedrón *(Aloysia triphylla)* en la región Arequipa. [Tesis para optar el grado de Título Profesional]. Arequipa: Universidad Nacional San Agustín; 2017.

28. Reaño CK. Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de *Aloysia triphylla* "cedrón", *Rosmarinus officinalis* "romero", *Mentha spicata* "hierbabuena", *Portulaca oleracea* "verdolaga" y *Taraxacum officinale* "diente de león". [Tesis para obtener el Título Profesional]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo ;2014.

29. Aliaga PA. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* P. "cedrón" frente a *Escherichia coli* ATTC 25922 y *Staphylococcus aereus* 25923. [Tesis para optar el Título profesional]. Tacna: Universidad Nacional Gorge Basadre Grohman; 2013.

30. Rojas J, Palacios O, Ronceros S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 2012; 29 (1): 61-68.

31. Real Academia Española. *In vitro.* [Internet]. Lima: RAE.es; 2023 [Revisado el 10 de marzo del 2024]. Disponible en: https://dle.rae.es/in%20vitro?m=form&m=form&wq=in%20vitro

32. Real Academia Española. *In vivo.* [Internet]. Lima: RAE.es; 2023 [Revisado el 10 de enero del 2024]. Disponible en: https://dle.rae.es/in%20vivo?m=form&m=form&wq=in%20vivo

33. Espinoza EE Las variables y su operacionalización en la investigación educativa. Parte I. Revista Conrado. 2018; 14(65): 39-49.

34. Laboratorio Clínico y Biomédico. Escala de McFarland. [Internet]. Lima: LCB; 2017 [Revisado el 18 de enero del 2024]. Disponible en: https://microbiologiabohio.blogspot.com/2018/01/escala-de-mcfarland.html.

35. Dagnino J. Regresión lineal. Rev Chil Anest. 2014; 43: 143-149.

36. Alva M, Golac G. Metabolitos secundarios y actividad antioxidante *in vitro* de corteza de *Cecropia strigosa* Trécul y *Matisia cordata* Bonpl por el método 1,1-difenil-2-picril-hidralizo-DPPH. [Tesis para optar el título profesional]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2022.

37. Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú. Consideraciones importantes para la toma y envío de muestras a la unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal. [Internet]. Lima: SENASA; 2014. [Revisado el 04 de febrero del 2024]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Consideraciones-para-la-Toma_Envio_Muestras_UCDSV.pdf

38. Cucho JLL, Mendoza SW, Fuertes CM, Salazar ME, Herrera O. Chemical Profile of the Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Croton adipatus*, *Croton thurifer* and *Croton collinus*. BioMed Res Int. 2022; 10(11): 1387. doi: 10.3390/antibiotics10111387.

39. The United States Pharmacopeial Convention. Specific Gravity in The United States Pharmacopeia 38/NF 33. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2015.

40. IDEXX Laboratories Inc. Guía Microbiológica para interpretar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). [Internet]. EE. UU: IDEXX; 2023. [Revisado el 18 de diciembre del 2023]. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf.

41. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2015.

42. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007; 42(4): 321-324.

43. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis de Postgrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.

44. Rodríguez JE. Determinación de polifenoles, actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y elaboración de una formula dermocosmética a partir del extracto hidroalcohólico de *Eisenia cokeri* M. A. Howe. [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.

45. Herrera O, Chávez H, Enciso EC, Común PW, Hañari RD, Figueroa L, et al. GC-MS Profile, Antioxidant Activity, and In Silico Study of the Essential Oil from *Schinus molle* L. Leaves in the Presence of Mosquito Juvenile Hormone-Binding Protein (mJHBP) from *Aedes aegypti*. BioMed Res Int. 2022:5601531. doi: 10.1155/2022/5601531.

46. Friaa O, Brault D. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH in semi-aqueous solution. Rev Org Biomol Chem. 2006;4: 2417-2423.

47. Montalván M, Malagón O, Cumbicus N, Tanitana F, Gilardoni G. Análisis químicos de aceites esenciales amazónicos de una comunidad Shuar Ecuatoriana. Revista de ciencias de la vida. 2023; 38 (2): 33-45.

48. Centro Nacional de Información Biotecnológica. Resumen de compuestos Pubchem: Cariofileno. [Internet]. Estados Unidos: NIH; 2024. [Revisado el 01 de junio del 2024]. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caryophyllene#section=Depositor-Supplied-Synonyms.

49. Galzerano J, Ríos MD, Velásquez PM. Beneficio clínico del tratamiento con cannabinoides para el dolor crónico no oncológico. Rev Med Urug. 2023;39 (3): e201.

50. Betran A, Lavilla MJ, Cebollada R, Calderón JM, Torres L. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas

en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. Rev Clin Med Fam.2020; 13(3): 198-202.

51. Gómez L, Chacín D, Mena A, Gonzales J, Marín M *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo- Venezuela. Rev Kasmera. 2016; 44(1): 53-65.

52. Espinoza D, Esparza A. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa,* aspectos clínicos y de laboratorio. Rev Chil Infectol. 2021; 38(1): 69-80.

53. Durafford C, Lapraz J. 1983. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson S.A. Barcelona.

54. Azuero A, Jaramillo C, San Martin D. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Rev Cienc unemi. 2016; 20(9): 11-18.

55. Scherrer R, Gerhardt P. Molecular sieving by the Bacillus megaterium cell wall and protoplast. J Bacteriol. 1971; 107 (3): 718-735.

56. Silva GN, Spader TB, Alves SH, Mallmann CA, Heinzmann BM. Composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of *Senecio selloi* Spreng DC. Rev Bras Pl Med. Campinas. 2013; 15 (4): 503-507.

57. Jaque AP. Evaluación de la actividad antioxidante e hipoglucemiante *in vitro* de la combinación de extractos etanólicos de Marco (*Ambrosia arborescens*), Quishuar (*Buddleja incana*) y Cedrón (*Aloysia citrodora*). [Tesis para optar el título profesional de Ingeniería Biotecnóloga]. Ambato - Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2024.

58. Ruiz ML. Determinación de la actividad antioxidante. [Guía de Laboratorio]. Lima: Universidad Simón Bolívar. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2020.

59. García JL. Extracción de aceite esencial de cedrón [*Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton] recolectado en Altotonga y evaluación de su actividad antioxidante. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniería Química]. México: Universidad Autónoma De Puebla; 2018.

60. Nidal J, Mohammed H, Murad A, Mohammed Q, Mustafa G, Eman M et al. Spectral characterization, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and cyclooxygenase inhibitory activities of *Aloysia citriodora* essential oils collected from two Palestinian regions. BMC Complement Med Ther. 2021; 143 (21): 1-11.

61. Hosseini M, Jamshidi A, Raeisi M, Azizzadeh M. The Antibacterial and Antioxidant Effects of Clove (*Syzygium aromaticum*) and Lemon Verbena (*Aloysia citriodora*) Essential Oils. J Hum Environ Health Promot. 2019; 5(2): 86-93.

62. Rashid HM, Mahmod AI, Afifi FU *et al*. Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora*): An *in vitro* and *in vivo* study. Plants. 2022; 785 (11): 1-23.

63. Athanasiadis V, Chatzimitakos T, Makrygiannis I *et al*. Antioxidant-Rich Extracts from Lemon Verbena (*Aloysia citrodora L*.) Leaves through Response Surface Methodology. Oxygen. 2024; 4(1):1-19.

64. Padilla JM. Actividad antioxidante y contenido de los polifenoles del extracto metanólico de las hojas de *Aloysia citriodora palau* (CEDRÓN). [Trabajo investigación para optar el grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica]. Chimbote: Universidad Católica los Ángeles; 2019.

65. Gavilanes JA. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Aloysia citrodora* (Cedrón) y *Prunus serotina* (Capulí) en Andamios biológicos. [Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Biotecnólogo]. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2024.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Operacionalización de variables

VARIABLE(S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	OBSERVACIONES
Actividad antibacteriana y antioxidante *in vitro*	Dependiente	- La actividad antioxidante contribuye a la disminución de los radicales libres y estrés oxidativo. - La actividad antibacteriana demuestra la capacidad de reducir la presencia de microorganismos, como bacterias y hongos.	- Para la actividad antioxidante se utilizó el método DPPH y ABTS+. -Para la actividad antibacteriana se calculó la concentración mínima inhibitoria por el método de	- Inhibición del radical DPPH y $ABTS^{+}$ - Concentración mínima inhibitoria (CMI)	- Concentración inhibitoria media (CI_{50}). - Concentración más baja que impide el cambio del color.	-µg/mL - µg/mL	

			microdilución colorimétrica.				
El aceite esencial de *Aloysia triphylla* Royle “cedrón”.	Independiente	Son mezclas complejas de sustancias químicas, entre ellas agua, elementos de ceniza (minerales), proteínas, lípidos y carbohidratos que componen los órganos de una planta. A lo largo de su vida, las plantas sintetizan y utilizan todas estas sustancias químicas.	Se desarrolló por el método de destilación por arrastre con vapor y se calculó el % de rendimiento con el volumen extraído en mL y el peso del aceite esencial en g.	-Rendimiento de obtención. -Caracterización organoléptica. -Caracterización fisicoquímica	- Mililitros (mL) de cada muestra obtenida por cada gramo (g) de cedrón. - Porcentaje (%)		

ANEXO 2: Constancia de la clasificación taxonómica del cedrón

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

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA Nº 051-2022-USM-MHN

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Cinthia MEJIA RAMOS,** estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos**;** sido estudiada y clasificada como: ***Aloysia triphylla*** Royle; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016):

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: VERBENACEAE

GENERO: ***Aloysia***

ESPECIE*: Aloysia triphylla* Royle

Nombre vulgar: "cedrón"
Determinado por Mag. Hamilton Beltrán Santiago

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

Lima, 20 de junio de 2022

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

MUSEO DE HISTORIA NATURAL – USM – JEFE – Herbario San Marcos

JAC/ddb

ANEXO 3: Análisis de varianza ANOVA para la actividad antibacteriana

Table Analyzed	Data 1				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation		P value	P value summary	Significant?
Interaction	38.64		< 0.0001	****	Yes
Row Factor	38.47		< 0.0001	****	Yes
Column Factor	22.88		< 0.0001	****	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	101958	3	33986	F (3, 16) = 201280	P < 0.0001
Row Factor	101499	3	33833	F (3, 16) = 200373	P < 0.0001
Column Factor	60376	1	60376	F (1, 16) = 357569	P < 0.0001
Residual	2.702	16	0.1689		
Number of missing values			0		

Compare each cell mean with the other cell mean in that row.

Number of families	1
Number of comparisons per family	4
Alpha	0.05

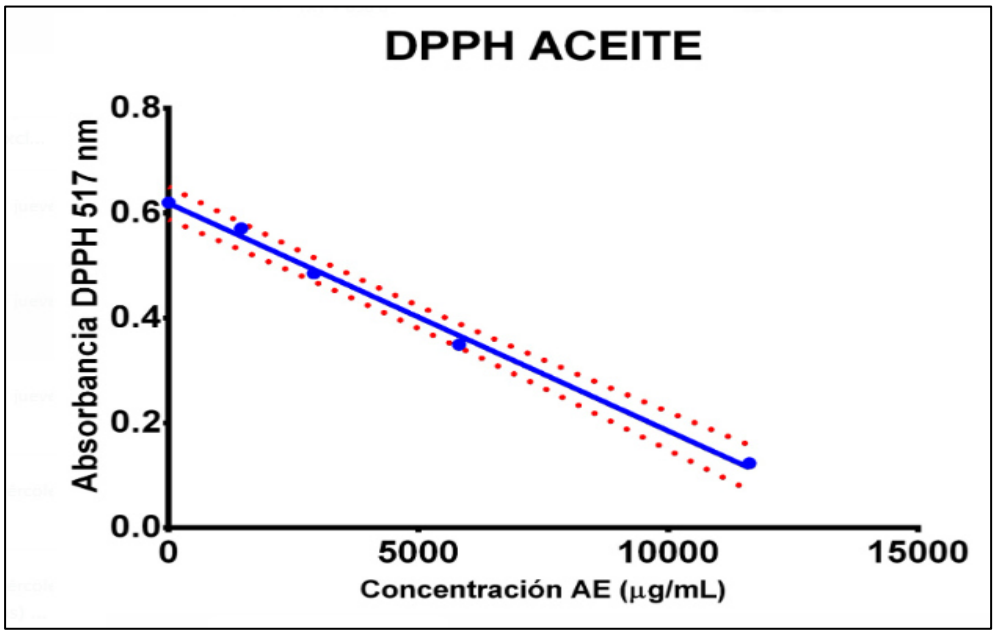
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
AE - CIPRO					
Escherichia coli ATCC 25922 319.4	318.4	318.4 to 320.3	Yes	****	< 0.0001
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-1.250	-2.191 to -0.3093	Yes	**	0.0073
Bacillus subtillis ATCC 6633	4.375	3.434 to 5.316	Yes	****	< 0.0001
Staphylococcus aureus ATCC 25923	78.75	77.81 to 79.69	Yes	****	< 0.0001

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	t	DF
AE - CIPRO								
Escherichia coli ATCC 25922 320.0	0.6250	319.4	0.3355	3	3	951.9	16	
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0.0	1.250	-1.250	0.3355	3	3	3.726	16
Bacillus subtillis ATCC 6633	5.000	0.6250	4.375	0.3355	3	3	13.04	16
Staphylococcus aureus ATCC 25923	80.00	1.250	78.75	0.3355	3	3	234.7	16

ANEXO 4: Análisis estadístico del método DPPH para el A.E del cedrón.

```
Best-fit values
     Slope      -4.341e-005 ± 1.635e-006
     Y-intercept when X=0.0     0.6188 ± 0.009793
     X-intercept when Y=0.0     14257
     1/slope    -23038
95% Confidence Intervals
     Slope      -4.861e-005 to -3.821e-005
     Y-intercept when X=0.0     0.5877 to 0.6500
     X-intercept when Y=0.0     13099 to 15702
Goodness of Fit
     R square   0.9958
     Sy.x       0.01502
Is slope significantly non-zero?
     F  705.2
     DFn, DFd   1.000, 3.000
     P value    0.0001
     Deviation from zero?       Significant
Data
     Number of X values 5
     Maximum number of Y replicates     1
     Total number of values     5
     Number of missing values   0
Runs test
     Points above line  3
     Points below line  2
     Number of runs     3
     P value (runs test)        0.5000
     Deviation from linearity   Not Significant

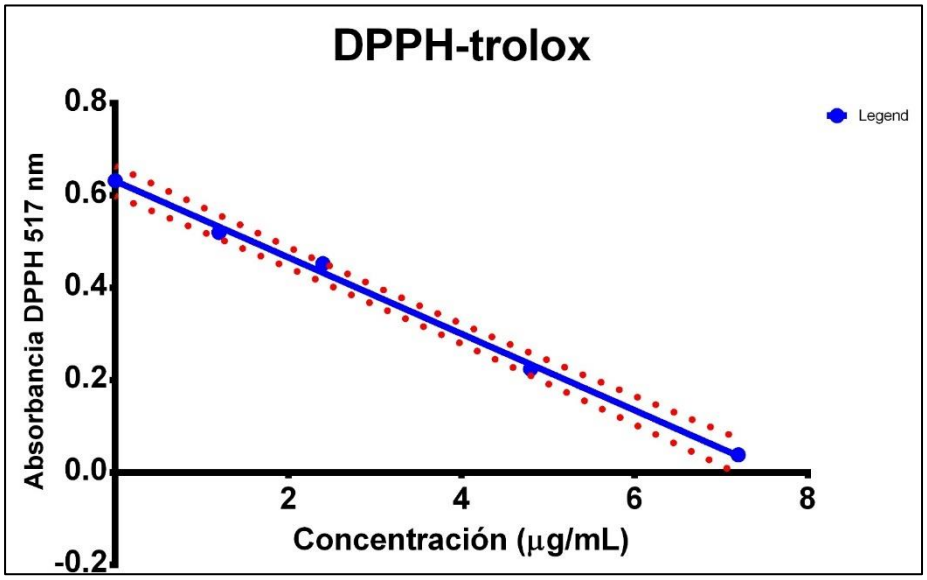
Equation        Y = -4.341e-005*X + 0.6188
```



ANEXO 5: Análisis estadístico del Trolox® para DPPH

```
Best-fit values
     Slope      -0.08274 ± 0.002498
     Y-intercept when X=0.0     0.6314 ± 0.01012
     X-intercept when Y=0.0     7.630
     1/slope    -12.09
95% Confidence Intervals
     Slope      -0.09069 to -0.07480
     Y-intercept when X=0.0     0.5992 to 0.6636
     X-intercept when Y=0.0     7.169 to 8.176
Goodness of Fit
     R square   0.9973
     Sy.x       0.01444
Is slope significantly non-zero?
     F  1098
     DFn, DFd   1.000, 3.000
     P value    < 0.0001
     Deviation from zero?       Significant
Data
     Number of X values 5
     Maximum number of Y replicates     1
     Total number of values     5
     Number of missing values   0

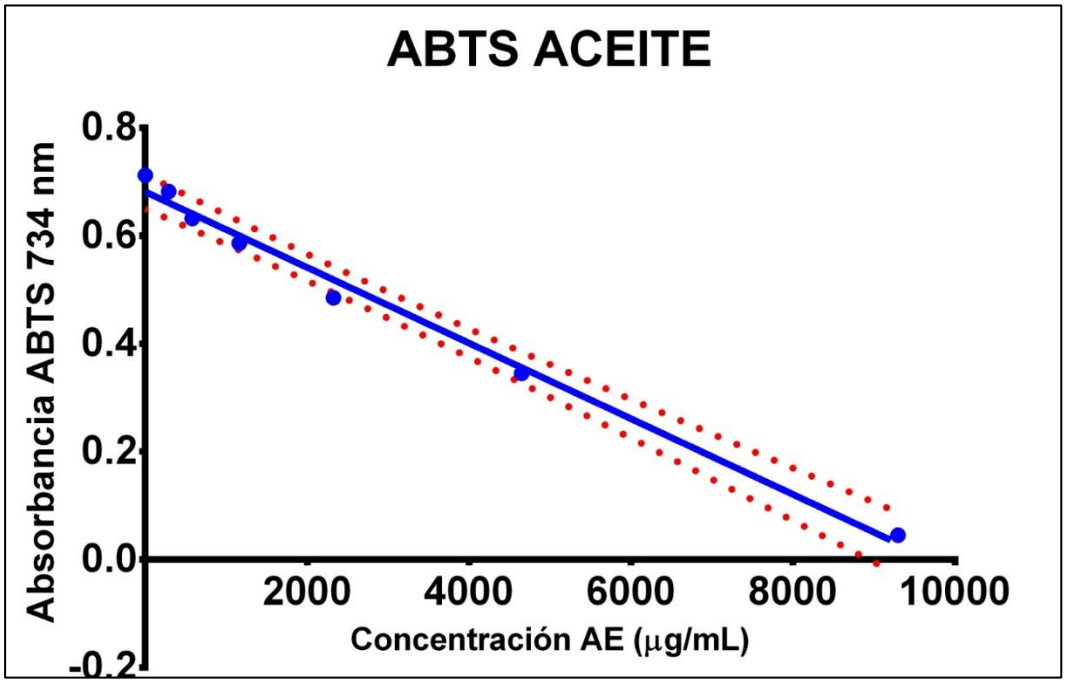
Equation        Y = -0.08274*X + 0.6314
```



ANEXO 6: Análisis estadístico del método ABTS para el A.E del cedrón.

```
Best-fit values
     Slope      -7.009e-005 ± 3.039e-006
     Y-intercept when X=0.0     0.6814 ± 0.01233
     X-intercept when Y=0.0     9723
     1/slope    -14268
95% Confidence Intervals
     Slope      -7.790e-005 to -6.228e-005
     Y-intercept when X=0.0     0.6497 to 0.7132
     X-intercept when Y=0.0     8938 to 10687
Goodness of Fit
     R square   0.9907
     Sy.x       0.02495
Is slope significantly non-zero?
     F  532.0
     DFn, DFd   1.000, 5.000
     P value    < 0.0001
     Deviation from zero?       Significant
Data
     Number of X values 7
     Maximum number of Y replicates     1
     Total number of values     7
     Number of missing values   0
Runs test
     Points above line  3
     Points below line  4
     Number of runs     3
     P value (runs test)        0.2000
     Deviation from linearity   Not Significant

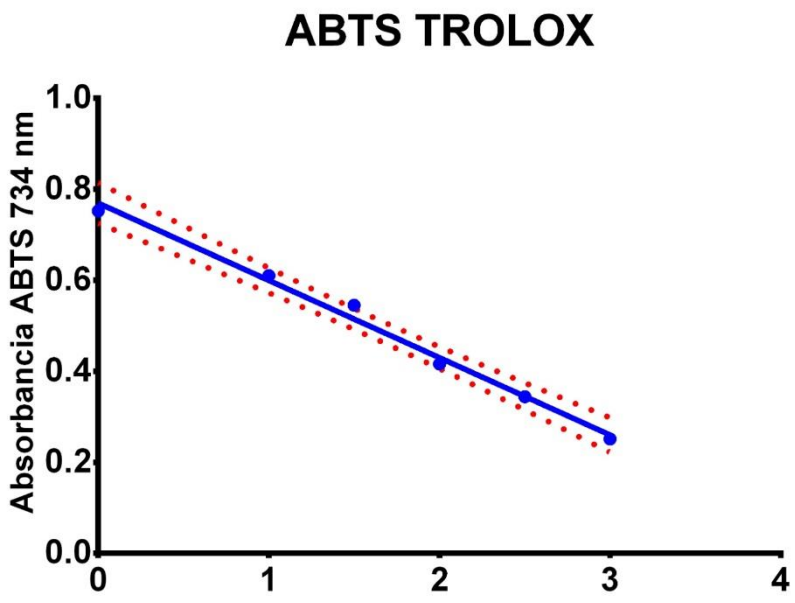
Equation        Y = -7.009e-005*X + 0.6814
```



ANEXO 7: Análisis estadístico del Trolox® para ABTS

```
Best-fit values
     Slope       -0.1699 ± 0.008284
     Y-intercept when X=0.0      0.7694 ± 0.01604
     X-intercept when Y=0.0      4.530
     1/slope     -5.887
95% Confidence Intervals
     Slope       -0.1929 to -0.1469
     Y-intercept when X=0.0      0.7249 to 0.8140
     X-intercept when Y=0.0      4.166 to 5.001
Goodness of Fit
     R square    0.9906
     Sy.x        0.02001
Is slope significantly non-zero?
     F   420.4
     DFn, DFd    1.000, 4.000
     P value     < 0.0001
     Deviation from zero?        Significant
Data
     Number of X values 6
     Maximum number of Y replicates      1
     Total number of values      6
     Number of missing values    0
Runs test
     Points above line  2
     Points below line  4
     Number of runs      3
     P value (runs test)         0.4000
     Deviation from linearity    Not Significant

Equation         Y = -0.1699*X + 0.7694
```



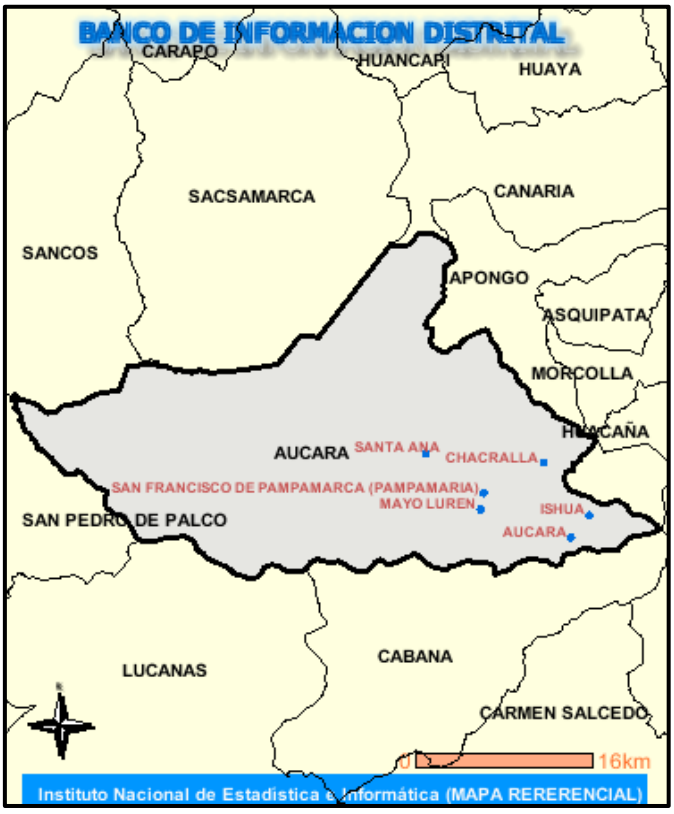


Fig. 15 Ubicación geográfica del distrito de Aucará.



Fig. 16 Imagen de la muestra vegetal “cedrón” in situ

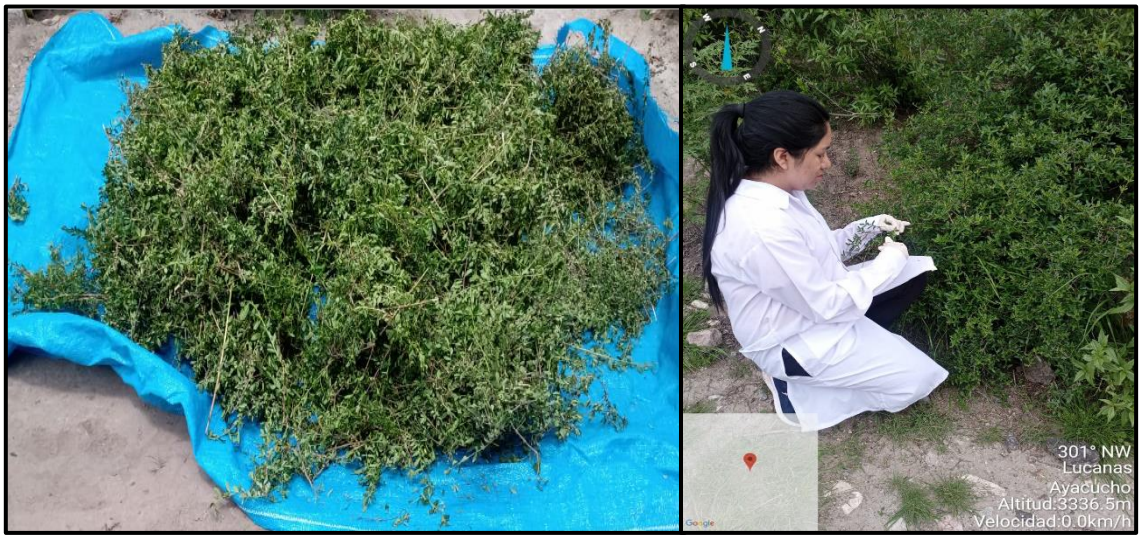


Fig. 17 Recolección de la muestra vegetal

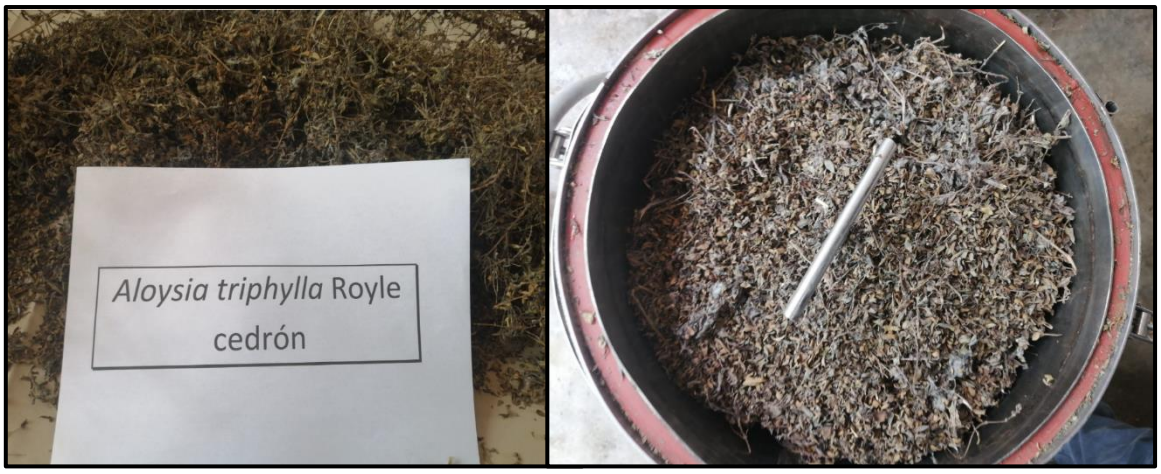


Fig. 18 Acondicionamiento y secado de la muestra vegetal



Fig.19 Extracción del aceite esencial



Fig. 20 Densitómetro DEN-1B



Fig. 21 Agitador vórtex MX-S