



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Piper cajamarcanum* Yunk “MATICO CAJAMARQUINO” Y *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva “SALVIA” FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, CAJAMARCA - 2022.

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. JHONATAN ALONSO SANTA CRUZ CÁCERES

ASESORA:

DRA. Blga. CONSUELO PLASENCIA ALVARADO.

CO-ASESORA:

DRA. Q.F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

CAJAMARCA – PERÚ

2024



CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Jhonatan Alonso Santa Cruz Cáceres**
DNI N° 73074560
Escuela Profesional: Biología y Biotecnología
2. Asesor: Consuelo Plasencia Alvarado
Facultad: Ciencias de la Salud
3. Grado académico o título profesional
 Bachiller **Título profesional** Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación: **"EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Piper cajamarcanum* Yunk "MATICO CAJAMARQUINO" Y *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva "SALVIA" FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, CAJAMARCA - 2022.**
6. Fecha de evaluación: 10/07/2024
7. Software antiplagio: **TURNITIN** URKUND (OURIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **11 %**
9. Código Documento: Identificación de reporte de similitud: oid:3117:365718507
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 16/7/2024

		Firma y/o Sello Emisor Constancia
		
Dra. MARTHA VICENTA ABANTO VILLAR		
_____ Nombres y Apellidos DNI: 26673990		

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT©
JHONATAN ALONSO SANTA CRUZ CÁCERES
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Santa Cruz, J. 2024. **Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Piper cajamarcanum* Yunk “Matico Cajamarquino” y *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva “Salvia” frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos, Cajamarca, 2022**

/ Jhonatan Alonso Santa Cruz Cáceres.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-Asesora: Dra. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC
2024.

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Piper cajamarcanum*

Yunk “MATICO CAJAMARQUINO” Y *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva “SALVIA”

FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS, CAJAMARCA

- 2022

AUTOR: Jhonatan Alonso Santa Cruz Cáceres.

ASESORA: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

CO-ASESORA: Dra. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



Presidente
Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto



Secretario
M. Cs. Néstor Estuardo Carbajal Caballero



Vocal
Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca, 2024 – Perú.



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 11:20 del 28 de junio del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente AI-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de Piper cajamarcanum Yunk "matico cajamarquino" y Salvia lamicalis Epling & Jativa "salvia" frente a Staphylococcus aureus resistentes a antimicrobianos, Cajamarca - 2022.
 del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas: Jhematan Alonso Santa Cruz Córceles

Siendo las 12:30 del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: muy bueno, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra apto para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto	
Secretario(a):	M.Cs. Nestor Estuardo Corbajal Caballero	
Vocal:	Dr. Dométrio Cieza Yrigoin	
Accesitaria:		
Asesor (a):	Dra. Consuelo Delania Plasencia Alvarado	
Asesor (a):	Dra. Jéssica Nathalie Bardoles Valdivia	

Términos de Calificación:
 EXCELENTE (19-20)
 REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)
 REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)
 DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Mis padres Juan y Elsa, que me han sabido instruirme y corregirme, que me han apoyado incondicionalmente y me han permitido concluir con esta etapa de mi desarrollo profesional. Muchas gracias por todos sus consejos, enseñanzas y valores que me han ayudado y me seguirán ayudando durante toda mi vida.

Mis hermanos, Betty, Juan Carlos, Nancy, Kelly y Josué, por todo su amor, afecto, muestras de cariño, palabras de aliento y consejos. Por ser un buen ejemplo, para que al igual que ustedes pueda concluir con mis estudios universitarios y alcanzar todas las metas que me proponga.

Agradecimiento:

Quiero agradecer primeramente a Dios, por darme la vida, por permitirme nacer en una familia tan maravillosa que le ama y glorifica y por haberme permitido estudiar mi carrera profesional en la Universidad Nacional de Cajamarca y finalizar con éxito esta etapa.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo incondicional aun en medio de las necesidades y problemas, por sus palabras de aliento, sus consejos y todo su apoyo tanto humano como económico que me permitieron finalizar este trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial también a mis asesoras la Dra. Consuelo Plasencia Alvarado y la Dra. Jéssica Bardales valdivia, por haberme permitido recurrir a sus conocimientos, su experiencia y capacidad para el desarrollo de todo este trabajo de investigación.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Marco Rivera Jacinto y a mi amiga Maricela Chávez Huingo por toda su paciencia, por todos sus consejos y su conocimiento brindado, muchas gracias por el espacio en el laboratorio y todo el material que me facilitaron durante el desarrollo de mi proyecto de tesis.

Tabla de Contenido

Titulo.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la Investigación.....	4
2.2. Bases Teóricas.....	6
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.2. Patogenia.....	7
2.2.4. Diagnóstico.....	8
2.2.5. Tratamiento y Resistencia a Antimicrobianos.....	10
2.2.6. Mecanismos de Resistencia.....	10
2.2.7. <i>Piper cajamarcanum</i> Yunk.....	11
2.2.8 <i>Salvia lanicaulis</i> Epling & Játiva.....	12
2.2.9. Aceites Esenciales.....	13
2.2.10 Métodos de Estudio de Sensibilidad Microbiana.....	15
2.3. Definición de Términos Básicos.....	16
CAPITULO III.....	17
DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS.....	17
3.1. Nivel de Investigación.....	17
3.2. Tipo y Diseño de Estudio.....	17

3.3. Material Biológico	17
3.4. Lugar de Muestreo	17
3.5. Toma de Muestras.....	18
3.5.1. Muestras Vegetales	18
3.5.2. Aislamiento de <i>S. aureus</i> de pacientes atendidos en el HRDC	18
3.6. Obtención de los Aceites Esenciales de <i>S. lanicaulis</i> y <i>P. cajamarcanum</i>	18
3.6.1. Selección de la Muestra Vegetal.....	18
3.6.2. Obtención del Aceite Esencial de <i>S. lanicaulis</i>	19
3.6.3. Obtención del Aceite Esencial de <i>P. cajamarcanum</i>	19
3.6.4. Preparación de las Concentraciones de los Aceites Esenciales de <i>S. lanicaulis</i> y <i>P. cajamarcanum</i>	20
3.7. Corroboración e Identificación de los Aislamientos de <i>S. aureus</i> Resistentes a Antimicrobianos.....	20
3.8. Evaluación del Efecto Antimicrobiano: Método de Difusión en agar con disco o Kirby Bauer	21
3.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Método de Macrodilución en medio líquido.	22
3.10. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	23
3.11. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos.....	23
CAPITULO IV	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Resultados.....	24
4.2. Discusión	34
CAPITULO V	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones.....	38

5.2. Recomendaciones	39
LISTA DE REFERENCIAS.....	40
APÉNDICES	46
Apéndice N°1. Recolección de especies vegetales	46
Apéndice N°2. Obtención de los aceites esenciales	47
Apéndice N°3. Obtención e identificación de los aislamientos de <i>S. aureus</i> ,	49
Apéndice N°4. Determinación de la resistencia a diferentes antimicrobianos.	50
Apéndice N°5. Evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>P. cajamarcanum</i>	51
Apéndice N°6. Evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>S. lanicaulis</i> . 52	
Apéndice N°7. Determinación de la CMI Y CMB.....	53
Apéndice N°8. Batería de tubos de ensayo para determinar la CMI.	54
Apéndice N°9. Prueba de Normalidad.....	55
Apéndice N°10. Prueba de Kruskal Wallis para <i>P. cajamarcanum</i> y <i>S. lanicaulis</i>	56
Apéndice N°11. Pruebas Post Hoc para determinar diferencias entre grupos.....	58

Lista de Abreviaciones:

ATCC: American Type Culture Collection

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMB: Concentración Mínima Bactericida

AE: Aceite Esencial

MH: Agar Mueller Hinton

HRDC: Hospital Regional Docente de Cajamarca

DMSO: Dimetilsulfóxido

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

Glosario:

Aceite esencial

Conjunto de sustancias químicas volátiles producidas naturalmente por las plantas como metabolitos secundarios.

Antibacteriano

Sustancias naturales o sintéticas que suprimen el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se refiere a la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano.

Concentración mínima bactericida (CMB)

Es la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9 % de una población bacteriana.

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Piper
cajamarcanum* Yunk “MATICO CAJAMARQUINO” Y *Salvia lanicaulis* Epling &
Játiva “SALVIA” FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS, CAJAMARCA - 2022.**

Resumen:

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *Piper cajamarcanum* y *Salvia lanicaulis* frente a aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos. Los aislamientos se obtuvieron de muestras de pacientes del HRDC. El aceite esencial se extrajo mediante destilación por arrastre de vapor y se realizó el análisis de sus características fisicoquímicas. El efecto inhibitorio se evaluó siguiendo la metodología de Kirby Bauer utilizando concentraciones del aceite esencial al 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %; asimismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) empleando el método de macrodilución en medio líquido. Se comprobó que el aceite esencial de *P. cajamarcanum* y de *S. lanicaulis*, a las concentraciones del 80 % y 100 % presentaron efecto inhibitorio sobre los aislamientos de *S. aureus* según la escala de Duraffourd, con halos de inhibición promedio de 9,96 y 8,78 al 80 % y de 12,12 y 12,21 al 100 % respectivamente. La CMI del aceite esencial de *P. cajamarcanum* fue de 37,284 mg/mL y la CMB fue de 41,01 mg/mL; en cambio, la CMI del aceite esencial de *S. lanicaulis* fue de 42.168 mg/mL y la CMB fue de 50,60 mg/mL. Se concluyó que los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis* al 80 % y 100 % presentan una sensibilidad baja sobre los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos.

Palabras clave: *Piper cajamarcanum*, *Salvia lanicaulis*, *Staphylococcus aureus*, efecto antibacteriano, aceite esencial.

Abstract:

In this work, the objective was to determine the antimicrobial effect of *Piper cajamarcanum* and *Salvia lanicaulis* essential oils against antimicrobial resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Isolates were obtained from patient samples from HRDC; also, essential oil was obtained by steam distillation and its physicochemical characteristics were analyzed. Its inhibitory effect was evaluated using Kirby Bauer's methodology using concentrations of essential oil at 20 %, 40 %, 60 %, 80 % and 100 %, and its minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using the macrodilution method in liquid medium. It was found that both the essential oil of *P. cajamarcanum* and *S.lanicaulis* at concentrations of 80 % and 100 % presented an inhibitory effect on *S. aureus* isolates according to the Duraffourd scale, having inhibition halos with an average of 9,96 and 8,78 at 80 % and 12,12 and 12,21 at 100 %, respectively. Likewise, it was determined that the MIC of the essential oil of *P. cajamarcanum* was 37,284 mg/mL and the CMB was 41,01 mg/mL; on the other hand, the MIC of the essential oil of *S.lanicaulis* was 42,168 mg/mL and the CMB was 50,60 mg/mL. It was concluded that the essential oils of *P. cajamarcanum* and *S.lanicaulis* at 80 % and 100 % have antibacterial effect on antimicrobial resistant *S. aureus* isolates.

Keywords: *Piper cajamarcanum*, *Salvia lanicaulis*, *Staphylococcus aureus*, inhibitory effect, essential oil.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son las principales causantes de un gran número de enfermedades infecciosas en el mundo. En los últimos años, estas se han adaptado y han ido adquiriendo resistencia a múltiples antibacterianos que se utilizan para su control, convirtiéndose en un serio problema de salud pública. Uno de los casos más resaltantes es el de *S. aureus*, una bacteria Gram positiva que ha generado resistencia a múltiples antibióticos comerciales; este problema no es ajeno a nuestra localidad, pues en el año 2019 se ha reportado la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina (98,6 %), la ampicilina (98,6 %) y la vancomicina (1,4 %) en el Hospital Regional de Cajamarca (1).

Por otro lado, las plantas son ampliamente utilizadas por sus diversas propiedades medicinales. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en donde señala que la atención primaria de salud de hasta un 80 % de la población en países en desarrollo como el nuestro se basa en la medicina natural y tradicional (2). Sin embargo, su uso aún no es incorporado en las políticas de salud a nivel mundial por falta de evidencia científica. En los últimos años, se han desarrollado muchos estudios sobre las propiedades de los aceites esenciales y han demostrado “in vitro” tener una buena actividad antibacteriana, antifúngica, insecticida y antiviral (3).

Como una alternativa a esta problemática se encuentra a *P. cajamarcanum* (matico cajamarquino) y *S. lanicaulis* (salvia), dos plantas endémicas medicinales de la región, que son ampliamente utilizadas y comercializadas por los pobladores locales para tratar diversas enfermedades. Un estudio reciente reveló que las especies del género *Salvia* tiene diversas propiedades farmacológicas; entre ellas se incluyen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas y propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras (4). Especies del género *Piper* también presentan diversas propiedades biológicas y farmacológicas que incluyen actividades insecticidas, antibacterianas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, antihipertensivas, hepatoprotectoras, antitiroideas y antitumorales (5). Por lo tanto, es importante estudiar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas endémicas medicinales de nuestra región, para plantear un tratamiento alternativo basado en la elaboración de nuevos fitofármacos que ayuden a combatir enfermedades infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto antibacteriano “in vitro” de los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis* sobre el crecimiento de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos. Para lo cual, se obtuvieron aceites esenciales utilizando el método de arrastre con vapor en un destilador industrial a partir de muestras vegetales recolectadas en distintos puntos de la región de Cajamarca. Así mismo, los aislamientos microbiológicos de *S. aureus* fueron obtenidos de muestras de pacientes adultos (secreción bronquial, secreción faríngea, orina y absceso) del Hospital Regional de Cajamarca. El efecto antibacteriano sobre los aislamientos y sobre la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 se evaluó con el método de difusión en agar con disco, siguiendo el protocolo establecido para

este tipo de trabajos. Finalmente, todos los datos obtenidos fueron procesados haciendo uso del programa estadístico IBM SPSS, versión 27.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Gishen et al. en el año 2020, realizaron un estudio de seis plantas medicinales etíopes pertenecientes a las siguientes familias: Lamiaceae, Poaceae y Amaranthaceae. En este estudio determinaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de estas plantas frente a *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* utilizando la técnica de difusión en agar. Fueron observados halos de inhibición de 18 mm hasta 50 mm, concluyendo que los aceites esenciales de estas plantas tienen buena actividad antibacteriana y antifúngica (6).

Moumni et al., en el año 2020, investigaron la composición química y la actividad antibacteriana de cinco especies vegetales de la familia Lamiaceae de Túnez. La composición química la analizaron empleando cromatografía de gases - espectrometría de masas y la actividad antibacteriana la evaluaron mediante métodos de difusión en disco y dilución en microcaldo. Los resultados mostraron una actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Salmonella enterica*; y bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* y *S. aureus* (7).

Perigo et al. en el año 2016 realizaron un estudio para determinar la composición química y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de once especies de Piper de distintas áreas de selva tropical en el sureste de Brasil. Ellos determinaron que los compuestos más abundantes en los aceites esenciales fueron los monoterpenos y los sesquiterpenos, asociando a los monoterpenos como el limoneno y el cis β -ocimeno con la inhibición de *Staphylococcus*. Finalmente, ellos concluyeron que los aceites esenciales de la mayoría de

las especies de *Piper* investigadas exhiben actividad inhibidora contra bacterias patógenas in vitro, alcanzando hasta el 30 % de los niveles de inhibición de los antibióticos comerciales (5).

En el 2018, Ortega usó un diseño experimental y trabajó con diferentes concentraciones de aceites esenciales de Orégano y Tomillo para determinar su efecto antimicrobiano frente a una cepa ATCC de *S. aureus*; para esto empleó el método de difusión en disco y dilución en microcaldo para determinar la CMI. Concluyó que la concentración con mayor efecto inhibitorio fue la de 100 %, pues produjo halos de inhibición de 32,5 mm y 33 mm y que, por lo tanto, pueden ser utilizados en distintas formulaciones farmacéuticas (8).

Ponce en el 2019, realizó un trabajo de investigación para evaluar la actividad antibacteriana de aceite esencial de *Salvia sagittata Ruiz & Pav* en estado fresco y seco frente a *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923; sus resultados siguiendo el método de Kirby Bauer mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus* del 72,09 % y del 27,27 % frente a *E. coli*; concluyeron que el aceite esencial de *Salvia sagittata* tiene una mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (9).

Díaz en el año 2019, investigó la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre *S. aureus* ATCC 25923, el aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre de vapor a partir de 250 g de hojas seleccionadas. Los resultados mostraron halos promedio de inhibición de 15,28 mm empleando un antibiograma según la técnica de Kirby Bauer con discos en blanco. Sin embargo, en este estudio no se evalúa la actividad antibacteriana del aceite de *P. aduncum* en cepas bacterianas resistentes a antibacterianos (10).

Vigo en el año 2022 en su trabajo de investigación evaluó el efecto in vitro de los aceites esenciales y extractos vegetales de *Salvia macrophylla* L. (*Salvia*) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Lloque) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* utilizando la metodología de Kirby Bauer. Para obtener el aceite esencial de *Salvia* utilizó destilación por arrastre de vapor y obtuvo los extractos de *Salvia* y de lloque mediante extracción acuosa. Sus resultados mostraron que el aceite esencial de *Salvia* a la concentración del 100 % poseía un efecto inhibitorio en las cepas evaluadas, con halos de tamaño promedio de 9,5 mm; mientras que los extractos acuosos de *Salvia* y de lloque no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta bacteria. Concluyó que el aceite esencial de *Salvia* a la concentración del 100 % presenta un notable efecto inhibitorio in vitro sobre el crecimiento de *S. mutans* (11).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Clasificación taxonómica

S. aureus está clasificada dentro del Phylum de los *Firmicutes*, orden de los *Bacillales*, familia de los *Staphylococcaceae* y pertenece al género *Staphylococcus*, género bacteriano que cuenta con alrededor de 30 especies bacterianas que afectan a humanos y animales (12).

Características morfológicas y estructurales

S. aureus es un patógeno comensal, oportunista y potencialmente mortal, se encuentra colonizando las superficies de la piel y las mucosas de los seres humanos; es una bacteria Gram positiva aeróbica o anaerobia facultativa que puede resistir condiciones acidas, grandes variaciones de temperatura y altas concentraciones de sodio. Además de la piel y las mucosas, *S. aureus* puede sobrevivir en fómites, polvo y ropa por varios días. Algunas de sus

características más importantes son la producción de coagulasa extracelular, producción de catalasa, proteína A y un gran número de toxinas que favorecen su infección (13).

La pared celular de *S. aureus* está compuesta principalmente por una capa gruesa de peptidoglicano, polisacárido que contiene subunidades de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina unidos por enlaces β (1-4); además, contiene ácidos teicoicos que representan el 40 % del peso de la pared celular, ácidos lipoteicoicos y proteínas de membrana como la proteína A (13,14).

Posee una cápsula de naturaleza polisacárida de importancia clínica en humanos, está formada principalmente por los tipos de polisacáridos capsulares 5 y 8, esta cápsula está asociada a su patogenicidad pues facilita su adherencia a las células (14).

2.2.2 Patogenia

S. aureus es un patógeno responsable de infecciones asociadas a la atención médica y a entornos comunitarios, puede causar una gran variedad de infecciones piógenas y sistémicas, infecciones agudas y graves y síndromes mediados por toxinas. *S. aureus* cuenta con una gran variedad de factores de virulencia que incluyen adhesinas, enzimas, toxinas y proteínas de evasión inmunitaria; y puede tener una acción extracelular e intracelular, esta última, contribuye potencialmente a la persistencia bacteriana, la protección contra los antibióticos y la evasión de las defensas inmunitarias (15).

S. aureus tienen la capacidad de formar biopelículas en fómites y dispositivos médicos, las biopelículas son comunidades microbianas que se caracterizan por excretar una matriz extracelular protectora compuesta principalmente de exopolisacáridos, proteínas o ADN externo, la formación de estas biopelículas altera algunas de sus especificaciones fenotípicas,

como la expresión génica, la producción de proteínas y la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (16).

2.2.3 Diagnóstico

La infección por *S. aureus* puede diagnosticarse mediante técnicas microbiológicas tradicionales como: la utilización de medios selectivos y diferenciales, técnicas de tinción y pruebas bioquímicas; o mediante técnicas moleculares como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), microarrays y técnicas de secuenciación (17).

Medios de Cultivo

El Agar Baird-Parker (BP) es uno de los medios de cultivo más utilizados para la identificación de *S. aureus*, está compuesto por cloruro de litio, telurito de potasio y yema de huevo. La presencia de *S. aureus* se evidencia por la formación de colonias negras con un halo transparente a su alrededor; el color negro se debe a la reducción del telurito y el halo transparente a la acción enzimática de la lecitinasa sobre la yema de huevo (17).

Otro medio de cultivo importante es el Agar Manitol Salado. Este es un medio de cultivo selectivo y es ampliamente utilizado para el aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas. *S. aureus* fermenta el manitol formando colonias amarillas en el medio, además, gracias a sus altas concentraciones de NaCl (7,5 % - 10 %) inhibe parcial o totalmente el crecimiento de otras bacterias (18).

También encontramos al Agar Sangre, este medio de cultivo se utiliza para el aislamiento de *Staphylococcus* spp. a partir de muestras clínicas. *S. aureus* produce colonias amarillas, circulares y de tamaño mediano rodeadas por un halo claro que indica actividad hemolítica (17).

Pruebas Bioquímicas

Dentro de las pruebas bioquímicas tenemos la prueba de la coagulasa, esta prueba permite identificar a *S. aureus* en muestras clínicas debido a que es la única especie presente en humanos que es capaz de coagular el plasma. La coagulasa es una proteína que convierte el fibrinógeno en fibrina formando un coágulo visible, es importante leer la prueba después de 4 horas de incubación porque algunas cepas pueden producir fibrinolisisina en periodos largos de incubación (17,18).

Otra de las pruebas importantes para identificar *S. aureus* es la prueba de la catalasa; esta prueba bioquímica permite diferenciar a los estafilococos de los estreptococos. *S. aureus* libera burbujas al estar en contacto con peróxido de hidrógeno (catalasa positiva), esto se debe a la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno por acción de la catalasa (18).

2.2.4 Tratamiento y Resistencia a Antimicrobianos

Por lo general, las infecciones por *S. aureus* se tratan con antibióticos; los antibióticos comerciales más utilizados son: la vancomicina, linezolid, tedizolid, quinupristina más dalfopristina, ceftarolina, y telavancina o daptomicina; sin embargo, en los últimos años, se han identificado una amplia variedad de genes de resistencia que han permitido a este patógeno generar resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos comerciales que se utilizan para su control (19).

2.2.5 Mecanismos de Resistencia

Los principales mecanismos de resistencia a antimicrobianos por *S. aureus* especificados en la literatura son, la inactivación y modificación enzimática, el eflujo activo y la modificación de los sitios diana celulares de los agentes antimicrobianos.

S. aureus presenta dos mecanismos de resistencia a los β - lactámicos, la inactivación enzimática por una β -lactamasa codificada por el gen blaZ que hidroliza el anillo β – lactámico de la penicilina y la modificación del sitio diana de los antimicrobianos por los genes MecA y MecC; que son genes que modifican a la proteína de unión a penicilina (PBP) en la pared celular bacteriana, previniendo así la acción de los β – lactámicos; estos genes también están involucrados en la resistencia a la meticilina (20).

S. aureus también ha generado resistencia a las tetraciclinas, el mecanismo de resistencia que emplea es el eflujo activo, que promueve la excreción del fármaco hacia el medio extracelular. Los genes involucrados en el eflujo activo de las tetraciclinas son: tet (K) y tet (L), que en su mayoría son transmitidos por elementos genéticos móviles como los plásmidos; estos codifican proteínas de salida asociadas a la membrana de la superfamilia facilitadora principal (MFS), familia de proteínas que facilitan la salida de solutos a través de la membrana celular (19).

En los últimos años, son más los reportes de cepas de *S. aureus* que han adquirido resistencia a la vancomicina, la vancomicina actúa uniéndose al dipéptido terminal D-alanil-D-alanina del precursor del péptidoglucano, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Sin embargo, *S. aureus* mediante los genes VanA codifican el depsipéptido D-Alanina-D-lactato que tiene mucha menor afinidad por la vancomicina (19).

2.2.6 *Piper cajamarcanum* Yunk

P. cajamarcanum pertenece al Reino: *Plantae*, a la División: *Tracheophyta*, a la Clase: *Magnoliopsida*, al Orden: *Piperales*, a la Familia: *Piperaceae* y al Género: *Piper*.

P. cajamarcanum es un arbusto que puede alcanzar los 6 metros de altura, presenta hojas suaves, redondas de aproximadamente 10 – 20 cm de largo y una inflorescencia de espiga simple de color marrón. Fue reportada en el distrito de Colasay, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca, se encuentra de manera silvestre en bosques andinos a 2700 m.s.n.m (21,22).

Los componentes más frecuentes de los aceites esenciales del género *Piper* son los sesquiterpenos y monoterpenos como: el espatulenol, el valenciano, α -pineno, β -pineno, γ -cadineno, trans- cariofileno, óxido de cariofileno, δ -cadineno, trans - β -ocimeno, linalol, epi - α -cadinol, limoneno, cis - β -ocimeno, α -copaeno, germacreno D, α -muuroleno, deshidro - aromadreno, γ - gurjunen, canfeno, germacreno B, trans - cariofileno, β -felandreno, etc. En cuanto a su composición fenilpropanoide, los componentes más abundantes son: la asaricina y el safrol. Esta composición puede variar dependiendo de la especie y de su origen (5).

El género *Piper* tiene diversas actividades biológicas y farmacológicas que incluyen: actividades insecticidas, antibacterianas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, antihipertensivas, hepatoprotectoras, antitiroideas y antitumorales (5).

2.2.7 *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva

Salvia lanicaulis pertenece al Reino: *Plantae*, a la División: *Tracheophyta*, a la Clase: *Magnoliopsida*, al Orden: *Lamiales*, a la Familia: *Lamiaceae* y al Género: *Salvia*, género que incluye a casi 1000 especies vegetales (4).

S. lanicaulis es una especie arbustiva del norte del país, se encuentra de manera silvestre en laderas rocosas y suelos calizos de los valles interandinos a una altitud que varía desde los 3300 a 4000 m.s.n.m, esta especie solo se ha registrado en Cajamarca y La Libertad. Es un arbusto de 50 a 120 cm de alto, con tallos y hojas densamente cubiertas con pelos de color blanco y lanosos cuando son jóvenes, cambiando a beige en las hojas más viejas; presenta cálices densamente cubiertos de glándulas pegajosas de color púrpura de 1 mm de largo y flores de 2 cm de largo color magenta (23,24).

De manera general, la composición química del aceite esencial de *Salvia* spp. se compone de: monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados, compuestos cicloalifáticos (compuestos no terpenoides estructuralmente relacionados con los terpenos cíclicos) y compuestos aromáticos (4).

Dado que el género *Salvia* incluye casi 1000 especies, la composición de su aceite esencial puede variar según su origen y según diversos factores extrínsecos e intrínsecos tales como: las prácticas agrícolas, la intensidad de la luz, la edad de los órganos y el tipo de órgano (hojas, tallos, flores, raíces), la etapa de crecimiento y desarrollo, y la época de su cosecha (verano, invierno, primavera, otoño) (4).

En la medicina tradicional, especies vegetales del género *Salvia* han sido utilizadas como: espasmolítico, astringente, antiséptico, tratamiento sintomático de molestias dispépticas leves como ardor de estómago e hinchazón, tratamiento sintomático de inflamaciones en la boca o garganta, así como inflamaciones leves de la piel. Además, esta planta se ha utilizado tradicionalmente para tratar problemas gastrointestinales, resfriados y tos. Hoy en día, se vienen realizando múltiples investigaciones en plantas del género *Salvia* evidenciando diversas actividades farmacológicas, incluyendo actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas y actividades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras (4).

2.2.9 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son un conjunto de sustancias químicas volátiles producidas naturalmente por las plantas como metabolitos secundarios, por lo general estos se almacenan en cavidades, células secretoras, células epidérmicas, canales o tricomas glandulares de flores, brotes, tallos, hojas, semillas, ramas, raíces, frutos y corteza. En las plantas cumplen funciones de defensa, protegiéndolas de insectos, hongos, bacterias y animales herbívoros; además cumplen un papel muy importante en la atracción de polinizadores (3).

Los aceites esenciales solo se encuentran en plantas aromáticas que pertenecen a las siguientes familias: Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae y Piperaceae. Los aceites esenciales de estas plantas aromáticas han demostrado tener propiedades antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales; siendo ampliamente utilizados en industrias farmacéuticas, cosméticas, alimentarias y agrícolas (25).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles de hasta 100 compuestos químicos orgánicos que comprenden principalmente constituyentes derivados de los terpenos, compuestos formados por unidades de isopreno (5 átomos de carbonos). Dentro de los terpenos, resaltan los monoterpenos (10 átomos de carbono), que representan más del 80 % de la composición de los aceites esenciales y los sesquiterpenos (15 átomos de carbono), estos monoterpenos y sesquiterpenos pueden ser, a su vez, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, y también oxigenados y no oxigenados. Además de terpenos, los aceites esenciales pueden contener compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (25).

Una de las propiedades más importantes de los aceites esenciales es su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha determinado que los aceites esenciales dañan la pared celular microbiana, alteran la bicapa de fosfolípidos de la membrana citoplasmática y dañan las proteínas de la membrana, lo que conduce a una mayor permeabilidad de la membrana celular y a una pérdida de contenido celular (25). Además, estos compuestos activos pueden interrumpir la fuerza protón motriz, el flujo de electrones y el transporte activo. También se ha reportado que los aceites esenciales y sus compuestos activos pueden dañar una variedad de sistemas enzimáticos que causan la inactivación o destrucción del material genético (4).

En cuanto a *S. aureus*, componentes como el carvacrol, han demostrado tener efectos específicos sobre la viabilidad y la morfología celular de las biopelículas. Como ya antes fue mencionado, la formación de biopelículas es uno de los mecanismos patogénicos implicados en las infecciones relacionadas con los dispositivos médicos y también es responsable de la resistencia a los antimicrobianos (26).

Los aceites esenciales pueden extraerse a partir de material vegetal fresco o seco por diversos métodos, el más utilizado es la destilación por arrastre con vapor de agua, este método puede durar entre 1 y 10 horas. Este método de extracción consiste en exponer los materiales vegetales a agua hirviendo con la finalidad de liberar el aceite esencial por evaporación, posteriormente los aceites esenciales se condensan, se recogen y se separan en un matraz llamado “Florentino”. La cantidad de aceite producido depende de la duración del tiempo de destilación, temperatura, presión y el tipo de material vegetal (27).

Uno de los inconvenientes de este método de extracción es que los aceites esenciales están expuestos a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo, esto puede alterar algunos compuestos químicos terpénicos importantes, que están involucrados con su actividad antibacteriana. Además, algunos de sus componentes orgánicos requieren rectificación (27).

2.2.10 Métodos de Estudio de Sensibilidad Microbiana

Los métodos de estudio de sensibilidad microbiana se clasifican en métodos cualitativos y cuantitativos, siendo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) métodos cuantitativos y el método Kirby Bauer o disco difusión un método cualitativo (12).

Método de Kirby Bauer

El método de Kirby Bauer o disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller Hinton (MH) previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos, una vez los discos impregnados se ponen en contacto con la superficie húmeda del agar MH, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde por el agar, formándose una gradiente de concentración. Después de

un periodo de incubación de 18 a 24 horas, los discos pueden aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano, que nos permite clasificar a un microorganismo como sensible o resistente (12).

Métodos de Dilución

Los métodos de dilución se han venido usando para la determinación de la CMI y la CMB de los antimicrobianos o aceites esenciales, para ello se utilizan tubos de ensayo que contienen concentraciones crecientes del antimicrobiano, el microorganismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos y la CMI es determinada después de un proceso de incubación a 37° C por 24 horas (28).

2.3 Definición de Términos Básicos

- Aceite esencial: Conjunto de sustancias químicas volátiles producidas naturalmente por las plantas como metabolitos secundarios (3).
- Antibacteriano: Sustancias naturales o sintéticas que suprimen el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas (18).
- Concentración mínima inhibitoria (CMI): Se refiere a la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano (28).
- Concentración mínima bactericida (CMB): La CMB se define como la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9 % de una población bacteriana (28).

CAPITULO III

DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS

3.1 Nivel de Investigación

Descriptivo

3.2 Tipo y Diseño de Estudio

Tipo de Estudio: Investigación Básica

Diseño de Estudio: Experimental

3.3 Material Biológico

- Aislamientos de *S. aureus* obtenidos de muestras de pacientes adultos (secreción bronquial, secreción faríngea, orina y absceso).
- Cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC 29213).
- Hojas frescas de *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva.
- Hojas frescas de *Piper cajamarcanum* Yunk.

3.4 Lugar de Muestreo

- Las hojas frescas de *Salvia lanicaulis* fueron colectadas en las inmediaciones del centro poblado Progreso la Toma; distrito La Encañada, provincia de Cajamarca, ubicado a una altitud de 3622 m.s.n.m, latitud sur 7° 3' 38.3" S, longitud oeste 78° 17' 3.7" W.
- Por otro lado, las hojas de *Piper cajamarcanum* fueron colectadas en el distrito de Colasay, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca, ubicado a una altitud de 1775 m.s.n.m. latitud sur 5°58'36.8"S, longitud oeste 79°03'57.7"W.

- Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron obtenidos de muestras de pacientes adultos atendidos y hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca (HRDC).

3.5 Toma de Muestras

3.5.1 Muestras Vegetales

Se colectaron aproximadamente 10 kg de hojas frescas de *S. lanicaulis* (salvia) y también de *Piper cajamarcanum* (matico cajamarquino) en bolsas herméticas, las cuales fueron trasladadas en cajas de tecnopor hasta Cajamarca para la extracción de sus aceites esenciales. Además, se colectaron muestras representativas de las plantas en una prensa de madera para su identificación taxonómica en el laboratorio de Botánica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.5.2 Aislamientos de *S. aureus* de pacientes atendidos en el HRDC

Los aislamientos de *S. aureus* de los pacientes atendidos en el HRDC fueron entregados y sembrados en viales preparados con 4 mL de agar base sangre por el personal de salud del laboratorio de Microbiología del HRDC; inmediatamente fueron transportados respetando la cadena de frío hasta el laboratorio de Microbiología (1D-107) del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca, donde fueron procesados para su evaluación y corroboración correspondiente.

3.6 Obtención de los aceites esenciales de *S. lanicaulis* y *P. cajamarcanum*

3.6.1 Selección de la muestra vegetal

Después de la recolección de las hojas de *S. lanicaulis* y *P. cajamarcanum* se lavaron con agua potable para eliminar la presencia de polvo y pequeños insectos; se seleccionaron las hojas, teniendo como criterio de exclusión a aquellas deterioradas por las condiciones ambientales y por plagas (bacterias, hongos e insectos). Posteriormente se trasladó el material vegetal al Laboratorio de Farmacia y Bioquímica del Instituto Superior Tecnológico Privado Normedic (antes UPAGU) para la obtención de los aceites esenciales.

3.6.2 Obtención del aceite esencial de *S. lanicaulis*

Una vez que las hojas de *S. lanicaulis* fueron seleccionadas, se procedió a obtener su aceite esencial en un destilador industrial por el método de arrastre con vapor. Para ello, primero se agregaron 20 litros de agua en el taque generador de vapor; luego se pesó y se agregó 7 kg de hojas de *S. lanicaulis* en el contenedor de la muestra. Posteriormente, se acoplaron las partes del destilador industrial (Tanque generador de vapor, contenedor de la muestra vegetal, refrigerante y pera de decantación) para iniciar con la extracción por un tiempo de 2 horas. Durante todo este tiempo fue necesario ir eliminando el hidrolato de la pera de decantación del equipo para quedarnos solamente con el aceite esencial. Finalmente, el aceite esencial de *S. lanicaulis* extraído fue guardado en un frasco de vidrio, color ámbar, y fue conservado a 4° C en una refrigeradora.

3.6.3 Obtención del aceite esencial de *P. cajamarcanum*

Para la obtención del aceite esencial de *P. cajamarcanum* se realizó el mismo procedimiento de extracción (método de arrastre con vapor en el destilador industrial). Al igual que el aceite de *S. lanicaulis*; el aceite esencial de *P. cajamarcanum* extraído también fue guardado en un frasco de vidrio, color ámbar, y fue conservado a 4° C en una refrigeradora.

3.6.4 Preparación de las concentraciones de los aceites esenciales de *S. lanicaulis* y *P. cajamarcanum*

Para obtener diferentes concentraciones (100 %, 80 %, 60 %, 40 % y 20 %) de los aceites esenciales de *S. lanicaulis* y de *P. cajamarcanum* se utilizó dimetilsulfóxido al 10 % (DMSO). Para el cálculo fue aplicada la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

En donde:

C₁: Concentración inicial (%)

V₁: Volumen inicial (mL)

C₂: Concentración final (%)

V₂: Volumen final (mL)

3.7 Reconocimiento e identificación de aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos

Todos los aislamientos de *S. aureus* obtenidos del HRDC por el personal de microbiología, pasaron por un proceso de corroboración mediante la prueba de la coagulasa; cada aislamiento fue sembrado en placas con agar base sangre una noche anterior para obtener colonias aisladas; con la ayuda de una jeringa estéril se puso 0,5 mL de plasma sanguíneo en cada tubo y usando un asa estéril se emulsificaron 3 a 5 colonias de cada aislamiento en el plasma. Finalmente, todos los tubos fueron incubados a 37° C en baño maría durante 4 horas;

observándose cada 30 minutos la presencia o ausencia de coágulos. Una vez que los aislamientos de *S. aureus* fueron corroborados; se guardaron por duplicado en viales de conservación conteniendo 10 mL de agar base sangre en la refrigeradora para los siguientes procedimientos (ver Apéndice N° 3).

Para determinar si los aislamientos de *S. aureus* son resistentes a antimicrobianos se realizó un antibiograma con el método de Kirby Bauer utilizando discos con antibióticos de gentamicina, ceftriaxona, tetraciclina, cefoxitina, eritromicina, ciprofloxacino, amoxicilina, penicilina y trimetoprim-sulfametoxazol. Después de un periodo de incubación por 24 horas a 37° C, se midieron los halos y se determinó si los aislamientos de *S. aureus* presentaban resistencia a los antibióticos mencionados (Ver Apéndice N° 4).

3.8 Evaluación del efecto antibacteriano: Método de Difusión en agar con disco o Kirby Bauer.

Para determinar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales sobre los aislamientos de *S. aureus* se empleó el método de Kirby Bauer; para ello, se preparó agar Mueller Hinton siguiendo las instrucciones del fabricante, se autoclavó y se sirvió en placas Petri hasta alcanzar aproximadamente 4 mm de grosor. Por otro lado, se preparó el inóculo bacteriano de un cultivo de 24 horas, teniendo en cuenta el estándar de 0,5 de la escala de Mc Farland. Pasados 15 minutos de la preparación del inóculo bacteriano, se sumergió un hisopo estéril y se inoculó en la superficie seca de las placas con agar Mueller Hinton, se estrió con el hisopo en tres direcciones asegurando una distribución uniforme del inóculo. Luego, se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar exceso de humedad; posteriormente y

con la ayuda de una pinza estéril se colocó sobre la superficie del agar discos embebidos con 15 uL de las concentraciones (100 %, 80 %, 60 %, 40 % y 20 %) de los aceites esenciales de *S. lanicaulis* y de *P. cajamarcanum*. Se utilizó como control positivo a discos de vancomicina (30 ug) y como control negativo discos embebidos con DMSO al 10 %; cada disco se colocó a una distancia no menor de 25 mm. Finalmente, después de una incubación por 24 horas a 37° C se midieron los halos de inhibición con la ayuda de una regla y se determinó el efecto antibacteriano frente a los aislamientos de *S. aureus* teniendo en cuenta la escala de Duraffourd para los aceites esenciales (Resistente < 8 m, Sensibilidad baja 9-14 mm, Sensibilidad media 15-19 mm y Sumamente sensible > 20 mm)(29). Todos estos procedimientos se realizaron por triplicado.

3.9 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Método de Macrodilución en medio líquido.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada aceite esencial se empleó el método de macro dilución en medio líquido; para ello se preparó en un matraz una solución madre de 10 mL que contenía: 1 mL del aceite esencial, 1 mL de dimetil sulfóxido al 10 % y 8 mL de caldo Mueller Hinton. La concentración del aceite esencial (mg/mL) en la solución madre, se calculó teniendo en cuenta la densidad del aceite esencial según lo descrito por Arias Choque en el año 2013 (30) .

Una vez que se determinó la concentración del aceite esencial en la solución madre, se sirvió la solución madre en tubos de ensayo aumentando 100 uL en cada tubo, así mismo, la batería de tubos de ensayo se completó con 500 uL de inóculo bacteriano de la cepa de referencia (ATCC 29213) y con caldo Mueller Hinton hasta completar un volumen total de 2500 uL.

Así mismo, se calculó la concentración del aceite esencial en cada tubo de ensayo (ver Apéndice N°8).

Finalmente, se incubaron todos los tubos durante 24 horas a 37° C; cumplido el tiempo de incubación se determinó la CMI del aceite esencial que fue la concentración en mg/mL del aceite esencial que inhibió el crecimiento del inóculo bacteriano, esto se evidenció por la ausencia de turbidez en el tubo después del periodo de incubación.

3.10 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se tomaron 100 uL de los tubos que no presentaron turbidez en la CMI y se sembró con la ayuda de un asa de Drigalsky en placas con agar Mueller Hinton, después de un periodo de incubación a 37° C por 24 horas se procedió a contar las UFC. La CMB fue aquella que evidenció un crecimiento ≤ 1 UFC/placa.

3.11 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Todos los datos obtenidos fueron procesados y analizados en el programa estadístico IBM SPSS, versión 27. Se calculó las medidas de tendencia central y de dispersión del diámetro de los halos de inhibición; además, se aplicó la prueba de normalidad usando Shapiro Wilk a todos los halos de inhibición obtenidos. Para realizar las comparaciones de las medianas de los efectos antibacterianos entre las muestras problemas y controles se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, para determinar en que grupos se encontraban las diferencias significativas se utilizaron las pruebas POST HOC, la cual se trabajó con un nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Características Fisicoquímicas de los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis*.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del aceite esencial de *P. cajamarcanum* y del aceite esencial de *S. lanicaulis*.

Características Fisicoquímicas	Aceite esencial de <i>P. cajamarcanum</i>	Aceite esencial de <i>S. lanicaulis</i>
Volumen obtenido	5,4 mL	2,9 mL
Rendimiento	0,07 %	0,04 %
Densidad	0,9321 g/mL.	1,0542 g/mL.
Olor	Característico al de la planta	Característico al de la planta
Aspecto	Translúcido	Translúcido
Color	Amarillo Intenso	Amarillo pálido

4.1.2 Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *P. cajamarcanum*

El aceite esencial de *P. cajamarcanum* a diferentes concentraciones (100 %, 80 %, 60 %, 40 % y 20 %) fue probado sobre 10 aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos procedentes de los pacientes tratados en el HRDC y sobre la cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC 29213); utilizando como control positivo discos de vancomicina (30 ug) y como

control negativo discos con DMSO al 10 %, obteniéndose halos de inhibición de distintos diámetros (ver Tabla 2 y Apéndice N° 5).

Tabla 2. Diámetros promedio de los halos de inhibición producido por diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. cajamarcanum* sobre los aislamientos de *S. aureus*.

Código de la cepa	Diámetro de los halos (mm)						
	A.E.					VAN (30 ug)	DMSO 10%
	20%	40%	60%	80%	100%		
SA1518	6.67	6.67	7.67	10.00	11.67	17.00	6.00
SA1280	6.00	7.67	7.33	9.33	10.33	17.00	6.00
SA1383	6.00	6.33	7.33	10.30	12.67	19.00	6.00
SA9283	7.00	7.33	9.33	11.00	13.67	21.00	6.00
SA1301	6.00	6.00	6.67	10.00	11.67	18.00	6.00
SA10392	6.33	6.33	6.33	9.67	11.00	20.00	6.00
SA1495	6.00	6.00	7.33	7.33	11.00	19.00	6.00
SA1510	6.67	6.67	7.67	9.67	12.33	20.00	6.00
SA1277	6.33	6.67	8.33	10.30	11.67	19.00	6.00
SA1308	6.00	7.33	7.33	9.33	12.33	19.00	6.00
ATCC29213	8.33	11.00	11.70	12.70	15.00	17.00	6.00

A.E: Aceite esencial VAN: Vancomicina DMSO: Dimetilsulfóxido

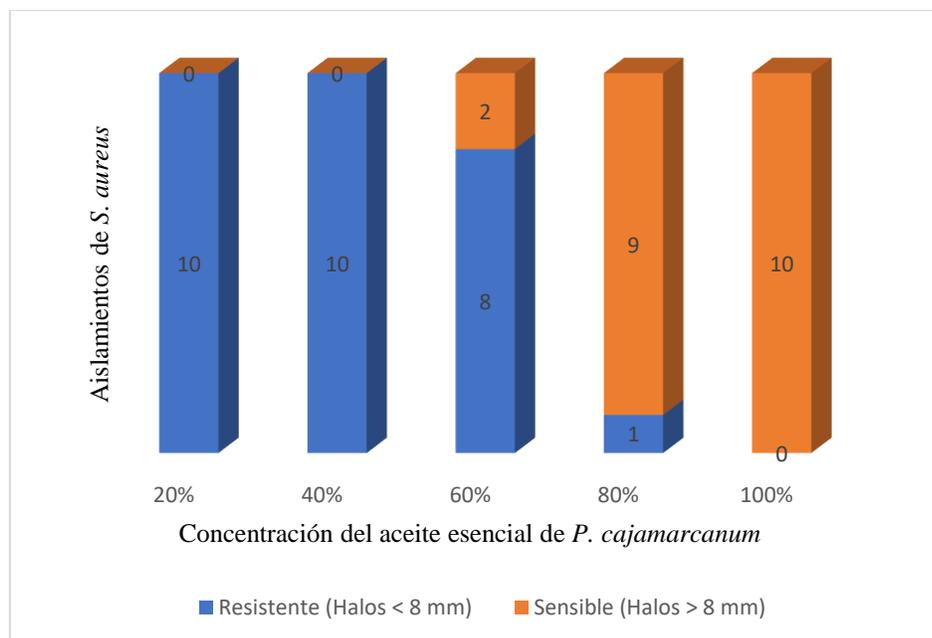


Figura 1. Efecto antibacteriano de los aislamientos de *S. aureus* producido por las concentraciones del aceite esencial de *P. cajamarcanum* teniendo en cuenta la escala de Duraffourd para los aceites esenciales.

De acuerdo con la escala de Duraffourd para los aceites esenciales, las concentraciones al 80 % y 100 % del aceite esencial de *P. cajamarcanum* presentaron sensibilidad baja sobre la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos, con diámetro de halos de inhibición mayor a 8 mm (ver Figura 1). Es importante resaltar que la cepa ATCC 29213 de *S. aureus* empleada como control positivo mostró sensibilidad baja a las concentraciones del 20 %, 40 %, 60 %, 80 % del aceite esencial de *P. cajamarcanum* y sensibilidad media a la concentración del 100 %. La prueba de Kruskal Wallis detectó diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición de la vancomicina con los halos de inhibición de los grupos estudiados ($p = 0.00$) (Ver Apéndice N°10).

Tabla 3. Medidas descriptivas de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. cajamarcanum*, la vancomicina y el DMSO sobre aislamientos de *S. aureus*.

Grupo	Media	Mediana	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
AEPC 20%¹	6.48	6.33	0.70	6.00	8.33
AEPC 40%²	7.06	6.67	1.32	6.00	10.36
AEPC 60%³	7.91	7.33	1.47	6.33	11.67
AEPC 80%⁴	9.96	10.00	1.28	7.33	12.67
AEPC 100%⁵	12.21	12.33	0.99	10.67	14.33
VAN⁶	18.73	19.00	1.34	17.00	21.00
DMSO 10%⁷	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00

AEPC: Aceite esencial de *P. cajamarcanum*; VAN: Vancomicina;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

Valores con números distintos demuestran diferencias significativas entre los grupos, prueba de Kruskal Wallis (p = 0.000)

4.1.3 Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. lanicaulis*

Al igual que el aceite esencial de *P. cajamarcanum*, el aceite esencial de *S. lanicaulis* a diferentes concentraciones (100 %, 80 %, 60 %, 40 % y 20 %) también fue probado sobre 10 aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos procedentes de los pacientes tratados en el HRDC y sobre la cepa de referencia de *S. aureus* (ATCC 29213); utilizando como control positivo discos de vancomicina (30ug) y como control negativo discos con DMSO al

10 %, obteniéndose halos de inhibición de distintos diámetros (ver Tabla 3 y Apéndice N° 6).

Tabla 4. Diámetros promedio de los halos de inhibición producido por diferentes concentraciones del aceite esencial de *S. lanicaulis* sobre los aislamientos de *S. aureus*.

Código de la cepa	Diámetro de los halos (mm)						
	A.E.					VAN 30 ug	DMSO 10%
	20%	40%	60%	80%	100%		
SA1518	6.00	6.00	7.00	9.33	12.67	18.00	6.00
SA1280	6.00	6.00	7.33	7.67	10.67	17.00	6.00
SA1383	6.00	6.00	7.33	8.33	11.33	18.00	6.00
SA9283	6.00	6.00	7.33	9.67	14.33	20.00	6.00
SA1301	6.00	6.00	7.67	9.00	13.00	17.00	6.00
SA10392	6.00	6.00	7.67	8.00	12.33	20.00	6.00
SA1495	6.00	6.00	7.33	8.67	11.33	19.00	6.00
SA1510	6.00	6.00	7.33	9.00	11.67	19.00	6.00
SA1277	6.00	6.00	8.33	8.33	12.67	20.00	6.00
SA1308	6.00	6.00	7.67	8.67	12.00	19.00	6.00
ATCC29213	6.00	6.00	8.33	10.00	12.33	17.00	6.00

A.E: Aceite esencial VAN: Vancomicina DMSO: Dimetilsulfóxido

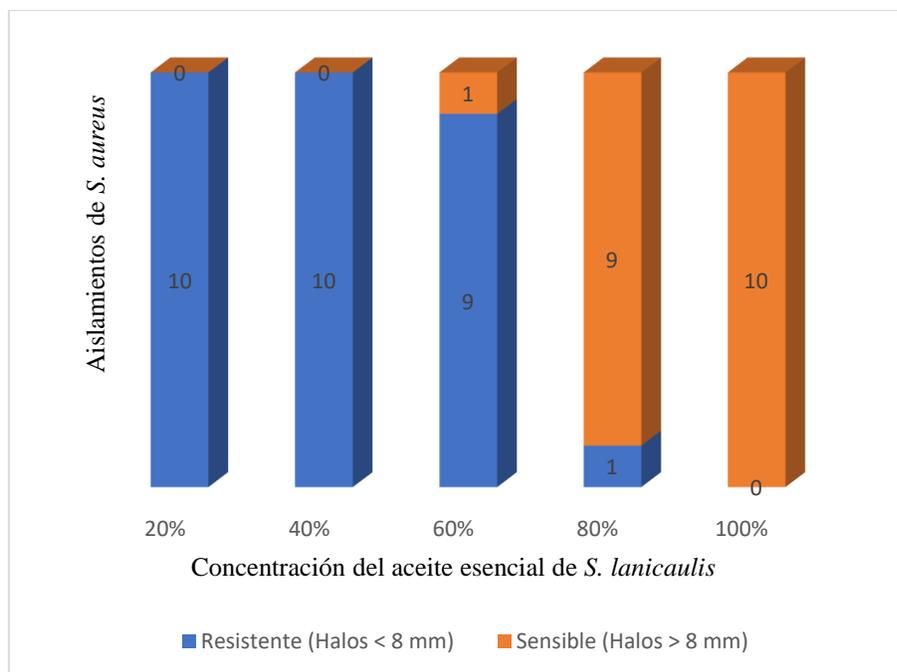


Figura 2. Efecto antibacteriano de los aislamientos de *S. aureus* producido por las concentraciones del aceite esencial de *S. lanicaulis* teniendo en cuenta la escala de Duraffourd.

En cuanto al aceite esencial de *S. lanicaulis* se puede afirmar teniendo en cuenta la escala de Duraffourd para los aceites esenciales, que la concentración al 100 % presentó sensibilidad baja sobre todos los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos, con halos de inhibición con diámetro mayor o igual a 8 mm. A diferencia del aceite esencial de *P. cajamarcanum*, la cepa ATCC 29213 de *S. aureus* utilizada presentó sensibilidad baja a las concentraciones del 60 %, 80 % y 100 % del aceite esencial de *S. lanicaulis*. La prueba de Kruskal Wallis detectó diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición de la vancomicina con los halos de inhibición de los grupos estudiados ($p = 0.00$) (Ver Apéndice N°10).

Tabla 5. Medidas descriptivas de los halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *S. lanicaulis*, la vancomicina y el DMSO sobre los aislamientos de *S. aureus*.

Grupo	Media	Mediana	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
AESL 20%¹	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00
AESL 40%²	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00
AESL 60%³	7.57	7.33	0.42	7.00	8.33
AESL 80%⁴	8.78	8.67	0.70	7.67	10.00
AESL 100%⁵	12.21	12.33	0.99	10.67	14.33
VAN 30ug⁶	18.55	19.00	1.21	17.00	20.00
DMSO 10%⁷	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00

AESL: Aceite esencial de *S. lanicaulis*; VAN: Vancomicina; DMSO: Dimetilsulfóxido

Valores con números distintos demuestran diferencias significativas entre los grupos, prueba de Kruskal Wallis (p = 0.000)

4.1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Tabla 6. Prueba para determinar la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *P. cajamarcanum* frente a *S. aureus* ATCC 29213.

N° Tubo	Concentración (mg/mL)	Turbidez
1	3.7284	(+)
2	7.4568	(+)
3	11.1852	(+)
4	14.9136	(+)
5	18.6420	(+)
6	22.3704	(+)
7	26.0988	(+)
8	29.8272	(+)
9	33.5556	(+)
10	37.2840	(-)
11	41.0124	(-)
12	44.7408	(-)
CP	-	(+)
CN	-	(-)

**CP: Control Positivo CN:
Control Negativo**

Tabla 7. Prueba para determinar la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *S. lanicaulis* frente a *S. aureus* ATCC 29213.

N° Tubo	Concentración (mg/mL)	Turbidez
1	4.2168	(+)
2	8.4336	(+)
3	12.6504	(+)
4	16.8672	(+)
5	21.084	(+)
6	25.3008	(+)
7	29.5176	(+)
8	33.7344	(+)
9	37.9512	(+)
10	42.168	(-)
11	46.3848	(-)
12	50.6016	(-)
CP	-	(+)
CN	-	(-)

**CP: Control Positivo CN: Control
Negativo**

Las tablas 6 y 7 muestran la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis* frente a la cepa ATCC 29213 de *S. aureus*; se pudo observar que a partir del tubo número 10 se inhibe el crecimiento bacteriano porque no se evidenció turbidez después del periodo de incubación correspondiente. Por lo tanto, la CMI del aceite esencial de *P. cajamarcanum* para la ATCC 29213 fue de 37.284 mg/mL y la CMI del aceite esencial de *S. lanicaulis* para la ATCC 29213 fue de 42.168 mg/mL.

4.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Tabla 8. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *P. cajamarcanum* frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Nº Tubo	Placa	Concentración (mg/mL)	UFC/Placa	Observaciones
10	2	37.284	6	-
11	3	41.0124	0	CMB
12	4	44.7408	0	-
CP	5	-	>100	-
CN	6	-	0	-

CP: Control Positivo CN: Control Negativo

Teniendo como base los resultados de la Tabla 6, se tomaron los 3 últimos tubos en donde no se evidenció turbidez. Después de la siembra y del periodo de incubación correspondiente se determinó que en el tubo 11 a una concentración de 41.01 mg/mL se encuentra la concentración mínima bactericida (CMB); ya que se registra un crecimiento menor a una UFC/placa.

Tabla 9. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *S. lanicaulis* frente a *S. aureus* ATCC 29213.

N° Tubo	Placa	Concentración (mg/mL)	UFC/Placa	Observaciones
10	1	42.168	19	-
11	2	46.3848	3	-
12	3	50.6016	0	CMB
CP	4	-	>100	-
CN	5	-	0	-

CP: Control Positivo CN: Control Negativo

En cuanto al aceite esencial de *S. lanicaulis*, se tomaron los 3 últimos tubos en donde no se evidencio turbidez. Después de la siembra y del periodo de incubación correspondiente se determinó que en el tubo 12 a una concentración de 50.60 mg/mL se encuentra la concentración mínima bactericida (CMB); ya que se registró un crecimiento menor a una UFC/placa.

4.2 Discusión

El rendimiento de extracción del aceite de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis* fue de 0.07% y 0.04% respectivamente, este rendimiento es muy bajo considerando el rendimiento obtenido por otros investigadores en plantas que también pertenecen al mismo género (5,11); sin embargo, esto se puede deber a factores exógenos como la época del año en que se realizó la recolección de las hojas de las plantas (época seca en Cajamarca). En la investigación de Perigo, que recolectó 11 especies del género *Piper* en las cuatro estaciones del año se pudo observar que el rendimiento del aceite esencial de las especies vegetales estudiadas disminuía en verano y aumentaba en invierno y primavera; los rendimientos de los aceites esenciales de las especies oscilaron entre 1.84 y 0.18% (5). Además de la época del año, el rendimiento de los aceites esenciales también está relacionada con la parte de la planta que se utiliza para la extracción, esto dependerá de cada especie vegetal (27). Por lo tanto, al ser el primer estudio que se realiza en *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis*, considero importante extraer su aceite esencial en otras épocas del año y de otras partes de la planta (tallos, flores, raíces) con la finalidad de encontrar un rendimiento mucho más alto al obtenido y en un futuro realizar formulaciones farmacéuticas.

Los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis* mostraron en el presente estudio un efecto antimicrobiano a las concentraciones del 80 % y 100 % frente a los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antibacterianos; este resultado era de esperarse puesto que los aceites esenciales de otras especies vegetales que pertenecen a los géneros *Piper* y *Salvia* también han demostrado “in vitro” tener una buena actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y otros microorganismos (5,9–11,32). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está íntimamente relacionada por su composición química a base de

monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, estos compuestos alteran la organización de los lípidos en las membranas celulares bacterianas y de las mitocondrias, lo que provoca la fuga del contenido celular y pérdida de iones según Bandawy y sus colaboradores y Tariq y sus colaboradores (3,33). Estudios anteriores muestran que en los aceites esenciales de especies del género *Piper* resaltan compuestos químicos como: el germacreno, el limoneno y el cis - β -ocimeno (5,32,34). Estos monoterpenos fueron los compuestos con mayor correlación con la inhibición del crecimiento bacteriano, especialmente contra especies del género *Staphylococcus* en el estudio de Perigo y sus colaboradores (5).

Como ya se mencionó anteriormente, el aceite esencial de *S. lanicaulis* a las concentraciones al 80 y 100 % muestran un buen efecto antibacteriano (CMI: 42.16 mg/mL); esto se corrobora con otros estudios previos en donde también utilizaron aceites esenciales de plantas del género *Salvia*; así encontramos a Fahed y sus colaboradores que demostraron que el aceite esencial de *Salvia multicaulis*, una especie de *Salvia* endémica del Medio Oriente; tenía un buen efecto antibacteriano sobre las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 (CMI: 128 mg/mL), *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) ATCC 33591 (CMI: 128 mg/mL) y todas las especies de *Trichophyton* analizadas (CMI: 64 mg/mL). En su estudio, ellos atribuyeron al nerolidol (principal compuesto químico en el aceite esencial de *S. multicaulis* (12%)) como el responsable de su efecto antibacteriano (35). Por otra parte, Cutillas y sus colaboradores también encontraron un buen efecto antibacteriano en el aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (36).

El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los grupos probados (100, 80, 60, 40, 20 %) con el control positivo (vancomicina) en el aceite esencial de *P. cajamarcanum* y en el aceite esencial de *S. lanicaulis* (Valor de $p < 0.05$) (Ver apéndice N°10 Y N°11), esto se debe a que en la actualidad la vancomicina es uno de los tratamientos eficaces y es un fármaco de primera línea o de primera opción para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*; a pesar de que han empezado a aparecer aislamientos de *S. aureus* resistentes a la vancomicina, su porcentaje es bajo aún y su eficacia sigue siendo excelente según Zhang y colaboradores después de haber realizado un metaanálisis de la eficacia de la vancomicina sobre *S. aureus* el presente año (37).

Los aceites esenciales probados han demostrado tener un buen efecto antibacteriano y pueden ser un complemento a los antibióticos como lo sugiere Majeed y sus colaboradores, en donde la utilización del aceite esencial de *Nardostachys jatamansi* “Nardo” potenció la respuesta de antibióticos como la amoxicilina, la eritromicina, el cloranfenicol y la ampicilina contra microorganismos resistentes a los antibióticos (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus*); además, el aceite esencial redujo las CMI de los antibióticos entre 4 y 10,5 veces frente a los patógenos analizados (38). Teniendo como base estos hallazgos, es posible que la combinación de antibióticos con aceites esenciales de plantas como las empleadas en este trabajo de investigación pueden constituir una estrategia muy importante para abordar el problema de los microorganismos resistentes a antimicrobianos y dar como resultado el desarrollo de nuevos regímenes de tratamiento antibacteriano.

Finalmente, es importante considerar que en el presente estudio se utilizaron aislamientos clínicos de *S. aureus*, los cuales fueron sometidos a una prueba de susceptibilidad antimicrobiana utilizando 10 antibióticos diferentes, mostrando resistencia a por lo menos uno de los antibióticos probados (ver apéndice N°4). Por lo tanto, se puede reforzar las conclusiones de Iseppi y sus colaboradores que consideran a los aceites esenciales como un arma natural contra las bacterias resistentes a los antibióticos responsables de las infecciones nosocomiales como los enterococos resistentes a la vancomicina, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *E. coli* productora de β - lactamasas de espectro extendido (39).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El aceite esencial de *Piper cajamarcanum* a la concentración del 100 % presentó sensibilidad baja sobre todos los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos; la concentración al 80% presentó sensibilidad baja en 9 de los 10 aislamientos de *S. aureus* y la concentración al 60 % presentó sensibilidad baja únicamente en dos aislamientos y en la cepa control ATCC 29213; en cambio, las concentraciones al 40 y 20 % no presentaron ningún efecto antibacteriano.
- El aceite esencial de *Salvia lanicaulis* a la concentración del 100 % presentó sensibilidad baja sobre todos los aislamientos de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos; la concentración al 80% presentó sensibilidad baja en 9 de los 10 aislamientos de *S. aureus* y la concentración al 60 % presentó sensibilidad baja únicamente en un aislamiento y en la cepa control ATCC 29213; en cambio, las concentraciones al 40 y 20 % no presentaron ningún efecto antibacteriano.
- La CMI y la CMB para el aceite esencial de *Piper cajamarcanum* fue de 37,284 mg/mL y 41,01 mg/mL respectivamente; asimismo, la CMI y la CMB para el aceite esencial de *Salvia lanicaulis* fue de 42.168 mg/mL y 50.60 mg/mL.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un estudio cromatográfico para determinar la composición química de los aceites esenciales de *Piper cajamarcanum* y *Salvia lanicaulis*.
- Probar los aceites esenciales de *Piper cajamarcanum* y *Salvia lanicaulis* en otros microorganismos de importancia en salud pública, que presenten resistencia a antimicrobianos.
- Realizar estudios de la combinación de los aceites esenciales de *Piper cajamarcanum* y *Salvia lanicaulis* con antibióticos.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Cubas Alberca NL, Huaripata Vásquez YE. Susceptibilidad Bacteriana en cultivos de pacientes de la Unidad De Cuidados Intensivos En El Hospital Regional Docente De Cajamarca, 2016-2018. Repositorio Institucional UNJ. Universidad Nacional de Jaén; 2019. Available from: <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/225>
2. Soria N. Las Plantas Medicinales y su aplicación en la Salud Pública. Rev Salud Pública del Paraguay. 2018;8(1):7–8. Available from: <http://revistas.ins.gov.py/index.php/rspp/article/view/500>
3. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microb Pathog. 2019;134:103580. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
4. Sharifi-Rad M, Ozcelik B, Altın G, Daşkaya-Dikmen C, Martorell M, Ramírez-Alarcón K, et al. *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytotherapy. Trends Food Sci Technol. 2018;80:242–63.
5. Perigo CV, Torres RB, Bernacci LC, Guimarães EF, Haber LL, Facanali R, et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. Ind Crops Prod. 2016;94:528–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.028>
6. Gishen NZ, Taddese S, Zenebe T, Dires K, Tedla A, Mengiste B, et al. In vitro antimicrobial activity of six Ethiopian medicinal plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Eur J Integr Med. 2020;36:101121.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101121>

7. Moumni S, Elaissi A, Trabelsi A, Merghni A, Chraief I, Jelassi B, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some lamiaceae species essential oils from Tunisia. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):1–15.
8. Ortega Lozano AB. Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600”. Universidad Politécnica Salesiana; 2018. Available from: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15045/1/UPS-CT007429.pdf>
9. Ponce Porras GA. Composición química por cromatografía a gases y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia sagittata* Ruiz & Pav frente a la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [Internet]. Universidad Nacional Del Centro Del Perú; 2019. Available from: <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/5992>
10. Díaz Cieza C. Actividad antibacterina “in vitro” del aceite esencial de matico (*Piper aduncum*) sobre *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional de Jaén; 2019.
11. Vigo Lezma C. Efecto Antibacteriano "in vitro" de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (salvia) Y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Iloque) sobre *Streptococcus mutans*. Universidad Nacional de Cajamarca; 2022. Available from: <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/4715>
12. Seija V. Temas de Bacteriología y Virología médica. Segunda Ed. FEMUR, editor. Universidad de la República. Montevideo; 2006. 257–266 p.
13. Daum RS. *Staphylococcus aureus*. Fifth Edit. Principles and Practice of Pediatric

- Infectious Diseases. 2018. 692-706.e4 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00115-8>
14. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clínica. 2014;61(1):28–40.
 15. Becker K. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Institute of Medical Microbiology, University Hospital Münster, Münster, Germany. 2018. 13–38 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00002-4>
 16. Parastan R, Kargar M, Solhjoo K, Kafilzadeh F. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. Gene Reports. 2020;20.
 17. Ribeiro de Souza da Cunha M de L. Methods for the Identification, Characterization, and Tracking the Spread of *Staphylococcus aureus*. 2018. 105–125 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00006-1>
 18. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, metodos de identificacion. Rev Biomed. 2014;25(3):129–43.
 19. Feßler AT, Li J, Kadlec K, Wang Y, Schwarz S. Antimicrobial Resistance Properties of *Staphylococcus aureus*. 2018. 57–85 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00004-8>
 20. Castro-Orozco R, Villafaña-Ferrer L, Rocha-Jiménez J, Alvis-Guzmán N. Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*: tendencia temporal (2010-2016) y fenotipos de Multirresistencia, Cartagena (Colombia). Biosalud; 2018;17(2):25–36.

21. La Global Biodiversity Information Facility (GBIF). *Piper cajamarcanum* Yunck. <https://www.gbif.org/>. 1961. Available from: <https://www.gbif.org/es/occurrence/1257546450>
22. León B. Piperaceae endémicas del Perú. *Rev Peru Biol.* 2006.13(2):669–77.
23. La Global Biodiversity Information Facility (GBIF). *Salvia lanicaulis* Epling & Játiva. <https://www.gbif.org/>. 2010. Available from: <https://www.gbif.org/es/occurrence/1257646152>
24. Rodríguez M. Lamiaceae endémicas del Perú. *Rev Peru Biol.* 2006;13(2):371–9.
25. Asbahani A El, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm.* 2015;483(1–2):220–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
26. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(2):136–41.
27. Stratakos AC, Koidis A. Methods for extracting essential oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.* 2016. 31–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
28. Ramírez LS, Marin Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Sci Tech.* 2009;(42):263–8.
29. C. Duraffourd, J. C. Lapraz L d’ H. Cuadernos de fitoterapia clínica. Masson, editor. España; 1987.
30. Arias Choque TG. Actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de

- Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2013.
31. Organización Mundial de la Salud. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. OMS. 2020. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
 32. Valarezo E, Flores-Maza P, Cartuche L, Ojeda-Riascos S, Ramírez J. Phytochemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil extracted from Ecuadorian species *Piper ecuadorensis* sodiro. Nat Prod Res. 2021;35(24):6014–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813138>
 33. Badawy MEI, Marei GIK, Rabea EI, Taktak NEM. Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through in vitro and in silico studies. Pestic Biochem Physiol. 2019;158:185–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.008>
 34. Silva ACA, Diodato JS, Castro JW, Matias EFF, Silva LE, do Amaral W, et al. Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. J Photochem Photobiol B Biol. 2019;199:111604. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>
 35. Fahed L, Stien D, Ouaini N, Eparvier V, El Beyrouthy M. Chemical Diversity and Antimicrobial Activity of *Salvia multicaulis* Vahl Essential Oils. Chem Biodivers. 2016;13(5):591–5.

36. Cutillas A-B, Carrasco A, Martinez-Gutierrez R, Tomas V, Tudela J. *Salvia officinalis* L. Essential Oils from Spain: Determination of Composition, Antioxidant Capacity, Antienzymatic, and Antimicrobial Bioactivities. *Chem Biodivers.* 2017 1;14(8):e1700102. Available from: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700102>
37. Zhang G, Zhang N, Xu J, Yang T, Yin H, Cai Y. Efficacy and safety of vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents.* 2023;62(4):106946. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106946>
38. Majeed A, Guleria S, Sharma N, Salaria KH, Aiman F, Singh B, et al. Antioxidant capacity and combinatorial antimicrobial effects of *Nardostachys jatamansi* essential oil with conventional antibiotics against some drug resistant bacteria. *Curr Res Biotechnol.* 2023;5:100118. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.100118>
39. Iseppi R, Mariani M, Condò C, Sabia C, Messi P. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics.* 2021;10(4).

APÉNDICES

Apéndice N°1. Recolección de especies vegetales



Recolección de *Piper cajamarcanum* en el distrito de Colasay, provincia de Jaén,
departamento de Cajamarca.



Recolección de *Salvia lanicaulis* en el Centro Poblado Progreso La Toma, distrito de La
Encañada, provincia de Cajamarca.

Apéndice N°2. Obtención de los aceites esenciales



A: Piezas del destilador industrial; **B y C:** Armado del destilador industrial para la obtención de aceite esencial por el método de arrastre con vapor; **D:** llenado del tanque superior con el material vegetal para la obtención del aceite esencial; **E:** llenado del tanque inferior del destilador industrial con agua.

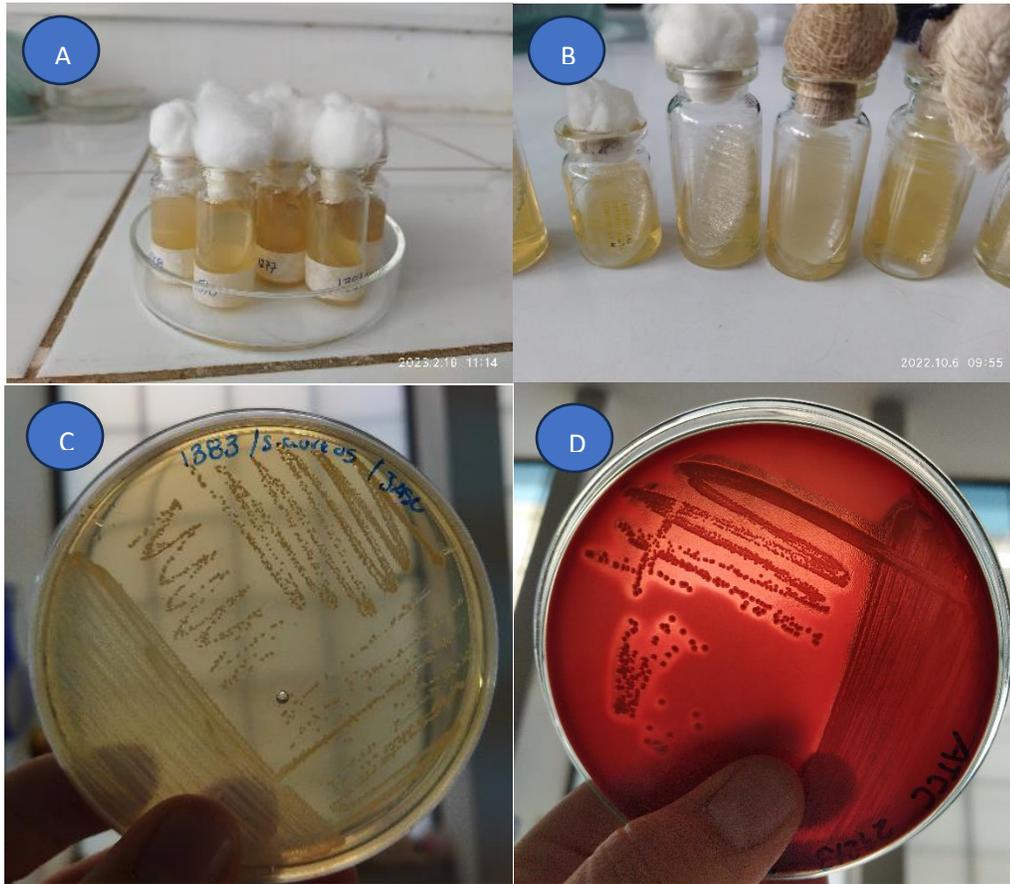


Obtencion de los aceites esenciales de *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis*.

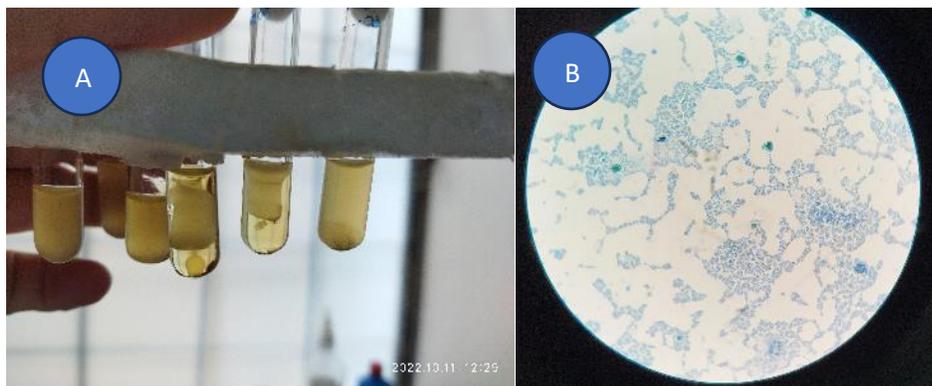


Pesado de un mL de cada aceite esencial para calcular su densidad.

Apéndice N°3. Obtención e identificación de los aislamientos de *S. aureus*.



A y B: Aislamientos de *S. aureus* en viales con agar sangre para su conservación; **C:** Aislamiento de *S. aureus* (SA1383) en placa con agar Base sangre; **D:** Reactivación de la cepa de referencia ATCC 29213 de *S. aureus* en agar sangre.



A: Prueba de la coagulasa de los aislamientos de *S. aureus*; **B:** Tinción Gram de los aislamientos de *S. aureus*.

Apéndice N°4. Determinación de la resistencia a diferentes antimicrobianos.

Código Cepa	Halos de Inhibición de los Antibióticos Probados (mm)									
	Gentamicina	Ceftriaxona	Tetraciclina	Cefoxitina	Eritromicina	Trimetoprim-Sulfametoxazol	Ciprofloxacino	Penicilina	Amoxicilina	Vancomicina
SA1518	24	11	34	12	23	31	24	10	12	17
SA1280	6	6	29	7	7	23	7	6	10	17
SA1383	17	7	31	7	7	31	7	7	26	19
SA9283	15	21	29	22	7	16	7	18	23	21
SA1301	7	7	31	7	7	22	9	7	13	18
SA10392	30	16	31	20	7	32	28	27	31	20
SA1495	20	6	6	15	6	27	24	8	12	19
SA1510	6	7	32	7	7	29	7	6	10	20
SA1277	19	18	31	24	10	31	29	16	19	19
SA1308	26	21	32	22	27	30	35	15	17	19

Antibiótico	Valores según la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)		
	Resistente	Intermedio	Sensible
Gentamicina	≤ 12	13 al 14	≥ 15
Ceftriaxona	≤13	14 al 20	≥ 21
Tetraciclina	≤14	15 al 18	≥19
Cefoxitina	≤14	15 al 17	≥18
Eritromicina	≤13	14 al 22	≥23
Trimetoprim-Sulfametoxazol	≤10	11 al 15	≥16
ciprofloxacino	≤15	16 al 20	≥21
Penicilina	≤28	-	≥29
Amoxicilina	≤13	14 al 17	≥18
Vancomicina	≤15	-	≥15



Antibiograma del aislamiento de *S. aureus* SA9283 y SA1510.

Apéndice N°5. Evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial de *P. cajamarcanum*

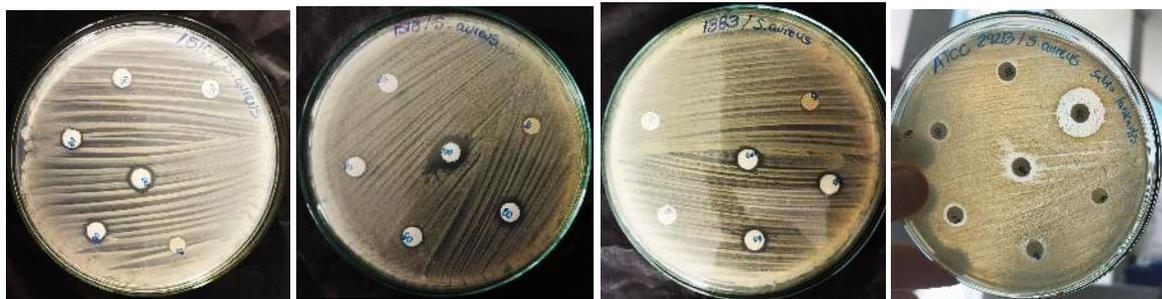
Código Cepa	A.E <i>P. cajamarcanum</i>																				Vancomicina		DMSO 10%			
	20%				40%				60%				80%				100%				I	P	I	II	III	P
	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	P	I	II	III	P
SA1518	7	7	6	6.7	7	7	6	6.7	8	7	8	7.67	9	11	10	10	11	13	11	11.67	17	17	6	6	6	6
SA1280	6	6	6	6	7	8	8	7.7	7	7	8	7.33	9	11	8	9.33	10	10	11	10.33	17	17	6	6	6	6
SA1383	6	6	6	6	6	6	7	6.3	8	7	7	7.33	10	10	11	10.3	12	12	14	12.67	19	19	6	6	6	6
SA9283	8	6	7	7	8	7	7	7.3	10	9	9	9.33	10	11	12	11	13	14	14	13.67	21	21	6	6	6	6
SA1301	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	6	6.67	9	10	11	10	11	11	13	11.67	18	18	6	6	6	6
SA10392	6	7	6	6.3	6	7	6	6.3	6	7	6	6.33	10	9	10	9.67	11	10	12	11	20	20	6	6	6	6
SA1495	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	8	7.33	8	7	7	7.33	10	12	11	11	19	19	6	6	6	6
SA1510	6	7	7	6.7	7	6	7	6.7	9	7	7	7.67	10	10	9	9.67	11	12	14	12.33	20	20	6	6	6	6
SA1277	6	7	6	6.3	7	7	6	6.7	9	7	9	8.33	11	9	11	10.3	13	10	12	11.67	19	19	6	6	6	6
SA1308	6	6	6	6	7	7	8	7.3	8	7	7	7.33	10	10	8	9.33	12	13	12	12.33	19	19	6	6	6	6
ATCC 29213	9	8	8	8.3	12	10	10	11	12	11	12	11.7	14	12	12	12.7	16	15	14	15	17	17	6	6	6	6



Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Piper cajamarcanum* sobre los aislamientos SA1277 y SA 1283; en la tercera imagen se puede observar a todos los aislamientos estudiados.

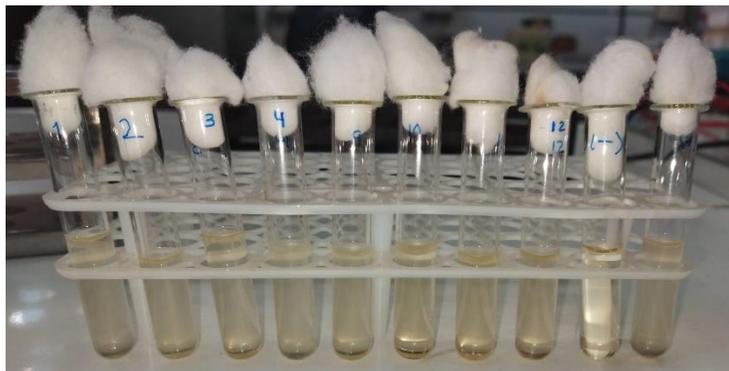
Apéndice N°6. Evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. lanicaulis*.

Código Cepa	A.E <i>S. lanicaulis</i>																				Vancomicina		DMSO 10%			
	20%				40%				60%				80%				100%				I	P	I	II	III	P
	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	II	III	P	I	P	I	II	III	P
SA1518	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7	10	8	10	9.33	13	13	12	12.67	18	18	6	6	6	6
SA1280	6	6	6	6	6	6	6	6	8	7	7	7.33	9	7	7	7.67	10	11	11	10.67	17	17	6	6	6	6
SA1383	6	6	6	6	6	6	6	6	8	6	8	7.33	9	7	9	8.33	10	12	12	11.33	18	18	6	6	6	6
SA9283	6	6	6	6	6	6	6	6	7	7	8	7.33	8	11	10	9.67	14	15	14	14.33	20	20	6	6	6	6
SA1301	6	6	6	6	6	6	6	6	8	7	8	7.67	9	8	10	9	13	13	13	13	17	17	6	6	6	6
SA10392	6	6	6	6	6	6	6	6	8	7	8	7.67	9	7	8	8	10	14	13	12.33	20	20	6	6	6	6
SA1495	6	6	6	6	6	6	6	6	8	7	7	7.33	9	9	8	8.67	10	12	12	11.33	19	19	6	6	6	6
SA1510	6	6	6	6	6	6	6	6	8	7	7	7.33	9	9	9	9	11	12	12	11.67	19	19	6	6	6	6
SA1277	6	6	6	6	6	6	6	6	9	7	9	8.33	10	7	8	8.33	14	11	13	12.67	20	20	6	6	6	6
SA1308	6	6	6	6	6	6	6	6	9	7	7	7.67	10	8	8	8.67	14	11	11	12	19	19	6	6	6	6
ATCC 29213	6	6	6	6	6	6	6	6	8	8	9	8.33	9	10	11	10	12	12	13	12.33	17	17	6	6	6	6



Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Salvia lanicaulis* sobre los aislamientos SA1510, SA1518, SA1383 y sobre la cepa ATCC 29213.

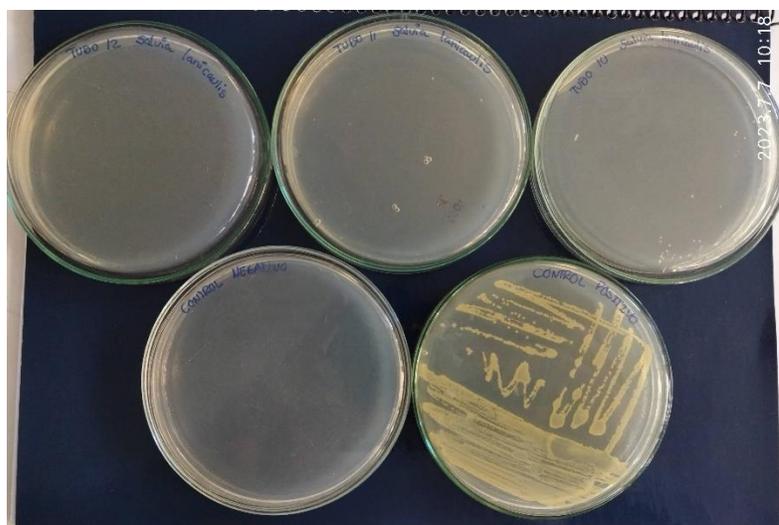
Apéndice N°7. Determinación de la CMI Y CMB



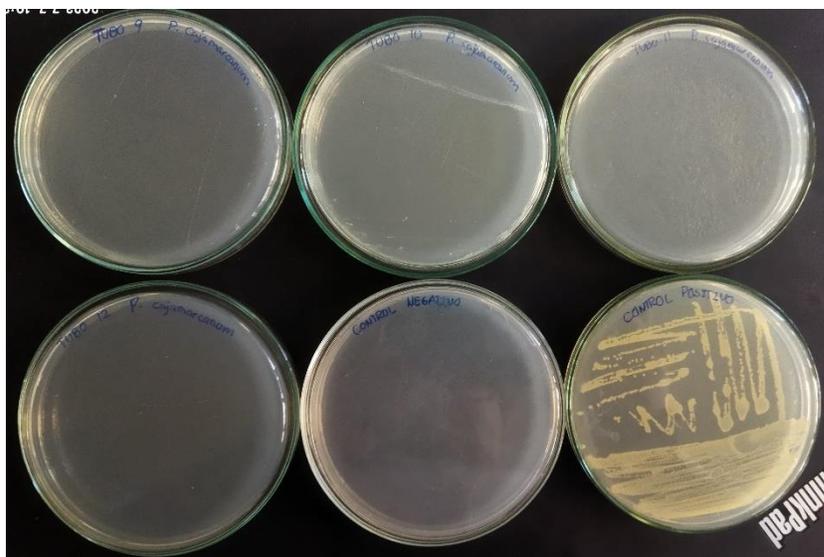
Determinación de la CMI del aceite esencial de *Salvia lanicaulis*, se puede apreciar que a partir del tubo 10 no se presenta turbidez.



Determinación de la CMI del aceite esencial de *Piper cajamarcanum*, se puede apreciar que a partir del tubo 10 no se presenta turbidez.



Determinación de la CMB del aceite esencial de *Salvia lanicaulis*.



Determinación de la CMB del aceite esencial de *Piper cajamarcanum*.

Apéndice N°8. Batería de tubos de ensayo para determinar CMI

N° Tubo	Volumen Solución Madre (uL)	Volumen caldo Mueller Hinton (uL)	Volumen Inóculo Bacteriano (uL)	Volumen Total (uL)
1	100 uL	1900 uL	500 uL	2500 uL
2	200 uL	1800 uL	500 uL	2500 uL
3	300 uL	1700 uL	500 uL	2500 uL
4	400 uL	1600 uL	500 uL	2500 uL
5	500 uL	1500 uL	500 uL	2500 uL
6	600 uL	1400 uL	500 uL	2500 uL
7	700 uL	1300 uL	500 uL	2500 uL
8	800 uL	1200 uL	500 uL	2500 uL
9	900 uL	1100 uL	500 uL	2500 uL
10	1000 uL	1000 uL	500 uL	2500 uL
11	1100 uL	900 uL	500 uL	2500 uL
12	1200 uL	800 uL	500 uL	2500 uL
C (+)	-	2000 uL	500 uL	2500 uL
C (-)	-	2500 uL	-	2500 uL

Apéndice N°9. Prueba de Normalidad

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halos de Inhibición PC	,171	66	,000	,848	66	,000
Halos de Inhibición SL	,196	66	,000	,802	66	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Apéndice N°10. Pruebas de Kruskal Wallis para *P. cajamarcanum* y *S. lanicaulis*

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Halos de Inhibición PC es la misma entre las categorías de Concentración Aceite esencial <i>P. cajamarcanum</i> .	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Halos de Inhibición SL es la misma entre las categorías de Concentración Aceite esencial <i>S. lanicaulis</i> .	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Apéndice N°11. Pruebas Post Hoc para determinar diferencias entre grupos

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: Halos de Inhibición					
T3 Dunnett					
(I) Tratamientos del Aceite esencial P. cajamarcanum	(J) Tratamientos del Aceite esencial P. cajamarcanum	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
1	2	-.57575757575757 577	.449874995391 409	.943	-2,10465796311 7818
	3	-1,4242424242424 2425	.493297593821 203	.137	-3,11772856227 0104
	4	-3,4848484848484 8488 [†]	.442258167252 316	.000	-4,98497208868 6164
	5	-5,6363636363636 3635 [†]	.450894427914 082	.000	-7,16911830671 0292
	6	-12,242424242424 24242 [†]	.458768263461 226	.000	-13,8049683275 23417
	2	1	.57575757575757 577	.449874995391 409	.943
3		-.84848484848484 848	.596130774936 545	.896	-2,80795042656 6693
4		-2,9090909090909 0909 [†]	.554636521749 186	.001	-4,72950984045 2501
5		-5,0606060606060 6058 [†]	.561547121692 049	.000	-6,90360613506 0168
6		-11,6666666666666 66664 [†]	.567888813339 272	.000	-13,5306117731 68376
3		1	1,4242424242424 2425	.493297593821 203	.137
	2	.84848484848484 848	.596130774936 545	.896	-1,11098072959 6997
	4	-2,0606060606060 6061 [†]	.590403824385 821	.032	-4,00246042585 4602
	5	-4,2121212121212 1210 [†]	.596900472836 128	.000	-6,17397048763 6682
	6	-10,8181818181818 81817 [†]	.602870391466 735	.000	-12,7986488455 37556
	4	1	3,4848484848484 8486 [†]	.442258167252 316	.000
2		2,9090909090909 0909 [†]	.554636521749 186	.001	1,08867197772 9318
3		2,0606060606060 6061 [†]	.590403824385 821	.032	.118751695357 521
5		-2,1515151515151 5149 [†]	.555463720600 708	.013	-3,97467757901 3608

	6	-8,75757575757 5756'	,561874077831 362	,000	-10,6021138298 86946
5	1	5,63636363636 3635'	,450894427914 082	,000	4,10360896601 6978
	2	5,06060606060 6058'	,561547121892 049	,000	3,21760598615 1948
	3	4,21212121212 1210'	,596900472836 128	,000	2,25027193660 5739
	4	2,15151515151 5149'	,555463720600 708	,013	,328352724016 689
	6	-8,60606060606 0607'	,568696736373 115	,000	-8,47262828016 3170
6	1	12,2424242424 24242'	,458768263461 226	,000	10,6798801573 25067
	2	11,6666666666 66664'	,567888813339 272	,000	9,80272156016 4953
	3	10,8181818181 81817'	,602870391466 735	,000	8,83771479082 6077
	4	8,75757575757 5756'	,561874077831 362	,000	6,91303768528 4565
	5	6,60606060606 0607'	,568696736373 115	,000	4,73949293195 8045

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: Halos de Inhibición					
T3 Dunnett					
(I) Tratamientos del Aceite esencial S. <i>lanicaulis.</i>	(J) Tratamientos del Aceite esencial S. <i>lanicaulis.</i>	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Limite inferior
1	2	,0000000000 00000	,0000000000 00000	.	,0000000000 00000
	3	-1,57575757 5757575'	,1278486249 07449	,000	-2,04582144 9387859
	4	-2,78787878 7878787'	,2121212121 21212	,000	-3,56778955 1260325
	5	-6,21212121 2121213'	,2990649646 41826	,000	-7,31169999 7958044
	6	-12,5454545 45454547'	,3659020326 81784	,000	-13,8907746 61146876
2	1	,0000000000 00000	,0000000000 00000	.	,0000000000 00000
	3	-1,57575757 5757575'	,1278486249 07449	,000	-2,04582144 9387859
	4	-2,78787878 7878787'	,2121212121 21212	,000	-3,56778955 1260325

	5	-6,21212121 2121213	,2990649646 41826	,000	-7,31169999 7958044
	6	-12,5454545 45454547	,3659020326 81784	,000	-13,8907746 61146876
3	1	1,575757575 757575	,1278486249 07449	,000	1,105693702 127292
	2	1,575757575 757575	,1278486249 07449	,000	1,105693702 127292
	4	-1,21212121 2121212	,2476705059 60031	,002	-2,04542229 6150393
	5	-4,63636363 6363638	,3252462512 72697	,000	-5,76340697 4490713
	6	-10,9696969 69696972	,3875945928 56230	,000	-12,3334845 58281864
	4	1	2,787878787 878787	,2121212121 21212	,000
2		2,787878787 878787	,2121212121 21212	,000	2,007968024 497249
3		1,212121212 121212	,2476705059 60031	,002	,3788201280 92030
5		-3,42424242 4242426	,3666541445 39495	,000	-4,64267922 9075965
6		-9,75757575 7575760	,4229417290 27101	,000	-11,1852533 71562569
5		1	6,212121212 121213	,2990649646 41826	,000
	2	6,212121212 121213	,2990649646 41826	,000	5,112542426 284382
	3	4,636363636 363638	,3252462512 72697	,000	3,509320298 236562
	4	3,424242424 242426	,3666541445 39495	,000	2,205805619 408887
	6	-6,33333333 3333334	,4725718470 21041	,000	-7,89133058 5596199
	6	1	12,54545454 5454547	,3659020326 81784	,000
2		12,54545454 5454547	,3659020326 81784	,000	11,20013442 9762217
3		10,96969696 9696972	,3875945928 56230	,000	9,605909381 112081
4		9,757575757 575760	,4229417290 27101	,000	8,329898143 588950
5		6,333333333 333334	,4725718470 21041	,000	4,775336081 070469