

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE DE *Luma chequen* (ARRAYAN) FRENTE A *Salmonella spp* AISLADAS DE CUYES DEL DISTRITO DE QUIQUIJANA.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIÓLOGO

Presentado por:

**Bach. YENNY FARFAN SALAS**

**Bach. ROSARIO SANTOS VALER**

Asesora:

**Dra. Blga. Hedy Yiyi Espinoza Carrasco**

**CUSCO – PERÚ**

**2016**

**TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC**

## DEDICATORIA

Con infinita gratitud a Dios por guiar mi camino en cada momento.

A mis padres Mariano (†), Fermina por darme la vida.

A mis hermanos: Edgar, Ronald, Patricia, Carmen, Yolanda, Yhon, por brindarme su inmenso amor, confianza y apoyo constante.

A mi esposo e hijos Sofía y Yared por el estímulo y apoyo incondicional.

YENNY FARFAN SALAS.

A Dios por acompañarme siempre y ser mi luz que guía mi camino, por todo lo que tengo y soy es gracias a él.

A mis queridos padres Edwin y Julia, por su confianza y sacrificio, por darme el ejemplo de superación y entrega por mis valores, mis principios, mi forma de ser, mi perseverancia a ustedes cada uno de mis pasos se los entrego con todo mi amor.

A mis hermanas Yanet y Luz Mery, por su cariño, por enseñarme que la alegría borra las dificultades a seguir adelante.

A mí enamorado Jeova, por su inmenso amor, confianza y apoyo constante.

ROSARIO SANTOS VALER.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, queremos agradecer a Dios, por fortalecernos e iluminar nuestra mente y corazón, por poner en nuestro camino a personas tan maravillosas.

A nuestra asesora de la tesis Dr. Blga. Hedy Y. Espinoza Carrasco, un agradecimiento muy especial por apoyarnos incondicionalmente, alentándonos en la realización del proyecto, por su valiosa colaboración en el desarrollo del mismo. El agradecimiento y admiración por compartir sus conocimientos sobre todo nos enseñó que es más importante la calidad humana que mil libros de ciencia. Gracias por su confianza, consideración, buen sentido del humor y sobre todo por su amistad.

Un agradecimiento muy especial al Blgo. Justo Mantilla Holguín y su esposa Luzmila Chevarria Pacheco por su apoyo y paciencia en la recolección y extracción del aceite esencial, sobre todo por su amistad.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco por abrirnos las puertas y brindarnos la oportunidad de ampliar nuestros conocimientos en pro de la superación personal y profesional, por el apoyo económico brindado, así mismo a los docentes de la Facultad de Ciencias de la Escuela Profesional de Biología, por los conocimientos ofrecidos durante nuestra formación profesional.

A todos nuestros amigos y amigas por siempre tener una palabra de aliento, por su paciencia, por confortarnos en momentos difíciles y ayudarnos en este proceso, no hay palabras para describir lo que una amistad representa.

## CONTENIDO

RESUMEN  
INTRODUCCION  
JUSTIFICACION  
HIPOTESIS  
OBJETIVOS

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I MARCO TEORICO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.1 ANTECEDENTES .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1.1. A Nivel Internacional .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1.2. A Nivel Nacional .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1.3. A Nivel Local .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>1.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE BOTANICA .....</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>1.2.1. Ubicación Taxonomía <i>Luma chequen</i> (Arrayán).....</b>                 | <b>8</b>  |
| <b>1.2.2. Características morfológica .....</b>                                      | <b>8</b>  |
| <b>1.2.3. Distribución y hábitat.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>1.2.4. Usos medicinales del (Arrayán) en el Perú.....</b>                         | <b>10</b> |
| <b>1.2.5. Componentes del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Arrayán) .....</b> | <b>11</b> |
| <b>1. Linalol .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2. Eucaliptol (monoterpeno).....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3. Limoneno .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.3. DESCRIPCION DE <i>Cavia porcellus</i> (CUY) .....</b>                        | <b>12</b> |
| <b>1.3.1. Antecedentes Históricos .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>1.3.2. Posición taxonómica .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.3.3. Distribución y dispersión actual .....</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>1.3.4. Prevalencia de Salmonelosis en cuyes .....</b>                             | <b>14</b> |
| <b>1.3.5. Etiología de salmonelosis en cuyes .....</b>                               | <b>15</b> |
| <b>1.4. DESCRIPCIÓN DE <i>Salmonella spp</i> .....</b>                               | <b>16</b> |
| <b>1.4.1 Historia .....</b>  | <b>16</b> |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.2. Ubicación taxonómica .....                                  | 17 |
| 1.4.3. Características morfológicas de <i>Salmonella spp</i> ..... | 17 |
| 1.4.4. Fisiología de <i>salmoenlla spp</i> .....                   | 17 |
| 1.4.5. Clasificación .....   | 18 |
| 1.4.6. Epidemiología de la <i>salmonella spp</i> .....             | 19 |

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y METODOS

|  |    |
|--|----|
| 2.1. DELIMITACIÓN DE ESTUDIO .....   | 21 |
| 2.1.1. Área de colecta de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) .....                  | 21 |
| 2.1.2. Área de muestreo de <i>Cavia porcellus</i> (cuy) .....                  | 22 |
| 2.2. MATERIALES .....  | 23 |
| 2.2.1. Muestra biológica.....  | 23 |
| 2.2.2. Material de campo .....   | 23 |
| 2.2.3. Materiales de laboratorio.....  | 23 |
| 2.2.4. Equipos .....   | 24 |
| 2.2.5. Medios de cultivos.....   | 24 |
| 2.2.6. Reactivos .....   | 25 |
| 2.2.7. Otros materiales .....  | 25 |
| 2.3. METODOLOGIA .....   | 27 |
| 2.3.1. Flujograma de la metodología de la investigación.....                   | 27 |
| 2.3.2. Diseño de la investigación .....  | 28 |
| 2.3.3. Colecta de la muestra vegetal .....                                     | 29 |
| 2.3.3.1. Selección y colecta de la muestra vegetal.....                        | 29 |
| 2.3.3.2. Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor .....          | 29 |
| 2.3.3.3. Control microbiológico del aceite esencial.....                       | 29 |
| 2.3.3.4. Análisis Cromatografico.....  | 30 |
| 2.3.3.5. Dilución del Aceite Esencial .....                                    | 31 |
| 2.3.4. Colecta del hígado de cuy .....   | 32 |
| 2.3.5. Aislamiento de <i>Salmonella spp</i> ( Según las normas ISO 6579) ..... | 32 |
| A. Pre enriquecimiento.....  | 32 |

|  |    |
|--|----|
| B. Enriquecimiento .....   | 33 |
| C. Aislamiento .....   | 33 |
| D. Perfil bioquímico convencional.....   | 33 |
| 2.3.5.1. Tinción de Gram para <i>salmonella spp.</i> .....   | 33 |
| 2.3.6. Evaluación antibacteriana del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) mediante el método Kirby Bauer modificado en pozos ..... | 36 |
| 2.3.6.1. Reconstitución de las cepas (Según Negroni, 2009) .....   | 38 |
| 2.3.6.2. Lectura e interpretación de los resultados .....  | 39 |
| 2.3.7. Análisis de datos estadísticos .....  | 39 |

### CAPÍTULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSION

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Obtención del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) .....  | 41 |
| 3.2. Control microbiológico del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan).....  | 42 |
| 3.3. Determinación de los componentes del aceite esencial por cromatografía de gases.....  | 43 |
| 3.4. Aislamiento de <i>salmonella spp.</i> , a partir de muestras de hígado de cuy .....   | 46 |
| 3.5. Identificación de <i>Salmonella spp</i> por el perfil bioquímico convencional. ....   | 45 |
| 3.5.1. Identificación de la especie del género <i>Salmonella spp</i> del distrito de Quiquijana .....                                      | 48 |
| 3.6. Determinación de la actividad antibacteriana del aceite de <i>Luma chequen</i> (arrayan) frente a <i>Salmonella typhimurium</i> ..... | 51 |
| CONCLUSIONES.....  | 70 |
| RECOMENDACIONES.....   | 71 |
| BIBLIOGRAFIA.....  | 72 |
| ANEXOS .....   | 81 |

## TABLAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla N° 1: Criterios para el Control Microbiológico del Aceite Esencial (según DIGESA, 1999) .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Tabla N° 2: Cantidad extraída del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan). .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>Tabla N° 3: Resultados del Control microbiológico del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan).. .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>Tabla N° 4: Resumen de la composición química del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Arrayan).....</b>  | <b>43</b> |
| <b>Tabla N° 5: Distribución e identificación de <i>Salmonella typhimurium</i> .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>Tabla N° 6: Resultados de la medición de los halos de inhibición frente a <i>Salmonella typhimurium</i> a las 24 horas .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>Tabla N° 7: Estadístico ANOVA media de las diferentes concentraciones de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) para <i>Salmonella typhimurium</i> a las 24 horas .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>Tabla N° 8: Estadístico ANOVA analisis de varianza para <i>Salmonella typhimurium</i> a 24 horas. ....</b>   | <b>55</b> |
| <b>Tabla N° 9: Subconjuntos homogéneos HSD de tukey generales (concentraciones del aceite de <i>luma chequen</i>) para 24 horas. ....</b>   | <b>56</b> |
| <b>Tabla N° 10: Resultados de la medicion de halos de inhibicion <i>Salmonella typhimurium</i> a las 48 horas .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>Tabla N° 11: Estadístico ANOVA media de las diferentes concentraciones de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) para <i>Salmonella typhimurium</i> a las 48 horas. ....</b>  | <b>59</b> |
| <b>Tabla N° 12: Estadístico ANOVA analisis de varianza para <i>Salmonella typhimurium</i> a las 48 horas. ....</b>  | <b>60</b> |
| <b>Tabla N° 13: Subconjuntos homogéneos HSD de tukey generales (concentraciones del aceite de <i>luma chequen</i>) para 48 horas. ....</b>  | <b>61</b> |
| <b>Tabla N° 14: Prueba de T de Student comparando (las 24 y 48 horas) de las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) y control positivo en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>. ..</b> | <b>63</b> |
| <b>Tabla N° 15: Grado de correlación existente entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para <i>salmonella typhimurium</i> a las 24 horas. ....</b>   | <b>64</b> |
| <b>Tabla N° 16: valor predictorio mediante la pendiente de la intercesión de la recta entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para <i>salmonella typhimurium</i> a las 24 horas. ....</b>                | <b>66</b> |

**Tabla N° 17 Grado de correlación existente entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 48 horas. .... 67**

**Tabla N° 18: valor predictorio mediante la pendiente de la intercesión de la recta entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 48 horas. .... 69**

## GRAFICAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Grafica N° 1: Presencia de <i>Salmonella typhimurium</i>, en los sectores de Quiquijana .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Grafica N° 2: Media de diametro del halos de inhibición, segun las tres concentraciones del aceite de <i>Luma chequen</i> (arrayan) y control positivo frente a <i>salmonella typhimurium</i> a las 24 horas .....</b>          | <b>57</b> |
| <b>Grafica N° 3: Ojiva de halos de inhibición de las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) y control positivo frente a <i>salmonella typhimurium</i> a las 24 horas. ....</b>                  | <b>57</b> |
| <b>Grafica N° 4: Media de diametro del halos de inhibición, segun las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) y control positivo frente a <i>Salmonella typhimurium</i> a las 48 horas .....</b> | <b>62</b> |
| <b>Grafica N° 5: Ojiva de halos de inhibición de las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) y control positivo frente a <i>Salmonella typhimurium</i> a las 48 horas. ....</b>                  | <b>62</b> |
| <b>Grafica N° 6: Ojiva del Grado de correlación de halos de inhibición frente a las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) a las 24 horas. ....</b>   | <b>65</b> |
| <b>Grafica N° 7: Ojiva del Grado de correlación de halos de inhibición frente a las tres concentraciones del aceite esencial de <i>Luma chequen</i> (arrayan) a las 48 horas. ....</b>   | <b>68</b> |

## FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura N° 1: Planta de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Figura N° 2: Detalles de la floración y fruto de <i>Luma chequen</i> (Arrayan).....</b>                               | <b>10</b> |
| <b>Figura N° 3: <i>Salmonella ssp</i>.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Figura N° 4: ubicación geográfica de la colecta de <i>Luma chequen</i> (Arrayan) .....</b>                            | <b>21</b> |
| <b>Figura N° 5: Mapa satélite de la zona geográfica de muestreo de cuyes del distrito de Quiquijana. ....</b>            | <b>22</b> |
| <b>Figura N° 6: Imagen de las tres diferentes concentraciones que se trabajó (10%. 50%, 100%).....</b>                   | <b>31</b> |
| <b>Figura N° 7: Desarrollo de colonias de <i>Salmonella spp</i> en Agar SS (Agar <i>Salmonella - shiguela</i>). ....</b> | <b>46</b> |
| <b>Figura N° 8: Perfil bioquímico convencional de <i>Salmonella spp</i>. ....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Figura N° 9: Abscesos purulentos presentes en el hígado de cuy. ....</b>  | <b>49</b> |

## RESUMEN

La salmonella (*Salmonella spp*) produce la enfermedad que ocasiona índices de mortalidad alta en cuyes. Los serovares *Salmonella enteritidis* y *typhimurium* han sido asociados con las infecciones en cuyes de allí parte el interés de conocer el género y especie de bacteria que afecta a esta población. Por ello el presente estudio tuvo aislar *Salmonella spp*, de 30 muestras de hígado de cuy provenientes de las cuencas Anilmayo, Huchumayo y Vilcanota del distrito de Quiquijana en los meses de Abril a Noviembre del 2016. Para determinar la actividad antibacteriana del aceite *Luma chequen* (Arrayan) frente a *Salmonella spp*, asiladas de cuyes. Para lo cual se procedió a obtener el aceite esencial, por el método destilación por arrastre de vapor, obteniendo de 4.5 kg/7.5 ml de aceite el cual fue sometido a pruebas de control microbiológico de calidad según la DIGESA, comprobando que están libre de contaminantes microbiológicos. Se determinó los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) por cromatografía de gases, encontrándose: alpha-Pinene, delta-3-carene, gamma-Terpinene (37.90%), eucaliptol (14.07%), linalol (9.71%) y beta pinene (8.95%). Se aisló *Salmonella spp*, de los hígados de cuy, las muestras de hígado fueron cultivadas en medios diferenciales (agar SS y agar BPLS). Mostrando crecimiento y coloración similares a las bacterias en estudio, se precedió a realizar las pruebas bioquímicas (TSA, LIA, MIO, citrato, urea) pruebas que corroboran la presencia del género *salmonella spp*. La tipificación e identificación se realizó por el método de formulación antigénica de serovares de salmonella por el Instituto Nacional de Salud, identificándose a *Salmonella typhimurium* en un 33.33% (10/30). La actividad antimicrobiana del aceite de *Luma chequen* (Arrayan) fue evaluada mediante el Método Kirby Bauer modificado en pozos a diferentes concentraciones (10,50 y 100%), sobre cepas de *Salmonella typhimurium*, presentando un halo de inhibición promedio (9,92; 12.11 y

15.32 mm) respectivamente a las 24 horas de lectura y a las 48 horas de lectura presentaron un halo de inhibición promedio de (11.5, 13.63 y 18.27 mm) respectivamente. Las cepas fueron susceptibles a la acción del aceite de *Luma chequen* (Arrayan).

## INTRODUCCIÓN

Durante los pasados 5000 años, nuestros antepasados utilizaron los productos naturales como fuente primaria de medicinas, en la actualidad las plantas siguen siendo fuente importante de antimicrobianos debido a la gran diversidad, flexibilidad, accesibilidad, disponibilidad y sobre todo a la variedad y complejidad de sus compuestos químicos (Saxena, 2006). El 80 % de la población mundial, aproximadamente unos 4 mil millones de personas, utiliza las plantas como principal medicinal para aliviar muchos de sus padecimientos. Llama la atención la creciente demanda de esta terapia sobre todo en los países en desarrollo donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina que genera daño a la salud; por su parte en los países de vías en desarrollo, constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones arraigadas en cada uno de ellos. (OMS, 2004).

Los productos naturales derivados de plantas como aceites esenciales y sus extractos orgánicos podrían proporcionar metabolitos bioactivos como una alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones, ya que muchas de estas plantas son conocidas empíricamente por sus propiedades médico-farmacológicas (Huamani y Ruiz, 2005).

*Luma chequen* “arrayán” es una especie ampliamente utilizada en la sierra y sur de nuestro país por los pobladores que la cultivan tradicionalmente por sus múltiples propiedades. El presente estudio trata de demostrar científicamente las propiedades antibacterianas que presenta frente a *Salmonella spp*, con el fin de proporcionar a la población una alternativa natural, económica y de fácil alcance frente a los problemas de infección por salmonelosis en la población de cuyes.

Entre los patógenos causales de mortalidad en la población de cuyes se encuentran: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Leptospira spp* y *Salmonella spp* (Ganaway, 1976 y Christians, 1992) siendo la salmonelosis la enfermedad de mayor prevalencia, cuyas pérdidas económicas en esta población llegan hasta 53% por morbilidad y 95% por mortalidad (Morales, 2007).

La producción del cuy atraviesa graves problemas por la salmonelosis que están diseminados en la naturaleza como comensales y patógenos del aparato digestivo de mamíferos domésticos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonellas son potencialmente patógenas (Stanchi, 2007; Smith 1952 y Mahajan, 2003) al ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado la vía linfática y sanguínea (Smith, 1952; Suter, 1956 y Stanchi, 2007).

Por ello esta investigación está orientada a demostrar científicamente la propiedad antibacteriana que presenta *Luma chequen* (arrayan) frente a *Salmonella spp* aislados de cuyes del Distrito de Quiquijana.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de salmonelosis en cuyes, se presenta resistencia bacteriana, fenómeno creciente caracterizado al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de estos, costos elevados y efectos dañinos para esta población; las posibilidades de nuevos tratamiento se ve incierto debido a la falta de nuevos medicamentos que actúen frente a este patógeno. Debido a estas razones se debe orientar los esfuerzos a nuevas búsqueda de agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones; siendo necesaria la investigación de nuevos productos naturales que actúen de forma directa sobre la actividad bacteriana inhibiendo el crecimiento de este patógeno.

La familia Myrtaceae es reconocida en el Perú por presentar 20 géneros y 165 especies la mayoría arbustos y árboles. Las Myrtaceae endémicas se encuentran principalmente en las regiones Bosques Húmedos Amazónicos y Mesoandina, entre los 100 y 3600 m de altitud (Kawasi y Holst, 2006). Se han realizado algunos estudios para evaluar la actividad antimicrobiana con esta familia de plantas, así tenemos: el aceite esencial *Luma chequen* (Arrayan) poseen propiedades con actividad antibacteriana como lo han reportado otras especies vegetales de la familia Myrtaceae.

La alta incidencia de salmonelosis en la población de cuyes de las zonas del distrito de Quiquijana permite la búsqueda de nuevos tratamientos naturales para contrarrestar esta infección razón por la cual nos planteamos la siguiente interrogante: ¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite de *Luma chequen* (arrayan) frente a *Salmonella spp* aislados de cuyes del distrito de Quiquijana?

## JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, en cosmética y en productos de aseo para el hogar, así como también, para dar sabor y conservar una variedad de productos alimenticios. Las mirtáceas son una familia de árboles o arbustos con importancia económica a nivel mundial, por abarcar plantas de interés, ya sea por sus frutos comestibles o por la obtención de esencias, las cuales son usadas en perfumería o medicina.

En las últimas décadas, se ha investigado *Luma chequen* (arrayan) por su actividad antimicrobiana, la cual es atribuida a la presencia de  $\alpha$ -Pino y Linalol, que facilitan la solubilidad en las membranas biológicas por sus grupos funcionales oxigenados para contrarrestar microorganismos patógenos.

El cuy es una de las especies más importantes por su ciclo reproductivo muy corto y su flexibilidad en cuanto a su alimentación, constituye una fuente proteica esencial en la dieta del poblador andino siendo una especie favorita para la crianza. Esta especie genera ingresos para las mujeres del sector rural y que en la actualidad sigue siendo uno de los aportes económicos más importantes. La crianza del cuy se encuentra bajo un sistema de crianza familiar - comercial, fuertemente limitada a la tecnología y control inadecuado de sus enfermedades y el consecuente incremento de un sin número de patologías.

## **HIPOTESIS**

El aceite de *Luma chequen* (Arrayan) tiene actividad antibacteriana in vitro frente a *Salmonella spp* aislados del hígado de cuy.

## **VARIABLES**

### **Independientes**

- ✓ Aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) a diferentes concentraciones.

### **Dependientes:**

- ✓ Actividad antibacteriana en cepas de *Salmonella spp.* (medidas en halos de inhibición en mm).

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Determinar la actividad antibacteriana del aceite *Luma chequen* (Arrayan) frente a *Salmonella spp*, aisladas de cuyes del Distrito de Quiquijana.

### Objetivo Específico:

1. Obtener aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) por “Arrastre a Vapor”
2. Realizar el control microbiológico, el análisis cromatográfico del aceite *Luma chequen* (Arrayan).
3. Aislar cepas de *Salmonella spp*, de hígado de cuy expandidas en tres cuencas del Distrito de Quiquijana.
4. Identificar la especie de cepas de *Salmonella spp* obtenidas de hígados de cuy del distrito de Quiquijana.
5. Evaluar la actividad antibacteriana del aceite de *Luma chequen* (arrayan) frente a cepas de *Salmonella spp* obtenidas de hígados de cuy a tres concentraciones (10%, 50%, 100%) por el método: Kirby Bauer modificado en pozos.

## CAPITULO I

### MARCO CONCEPTUAL

#### 1.1. ANTECEDENTES

##### 1.1.1. A Nivel Internacional:

- **Garcés (2015) Ecuador.** Trabajó la incidencia de enterobacterias en cuyes del Cáserio Acapulco en el Cantón Mocha, concluyendo que el porcentaje de incidencia es 36% de Enterobacterias en granjas cavícolas. Los géneros y las especies bacterianas encontradas de acuerdo a las pruebas bioquímicas diferenciales (TSI, LIA, SIM, Reactivo de Kovacs, Rojo Metilo y Agar Urea), fueron las siguientes: *Yersinia sp* 10%, *Echerichia coli* 12%, *Shigella flexneri* 8% y *Salmonella typhimurium* 6%; mediante la prueba estadística de  $X^2$  determina que los sistemas de producción de tipo Familiar, Familiar-comercial no reportan significancia entre la ocurrencia de aparición de Enterobacterias y tipo de explotación.
- **Guamán (2014) Ecuador.** Determinó a *Salmonella tiphymurium*, como agente patógeno en diferentes sistemas de crianzas de cuyes en la Comunidad de Oñacpac del Cantón Saraguro, Cuenca-Ecuador, afectando en mayor medida al sistema familiar. El método de identificaciones más confiables para el género y especie de *Salmonella spp*, es mediante la utilización de agares de *Salmonella-Shiguella (SS)* y las pruebas bioquímicas de confirmación llamadas IMVIC.

- **Pío y Col. (2013) México.** Determinaron la actividad antibacteriana de extractos de frutos de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth “nanchi”, *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied. “arrayán” y *Crescentia alata* Kunth “áyale” mediante el ensayo de microdilución en caldo, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), de los extractos de frutos (hexánico, EH; clorofórmico, EC; y metanólico, EM) contra 21 bacterias patógenas humanas. Los EH de arrayán y áyale mostraron la mayor actividad (CMI 0,25-2 mg/mL; CMB 0,5-16 mg/mL) contra enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*). El EM de arrayán fue el más activo contra bacterias Gram positivas, presentando *Staphylococcus aureus* la mayor sensibilidad (CMI 2 mg/mL; CMB 2-4 mg/mL). Estos resultados apoyan el uso tradicional de las plantas como tratamiento de infecciones bacterianas.
- **Bodero (2010) Ecuador.** Estudió la actividad antibacteriana de los extractos con los extractos fluidos de *Myrcianthes rhopaloides* “arrayán” y *Salvia squalens* “Pumín” con lo cual concluyo que contienen principios activos implicados en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* aislados de infecciones periodontales, esto respaldaría el conocimiento ancestral de poseer propiedades antimicrobianas, antisépticas, útiles en caso de inflamación de las encías y limpieza dental. Los extractos de Arrayan y Pumín inhibieron el crecimiento de los patógenos orales, encontrando que el que posee más potencial bacteriostático fue la concentración combinada de (1000:1000) mg/mL presentó sinergismo, y el mayor potencial bactericida sobre microorganismos Gram positivos, Gram negativos. Los extractos fluidos de Arrayán y Pumín pueden

incorporarse a formulaciones para la higiene bucal por su potencial antibacteriana y de control en la formación de biopelícula.

- **Lizcano y Vergara (2008) Colombia.** Reportaron que el aceite esencial obtenido de las hojas de *Myrcianthes rhopaloides* “arrayán negro”. Presentó actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y un hongo fitopatógeno *Alternaria* sp. Estos resultados confirman que el aceite esencial evaluado de las hojas de *Myrcianthes rhopaloides* poseen actividad antibacteriana y anti fúngica como lo han reportado otras especies vegetales de la familia Myrtaceae.
- **Maldonado (2008) Ecuador.** Reportó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* “arrayán”. Los análisis realizados comprueban su acción bactericida sobre microorganismos Gram (+), principalmente por la actividad del eucaliptol sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* que son patógenos típicos de las vías respiratorias superiores. Así, estos datos se convierten en una base para estudios posteriores dirigidos a la formulación de preparaciones de uso tópico, especialmente para la limpieza y la desinfección de la cavidad oral.
- **Goncalves y Col. (2001) Portugal.** Reportaron que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. “arrayán”. Posee tres componentes principales ( $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y linalol) probablemente responsables de la actividad antimicrobiana, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

*Proteus vulgaris* CECT 484, *Candida albicans* CECT 1394, *Cryptococcus neoformans* CECT 1078, *Cladosporium cladosporioides* CECT 2111 y *Aspergillus fumigatus* CECT 2071, estos resultados justifican el uso de esta planta en la medicina tradicional.

### 1.1.2. A Nivel Nacional:

- **Flores (2014).** Evaluó actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan” frente *Streptococcus mutans*. Donde existe actividad antibacteriana a tres concentraciones (10%,50%,100%) y que la concentración mínima inhibitoria del aceite es al 10%. Las que presentan mayor actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* es la concentración al 100% que presento mayor diámetro de halo de inhibición, con una media de 8.66 mm. el 50% una media de 7.88mm y el 10% de 6.28mm.

El grupo control con clorhexidina al 0.12% mostro diferencia significativa ( $p < 0.005$ ) frente a las tres concentraciones (10%,50%,100%) a su vez, también mostraron diferencias significativas entre ellas.

- **Torres (2014).** Evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) A Gray “arrayan” frente a patógenos aislados de hemocultivos del hospital nacional de Guillermo Almenara Irogeyen, Lima-Perú. El extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas de referencia, así como a patógenos (*Escherichia coli* ATCC 25922,

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*) y levaduras (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) , aislados de origen hospitalario en comparación con los extractos de hexano y diclorometano que no mostraron actividad inhibitoria significativa. *Luma chequen* “arrayán” posee principios activos con acción antimicrobiana, hecho corroborado por los valores CMI, lo cual contribuye al fortalecimiento y credibilidad de los conocimientos ancestrales.

- **Gonzales, Mansilla, Rengifo y Arévalo (2014).** Extrajeron el aceite esencial de *Myrtus communis* “Arrayán”, utilizando la destilación por arrastre de vapor para muestra fresca y Hidrodestilación con el equipo Clevenger para muestra seca, obteniéndose que este último proceso es más eficiente. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra 3 tipos de bacterias: *Bacillus amyloliquefaciens* (Gram +), *Escherichia coli* y *Pseudomonas poae* (Gram -); y 2 tipos de hongos: *Aspergillus niger* y *Penicillium variabile*. Siendo *B. amyloliquefaciens* el único que mostró sensibilidad al aceite, con un diámetro de inhibición entre 13-23 mm. Estos resultados difieren de otros estudios donde se señala que *M. communis* es un efectivo agente antimicrobiano, lo cual pudiera deberse a que las muestras son de diferentes regiones geográficas, variando la composición del aceite.

- **Layme y Col. (2011).** Evaluó las lesiones anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella sp*, Lima-Perú, Las lesiones anatomopatológicas se evidenciaron en diversos órganos, corroborando el proceso séptico de la salmonelosis en el cuy. El hígado fue el órgano donde se aisló con mayor frecuencia *Salmonella spp* y el órgano con mayor frecuencia de lesiones anatomopatológicas, especialmente la hepatitis necrótica.
- **Matsuura (2007).** Evaluó la susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash –Perú. La susceptibilidad de *Salmonella enterica* a enrofloxacina y sulfatrimetoprim, así como al cloranfenicol, gentamicina y fosfomicina, hacen de estos antibacterianos buenas alternativas de elección para el tratamiento de la salmonelosis en las granjas bajo estudio. *S. enterica* fue el microorganismo más frecuentemente aislado en cuyes clínicamente enfermos en la provincia de Carhuaz durante el periodo mayo-julio de 2007.
- **Carhuapoma (2005),** realizó la caracterización de la composición de química de *Luma chequen* (Molina) A Gray "Arrayán"; reportando un rendimiento de (1.25%) e hidrocarburos monoterpénicos (68.8%), conteniendo alfa -pineno (57.3%) y beta-pineno (6.2%); hidrocarburos oxigenados (18.9%), destacando: 1,8 cineol (7.5%) linalol(3.7%).

### 1.1.3. A Nivel Local

- **Moina (2015).** Realizó el estudio de la actividad antibacteriana in-vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de *Luma chequen* (Feuileé ex Molina) A. Gray y *Minthostachiys spicata* (Benth). Epling “Yuraq muña” Frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Determinando que la actividad antibacteriana in-vitro es superior al colutorio Listerine e inferior al de Colgate y Dento. También identificó por cromatografía de gases, del aceites esencial de *Luma chequen* (Feuileé ex Molina) A. Gray los siguientes componentes mayoritarios  $\alpha$  – pineno con 61.19%, 4 – carvamenthenol con 9.76%,  $\beta$ -pineno con 8.18% y linalol con 7.41%. y para *Minthostachiys spicata* (Benth). Epling “Yuraq muña” pulegona con 30.06% tras mentona con 29.65%.
- **Mantilla (1997).** Evaluó cinco especies medicinales y aromáticas en el Valle Sagrado de los Incas - Cusco. Entre los que responden positivamente a la propagación vegetativa con porcentajes de Cedroncillo (81%), Muña (47.5%), Chiri-chiri (95%), Phauka (86%) y Arrayan (84.7%). La obtención del aceite esencial en relación a 100 kg de materia prima fresca es la siguiente “Arrayan” (*Luma chequen*) 152.30 ml con un rendimiento de (0.15%). Arrayan tiene propiedades terapéuticas, analgésico y antiinflamatorio dérmico por la presencia de (pinenes), y que también se usa como conservante natural (linalol) y para afecciones respiratorias (1.8-cineol). El beneficio económico se incrementa cuando se le da el valor agregado a la materia prima mediante transformación básica (aceite esencial, pomada y tintura).

## 1.2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE BOTANICA

### 1.2.1. Ubicación Taxonomía de *Luma chequen* (Arrayan)

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Magnoliidae

**Superorden:** Rosanae

**Orden:** Myrtales

**Familia:** Myrtaceae

**Género:** *Luma*

**Especies:** *Luma chequen* (Feuilee ex Molina) A. Gray.

**Sinonimia:** *Eugenia bella* phil., *E. chequen* Feuilee ex Molina, *E. gayana* Barneoud, *E. Myrtomimeta* Diels, *Luma gayana* (Barneoud) Burret, *Myrceugenella chequen* (Feuilee ex Molina) Spreng.

**Nombres comunes:** Mirto, Arrayan, Arrayana, wallpuma, rayan castilla y luma.

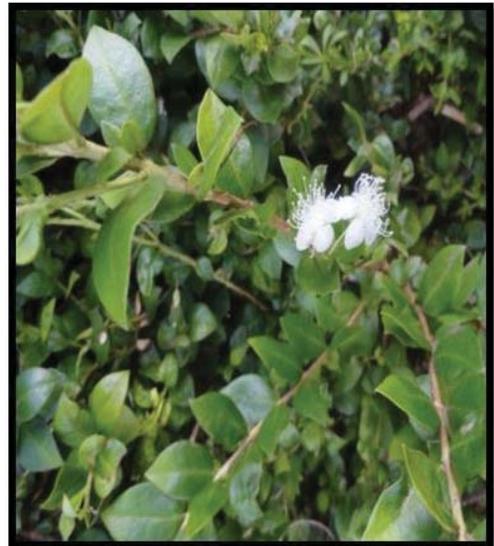
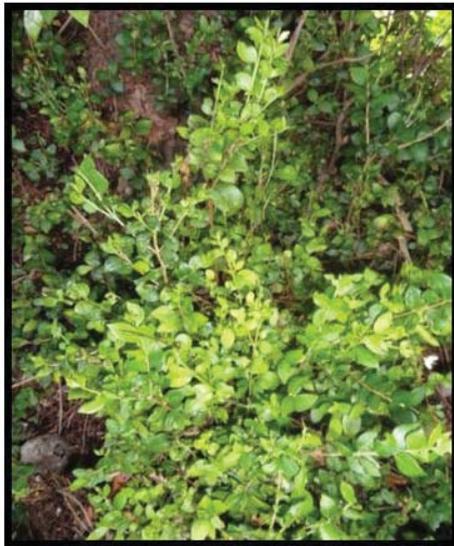
**Fuente:** Herbario CUZ- UNSAAC (Angiosperm Phylogeny Group. APG IV- 2016).

### 1.2.2. Características morfológicas

Planta arborescente, con altura entre los 5 a 6 m y cobertura de 5 m de diámetro. Es coposo, con el follaje denso y siempre verde. La copa es globosa y va desde el primero segundo tercio (Sotta, 2000; Carhuapoma, 2002; Reynel y Marcelo, 2009).

**Tallo:** Erguido, leñoso, ramificado desde la base. La corteza externa es lisa, de color marrón claro. La corteza interna es blanquecina, con olor tenue y agradable. **Hojas:** Simples, opuestas y decusadas. Sin estipulas, los peciolo son muy cortos, de 1 a 2 mm de longitud, limbo ovoide y coriáceo de 0,5 a 4 cm de longitud y 0,5 a 2 cm de ancho, con el ápice agudo. **Flores:** Solitarias, axilares, hermafroditas, blancas, actinomorfas y tetrámeras; estambres numerosos, libres, en varios verticilos, filamentos inflexos en el capullo, anteras versátiles introrsas; ovario ínfero con placenta axilar, óvulos anátropos, estilo simple y estigma capitado. **Fruto:** Bayas más o menos esféricas de color negro violáceo, carnosas y comestibles miden de 8 a 15 mm de diámetro que aloja 2 a 4 semillas pequeñas (Carhuapoma, 2008). Como observamos en la figura N° 1 y 2.

**Figura N° 1: Planta de *Luma chequen* (Arrayan).**



**Fuente:** Elaboración propia.

**Figura N° 2: Detalles de la floración y fruto de *Luma chequen* (Arrayan).**



**Fuente:** Elaboración propia.

### **1.2.3. Distribución y hábitat**

Se encuentra en los andes de Sudamérica central, entre Perú, Bolivia y Chile. Crece desde los 2500 a 4000 m de altitud. En el Perú, se distribuye en la sierra central y sur del país, puede encontrarse en departamentos como Ancash, Cerro de Pasco, Lima, Junín, Ayacucho y Cusco, con predilección hacia el sur. Su población se ve favorecida en lugares de alta humedad, a orillas de los ríos (Cronquist, 1981).

### **1.2.4. Usos medicinales del (Arrayán) en el Perú**

La información etnofarmacológicos refiere diversos usos de *Luma chequen* (arrayán) en la medicina popular; la ingesta por vía oral de la infusión o decocción de las partes aéreas de esta planta se utiliza en Sudamérica para mitigar la tos, la indigestión y las

diarreas, antiinflamatorio, antimicótico, las afecciones pulmonares y afecciones bronquiales, expectorante, astringente, antiséptico, además el follaje es empleado como aromatizante y saborizante en la cocina, y como condimento en la preparación de embutidos (jamones y salchichería) (Reynel y Marcelo, 2009).

Mantilla y Olazábal en el 2008 realizaron un estudio de las plantas medicinales en el Cusco reportando que *Luma chequen* (Arrayán) es utilizado por los pobladores para el dolor de cabeza, dolor de estómago, expectorante y astringente, para la tos, gripe, reumatismo, el mal aliento, fiebre y además para bañar a los muertos y así conservarlos.

Según Goncalves *et al.*, (2001), *Luma chequen* (Arrayán) es una planta nativa de Perú, que sus hojas y meristemas apicales de tallo son usados por los locales para los tratamientos de la tos, dolores de muela, desórdenes gastrointestinales e infecciones postparto.

#### **1.2.5. Componentes del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayán)**

El aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayán) se compone de  $\alpha$ - $\beta$  pineno, cineol y mirtol, también se han encontrado flavonoides, quercitina, camferol, miricetina y dos glúcidos de miricetina. (García, 2002).

Entre los más importantes se encuentran según (Lopez 2007):

**1) Linalol (monoterpeno):** es un alcohol terpénico (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) terciario insaturado y está presente en un porcentaje del 19%, por lo tanto sería un buen marcador químico en las pruebas de control de calidad del aceite.

2) **Eucaliptol (monoterpeno)**: es un alcohol terpénico (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) y está presente en un porcentaje del 11,73%; se caracteriza por sus propiedades como balsámico, expectorante y antiséptico.

3) **Limoneno**: es un hidrocarburo terpénico principal componente de muchos aceites esenciales, principalmente cítricos, y está presente en una concentración del 8,56%.

### 1.3. DESCRIPCIÓN DE *Cavia porcellus* (CUY)

#### 1.3.1. Antecedentes Históricos

Las pruebas existentes demuestran que el cuy fue domesticado hace 2 500 a 3 600 años. En los estudios estratigráficos hechos en el templo del Cerro Sechín (Perú), se encontraron abundantes depósitos de excretas de cuy y en el primer periodo de la cultura Paracas denominado Cavernas (250 a 300 a.C.), ya se alimentaba con carne de cuy. Para el tercer período de esta cultura (1400 d.C.), casi todas las casas tenían un cuyero (Moreno, 1989).

También se han encontrado cerámicas, como en los huacos Mochicas y Vicus, que muestran la importancia que tenía este animal en la alimentación humana. Se han extraído restos de cuyes en Ancón, ruinas de Huaycan, Cieneguilla y Mala. (Huckinghaus, 1961)

Hace por lo menos 3000 años se estableció como la principal fuente de alimentación de los aborígenes que lo domesticaron. Después de la conquista de los españoles y mestizos se dedicaron a su cuidado. En la actualidad el cuy se cría en las zonas rurales y suburbanas de estos países. Desafortunadamente, debido a la crianza tradicional, la raza de los cuyes ha ido desmejorando y su número al nivel de las familias ha bajado

considerablemente a tal punto que varias familias campesinas no tienen estos animales. Actualmente, las especies mejoradas son las que mejores ventajas ofrecen respecto a reproducción, convertibilidad y calidad organoléptica de sus carnes (Chauca, 1997).

### **1.3.2. Posición taxonómica**

**Clase:** Mamífero

**Orden:** Rodentia

**Suborden:** Hystricomorpha

**Familia :** Caviidae

**Género:** Cavia

**Especie:** *Cavia porcellus*

**Nombres comunes:** cuy, Rata de América, Sacha Cuy, Conejo de América, Conejillo de India.

**Fuente:** (Estupiñán E., 2003).

### **1.3.3. Distribución y dispersión actual**

El hábitat del cuy es muy extenso. Se han detectado numerosos grupos en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, noroeste de Argentina y norte de Chile, distribuidos a lo largo del eje de la cordillera andina. Posiblemente el área que ocupan en Perú y Bolivia fue el hábitat nuclear del género Cavia. Este roedor vive por debajo de los 4 500 m de altitud y ocupa regiones de la costa, sierra y selva alta. (Cabrera, 1953).

La mayor población de cuyes se encuentra en el Perú, que según el último censo agropecuario realizado por el INEI (2012) asciende a más de 12 millones, siendo Cajamarca, Cusco, Ancash y Apurímac los departamentos en donde se concentra la mayor población de estos animales. La crianza familiar es muy difundida en nuestro país llegando a un 93.1%, mientras que la familiar- comercial constituye un 6,8% y la del tipo comercial solo representaba el 0.1% de los tipos de crianzas hasta el año 1994 (principalmente alrededor de áreas urbanas) (Chauca, 1994).

#### **1.3.4. Prevalencia de Salmonelosis en cuyes**

La *Salmonella* es el principal agente infeccioso en los cuyes, durante largo tiempo se ha observado una gran susceptibilidad a la salmonelosis en los cuyes, sin embargo aún son escasos los reportes con datos exactos que permitan tener una idea clara de la realidad de la salmonelosis en cuyes, algunos de estos reportes son el de ( Leguía , 1993) señala que hasta el 95% de muertes de la morbilidad general es generada por este agente causal variando los efectos según el estado de desarrollo del cuy 52.70% en adultos y 19.83% en lactantes.

La alta incidencia en nuestro país del serovar que se ha aislado con mayor frecuencia de órganos de cuyes muertos es *Salmonella typhimurium*, que superan el 95% en relación a otros serovares. Uno de los primeros reportes en nuestro país es el descrito por Ameghino (1968), acerca de un brote de salmonelosis con alrededor de 95 % de mortalidad, en una granja en Huancayo, logra aislar Salmonellas en forma casi pura a partir de pulmones, hígado e intestinos que posteriormente se identificaron como *S. typhimurium*

Ramírez (1972), realizó un estudio bacteriológico de un brote infeccioso en cobayos en una granja de la localidad de Barranca, encontrando a microorganismos del género *Salmonella* (*S. typhimurium* y otros serovares) en un 65.5% de los animales estudiados. En un estudio realizado en la provincia de Carhuáz, Áncash se halló una prevalencia de 61.5% de *Salmonella enterica* (Matsuura, 2010), mientras que Morales (2012), aisló *Salmonella typhimurium* un 16.7% del total de cepas obtenidas por hisopados rectales de cuyes reproductores machos mejorados destinados a ser introducidos al distrito de San Marcos (crianza familiar- comercial).

Guamán (2014) reporta un 34% de presencia de este agente en el sistema de crianza comercial. Aunque no existe referencias exactas de cuál es el serotipo causante de la Salmonelosis en los cuyes, se ha reportado mayormente presencia de *S. enteritidis* (Correa, 2000 y Matsuura, 2010) y *S. thiphymurium* (Correa, 2000 y Guamán, 2014).

Los serovares *S. typhimurium* y *S. enteritidis* han sido aislados de cuyes, estando en estos animales de manera latente o introducidos por los alimentos o camas contaminadas con excretas de roedores (Peters, 1981). Los serovares más comunes en cuyes domésticos son *Salmonella enteritidis* y *typhimurium* (Richardson, 2000).

#### **1.3.5. Etiología de salmonelosis en cuyes**

Figueroa y Verdugo, 2005 indican que la principal vía de infección es la oral a través de alimentos contaminados, esto ocasionado en gran medida por las malas prácticas de manejo que ocasiona presencia de roedores y aves contaminados, ingreso no controlado de personal, estrés en los cuyes.

La salmonelosis en cuyes se puede manifestar de dos formas: crónica o aguda, siendo esta última la que mayor mortalidad causa presentándose como un cuadro septicémico agudo que genera muertes en 24 a 48 horas, los signos más frecuentes son decaimiento, postración, anorexia, adelgazamiento, pelos ásperos y erizados, y parálisis de los miembros posteriores; aunque en muchos casos los animales mueren sin mostrar síntoma alguno (Layme, 2010). En los casos crónicos se presenta un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido y aumento del volumen abdominal (Evans, 2005).

Haciendo una necropsia se observa el hígado agrandado con presencia de zonas necróticas y focos purulentos a manera de pequeñas perlas, el bazo e hígado se presentan con un tamaño mayor que el normal (Figuroa y Verdugo, 2005).

#### **1.4. DESCRIPCIÓN DE *Salmonella* spp.**

##### **1.4.1. Historia**

El género *Salmonella* recibe su nombre en honor al microbiólogo Americano Daniel Elmer Salmon (1850-1914), quien en 1876 fue reconocido como el primer doctor en medicina veterinaria graduado en una universidad de los Estados Unidos. Junto a Theobald Smith (1859-1934), conocido por su trabajo con anafilaxis, fueron quienes descubrieron los gérmenes designados como salmonelas, en 1885, aislándolos de cerdos con cólera (Stanchi, 2007).

#### 1.4.2. Ubicación taxonómica

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gamma proteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *salmonella*

**Especie:** *Salmonella sp*

**Fuente:** (Bergey, 2005.).

#### 1.4.3. Características morfológicas de *Salmonella spp.*

*Salmonella spp.*, son bacilos gram negativos, de 0,7-1,5 x 2-5  $\mu\text{m}$ , anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*). Fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Son generalmente catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos.

#### 1.4.4. Fisiología de *salmoenlla spp.*

Son anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4% de NaCl.

La mayoría de los serotipos de Salmonella crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con agua de <0.2. Su crecimiento se inhibe completamente a temperaturas inferiores a 7°C, pH <3.8. Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2500 serotipos identificados en el actual sistema de Kauffmann-White, siendo Salmonella enterica serovar *typhimurium*, *enteritidis* y los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (Grimont, 2007 y Hyeon, 2013).

#### 1.4.5. Clasificación

La clasificación más aceptada es la que propone que el género Salmonella está dividida en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, datos muy similares a los obtenidos en estudios de ADN mediante técnicas de hibridación (Caffer y Terragno, 2001). Las dos especies, se subdividen de la siguiente manera:

- *Salmonella enterica*, agrupa a la mayoría de las bacterias del género que se aíslan de animales de sangre caliente, incluido en hombre, y se divide en seis subespecies, según el sistema de Kauffman– White.
  - a. Subespecie I. *S. enterica subsp. enterica*
  - b. Subespecie II. *S. enterica subsp. salamae*
  - c. Subespecie III a. *S. enterica subsp. arizonae*

d. Subespecie III b: *S. enterica subsp. diarizonae*

e. Subespecie IV. *S. enterica subsp. houtenae*

f. Subespecie VI. *S. enterica subsp. Indica*

- **Salmonella bongori.** Subespecie V: No constituye un patógeno para los humanos pero si ha sido implicada en ciertas patologías en animales (Grimont y Weill, 2007; Stanchi, 2007; Terragno et al., 2003).

#### 1.4.6. Epidemiología de la *salmonella spp.*

*Salmonella spp* es la enterobacteria de mayor importancia a nivel de Salud Pública por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia no solo en el ser humano, sino en todas las especies animales (Selbitz, 1995; Turnbull, 1979, Lujan y Blas, 2007).

Los microorganismos del género *Salmonella* están extensamente diseminados en la naturaleza como comensales y como patógenos del aparato digestivo de los mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos, en los cuales pueden llegar a producir una amplia gama de enfermedades. Todas las salmonellas son potencialmente patógenas (Stanchi, 2007; Smith, 1952; Mahajan, 2003); al ser parásitos intracelulares y por medio de los macrófagos en los que se encuentran, se diseminan por todo el organismo afectado aprovechando la vía linfática y sanguínea (Smith, 1952; Suter, 1956; Stanchi, 2007).

En medicina humana están descritas diversas presentaciones de salmonelosis: fiebre entérica, septicemia, y finalmente gastroenteritis; mientras tanto, en medicina

veterinaria se ha determinado que esta bacteria puede provocar septicemia, enteritis aguda, sub-aguda y crónica, y abortos en diferentes especies animales (Stanchi, 2007).

Las diversas especies de salmonellas se transmiten por contacto tanto con enfermos como con portadores sanos, aunque por lo general la enfermedad producida por este agente microbiano tiene un origen alimentario debido a la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno, teniendo en cuenta que la fuente de contaminación ambiental es invariablemente la materia fecal (Stanchi, 2007; Smith, 1952).

**Figura N° 3:** *Salmonella spp.*



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

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. DELIMITACIÓN DE ESTUDIO

##### 2.1.1. Área de colecta de *Luma chequen* (Arrayan)

Para la presente investigación las hojas de *Luma chequen* (Arrayan) fueron colectadas en la comunidad de Choquepata del Distrito de Oropesa, Provincia de Quispicanchis, departamento de Cusco, ubicada a 3400 m de altitud con una ubicación geográfica de Latitud: 13°57'32.9" sur. Longitud: 71°78'66.4" oeste.

**Figura N° 4: ubicación geográfica de la colecta de *Luma chequen* (arrayan)**



**Fuente:** Google Earth, 2015

### 2.1.2. Área de muestreo de *Cavia porcellus* (cuy)

Las muestras fueron recolectadas de tres cuencas (Anilmayo, Huchumayo y Vilcanota) del Distrito de Quiquijana, ubicada a 3400 m de altitud con una ubicación geográfica de Latitud: 13°57'32.9" sur. Longitud: 71°78'66.4" oeste; de la Provincia de Quispicanchis departamento de Cusco.

**Figura N° 5: Mapa satélite de la zona geografía de muestreo de cuyes del distrito de Quiquijana.**



**Fuente:** Google Earth, 2015

## **2.2. MATERIALES**

### **2.2.1. Muestra biológica**

- 4.5 kilos de hojas de la especie *Luma chequen* (arrayan).
- 30 muestras de hígado de cuy.

### **2.2.2. Material de campo**

- Cuaderno de campo
- Prensa botánica
- Libreta de campo
- Lapiceros marcadores
- Tijera de podar
- Cámara fotográfica
- Papel periódico
- Bolsas de Papel Kraff

### **2.2.3. Materiales de laboratorio**

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 5,10 y 15 ml
- Matraces Erlenmeyer de 250 a 500 ml.
- Placas Petri
- Bagueta
- Pipetas pasteur 1, 5 y 10 ml
- Probeta 10, 50,100 ml
- Lamina porta objetos
- Embudo de decantación.

- Botellas de vidrio de color oscuro de 5 y 10 ml.

#### **2.2.4. Equipos**

- Balanza analítica electrónica (H.W. Kessel.S.A, modelo GR-200)
- Incubadora (H.W. Kessel.S.A, modelo EK-610)
- Horno Pasteur (Mermet a 180° C/ hora)
- Autoclave (Phoemix modelo AV- 75 PLUS 121X 15 min)
- Refrigeradora (MADE)
- Cocinilla a gas (FRADIC)
- Cocinilla eléctrica (PREMIER)
- Destilador (Ivymen modelo- AC- L8)
- Cromatografo Angilent- packard (6890 N)
- Microscopio (INCB, 2002).
- Un equipo de acero inoxidable para la destilación olla autoclave, condensador y separador de aceite. (Albrigi Luigi)

#### **2.2.5. Medios de cultivos**

- Agua de peptona tampónada (APT)) Merck Alemán
- Agua pectonada (AP) Merck Alemán
- Agar tripticasa soya (TSA) Merck Alemán
- Agar verde brillante rojo fenol lactosa sacarosa (BPLS) Merck Alemán
- Agar SS Merck Alemán
- Agar Muller Hinton Merck Alemán
- Caldo tripticasa de soya (TSA) Merck Alemán
- MIO Merck Alemán

- Citrato de Simons Merck Alemán
- Caldo con verde de malaquita y cloruro de magnesio (Rappaport). Merck Alemán
- Caldo selenito cistina (SC) Merck Alemán
- Agar hierro tres azucares (TSI) Merck Alemán
- Caldo urea caldo cianuro de potasio Merck Alemán
- Agar lisina hierro (LIA) Merck Alemán

#### **2.2.6. Reactivos**

- Mac Farland Standard
- Enrofloxacin
- Peróxido de hidrogeno
- Reactivo de Kovacs
- Bateria de coloración Gram

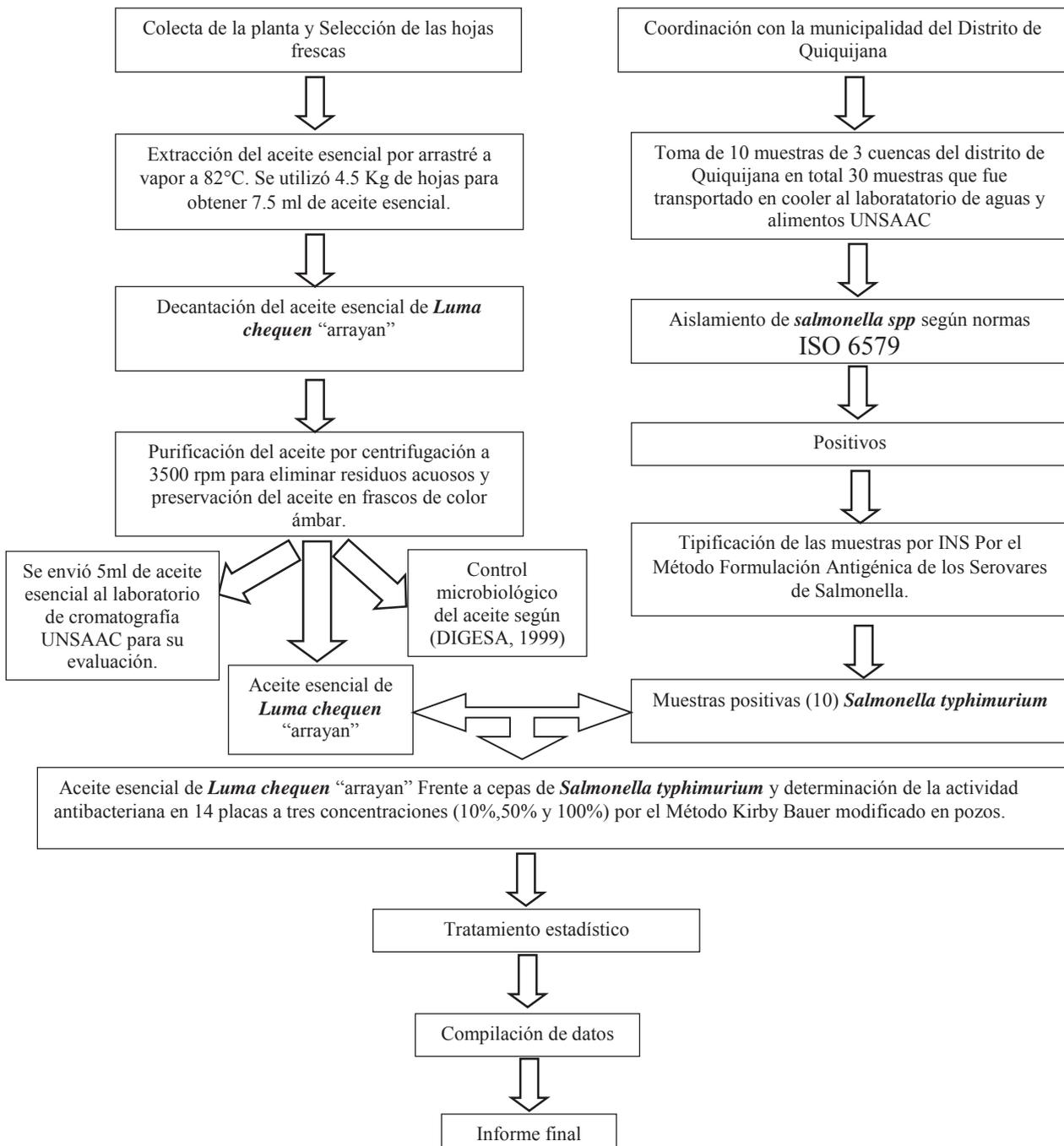
#### **2.2.7. Otros Materiales**

- Micropipetas calibradas de 10 - 1000 ul
- Puntas de micropipetas
- Hisopos estériles
- Algodón
- Asas y agujas de siembra
- Mechero Bunsen
- Gradilla metálica
- Cinta maskin
- Papel aluminio

- Pinzas estériles
- Tenedores
- Cuchillos
- pabilo
- Mandil o guarda - polvo
- Barbijos o mascarillas
- Guantes
- Materiales de escritorio
- Tijera estéril
- Ligas
- Vernier Automatizado para la medición de halo inhibitorio

## 2.3. METODOLOGIA

### 2.3.1. Flujoograma de la metodología de la investigación



Fuente: Elaboración propia

### 2.3.2. Diseño de la investigación

| Hora de inicio ± 9:00 Am  |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
|---|-------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Réplica del primer bloque   | LC/S <sub>1</sub> | LC/S <sub>2</sub>   | LC/S <sub>3</sub>  | LC/S <sub>4</sub>  | LC/S <sub>5</sub>  | LC/S <sub>6</sub>  | LC/S <sub>7</sub>  |
| Réplica del segundo bloque  | LC/S <sub>8</sub> | LC/S <sub>9</sub>   | LC/S <sub>10</sub> | LC/S <sub>11</sub> | LC/S <sub>12</sub> | LC/S <sub>13</sub> | LC/S <sub>14</sub> |
| <p>En los pozos 1,2 y 3 se inoculó 10ul de aceite esencial de <i>Luma chequen</i> a diferentes concentraciones (100, 50,10%) como se ve en la figura, al pozo 4 se inoculó 10ul de Enrofloxacina como control positivo y al pozo 5 se inoculo 10ul de DMSO como control negativo.</p> |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
|   |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
| <p>Para las todas las placas del (LC/S<sub>1</sub>... LC/S<sub>14</sub>) se hizo el mismo procedimiento y se incubo a una temperatura óptima de 37°C.</p>   |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
| Evaluación a las 24 horas   |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
| Hora de lectura ± 10:30 Am  |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
|   |                   | <p>Se midió los halos de inhibición con vernier automatizado</p>  |                    |                    |                    |                    |                    |
| Evaluación a las 48 horas   |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
| Hora de lectura ± 11:00 Am  |                   |   |                    |                    |                    |                    |                    |
|   |                   | <p>Se midió los halos de inhibición con vernier automatizado.</p> |                    |                    |                    |                    |                    |

**Leyenda:**

**LC/S:** Placas con aceite de *Luma chequen* y *Salmonella typhimurium*

**AE:** Aceite esencial

**DMSO:** Dimetil - sulfoxido

### **2.3.3. Colecta de la muestra vegetal**

#### **2.3.3.1. Selección y colecta de la muestra vegetal**

Se identificó in situ la especie vegetal y se inició con el transporte de ramas con hojas en Bolsas de Papel Kraff para luego separar las hojas de las ramas para ser limpiadas y seleccionadas, separando hojas con síntomas de enfermedad, previo su procesamiento al final se obtuvo 4.5 Kg para la extracción del aceite esencial.

#### **2.3.3.2. Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor**

El aceite esencial fue obtenido en el laboratorio de microbiología de aguas y alimentos en el pabellón de control de calidad de la UNAAC, según la metodología descrita por (Cazar, 2011). El material vegetal se sometió a un proceso de hidrodestilación en un equipo de extracción por arrastre de vapor. Los productos de la destilación fueron separados por densidad en el decantador. El proceso inició cuando el sistema alcanzó la temperatura de ebullición del agua (82°C a 3400 m) y duró aproximadamente 30 minutos. El aceite esencial fue colectado en viales cónicos y centrifugados a 3500 rpm para eliminar residuos acuosos. Posteriormente los aceites fueron almacenados en frascos ámbar y protegidos de la luz hasta su evaluación.

#### **2.3.3.3. Control microbiológico del aceite esencial**

Los criterios para el control microbiológico del aceite se realizaron de acuerdo a la DIGESA y son los siguientes:

**Tabla N° 1: Criterios para el Control Microbiológico del Aceite Esencial (según DIGESA, 1999)**

| CRITERIOS   | BACTERIAS          | LIMITES PERMISIBLES (UFC/g)                 |
|---|--------------------|---|
| Criterio Imperativo: este microorganismo no debe presentarse. La presencia excesiva de este indica un riesgo elevado.   | Salmonella         | Ausente                                     |
| Criterio Indicativo de higiene: la presencia excesiva de este indica que la higiene en el proceso ha sido deficiente. Por lo que el producto no debe exceder los límites especificados en este rubro. | Coliformes fecales | Ausente                                     |
| Criterios de alerta o límites críticos: significa que el producto no debe exceder los límites especificados en este rubro.  | Aerobios mesofilos | 5x10 <sup>5</sup> -5x10 <sup>6</sup> ufc/g. |
|   | Hongos y levaduras | 10-10 <sup>2</sup> ufc/g.                   |

#### 2.3.3.4. Análisis Cromatografico

Para obtener el análisis cromatografico detallado de los componentes del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) se envió al laboratorio 5 ml de aceite esencial; este análisis fue desarrollado en el laboratorio de Cromatografía de gases de la UNSAAC y se utilizó un cromatografo Agilent – Packard modelo 6890N.

El análisis se realizó en un gradiente de temperatura de 60°C a 240°C; los constituyentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con la base de datos de la biblioteca NIST V 8.0; los resultados obtenidos fueron correlacionados con los índices de retención.

### 2.3.3.5. Dilución del Aceite Esencial

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan), se procedió a diluir el aceite de arrayan puro con DMSO (Dimetil sulfoxido) en tubos de ensayo, de tal manera se trabajó con concentraciones correspondientes de 100%, 50% y 10% de aceite de arrayan. (NCCLS, 2002 modificado por Romero, 2014)

**Figura N° 6: Imagen de las tres diferentes concentraciones que se trabajó (10%. 50%, 100%)**



**Fuente:** Elaboración propia

#### **2.3.4. Colecta de hígado de cuy**

El hígado de cuy fueron muestras obtenidas de los cuyes proveniente de las tres cuencas (Anilmayo, Huchumayo y Vilcanota) muestras del distrito de Quiquijana, previa verificación y seguimiento de muestras procedentes de la zona se colectó el hígado en la ciudad del Cusco en el camal ubicado en Jirón José Luis Orbegoso S/N distrito de Santiago. Se colectó asépticamente en frascos estériles, se rotularon correctamente e inmediatamente se trasladaron en cooler al Laboratorio de microbiología de Aguas y Alimentos en el Pabellón de Control de Calidad de la UNSAAC. Se obtuvieron un total de 30 muestras de hígado (animales sacrificados para el consumo humano) de sistema familiar- comercial.

#### **2.3.5. Aislamiento de *Salmonella spp.* (Según las normas ISO 6579)**

El procesamiento de las muestras de hígados de cuyes se realizó siguiendo las técnicas descritas en el manual de análisis microbiológico normas ISO 6579 (directiva general concerniente a los métodos de investigación de salmonella, 2006) este método se basa en cuatro etapas sucesivas como se describe a continuación:

##### **A. Pre enriquecimiento**

- Se pesó 25g de hígado de cuy asépticamente por cada muestra obtenida.
- Las muestras pesadas fueron colocadas en frascos conteniendo 225 ml de agua peptonada tamponada (APT) caldo de enriquecimiento para *salmonella*.
- Seguidamente se homogenizo durante un minuto
- Proceder a incubar a 37° C por 24 horas.

## **B. Enriquecimiento**

- Extraer 1ml del caldo de pre enriquecimiento a caldo rappaport
- Proceder a incubar a 42 ° C por 24 horas
- Extraer 1ml a caldo de pre enriquecimiento a selenito cistina
- Proceder a incubación a 37° C 24 horas y 24 horas suplementarias.

## **C. Aislamiento**

- Se sembró un inóculo a partir del caldo enriquecido anterior en placas con agar SS (salmonella shiguela) Y agar BPLS (verde brillante rojo fenol lactosa -sacarosa), mediante la técnicas de agotamiento en superficie de estrías.
- Posteriormente se incubó a 37° C por 24 horas y si es necesario 48 horas.
- Se aisló las colonias compatibles o típicas del género *salmonella*.
- En el agar SS (*Salmonella - Shiguela*), la presencia de colonias pequeñas redondas, incoloras con centro negro.
- En el agar BPLS (verde brillante rojo fenol lactosa -sacarosa), la presencia de colonias pequeñas de color rosáceo con borde blanquecino.

## **D. Perfil bioquímico convencional**

- Se realizó las pruebas de identificación convencionales: coloración Gram, catalasa, TSI, LIA, MIO, citrato, ureasa e indol.

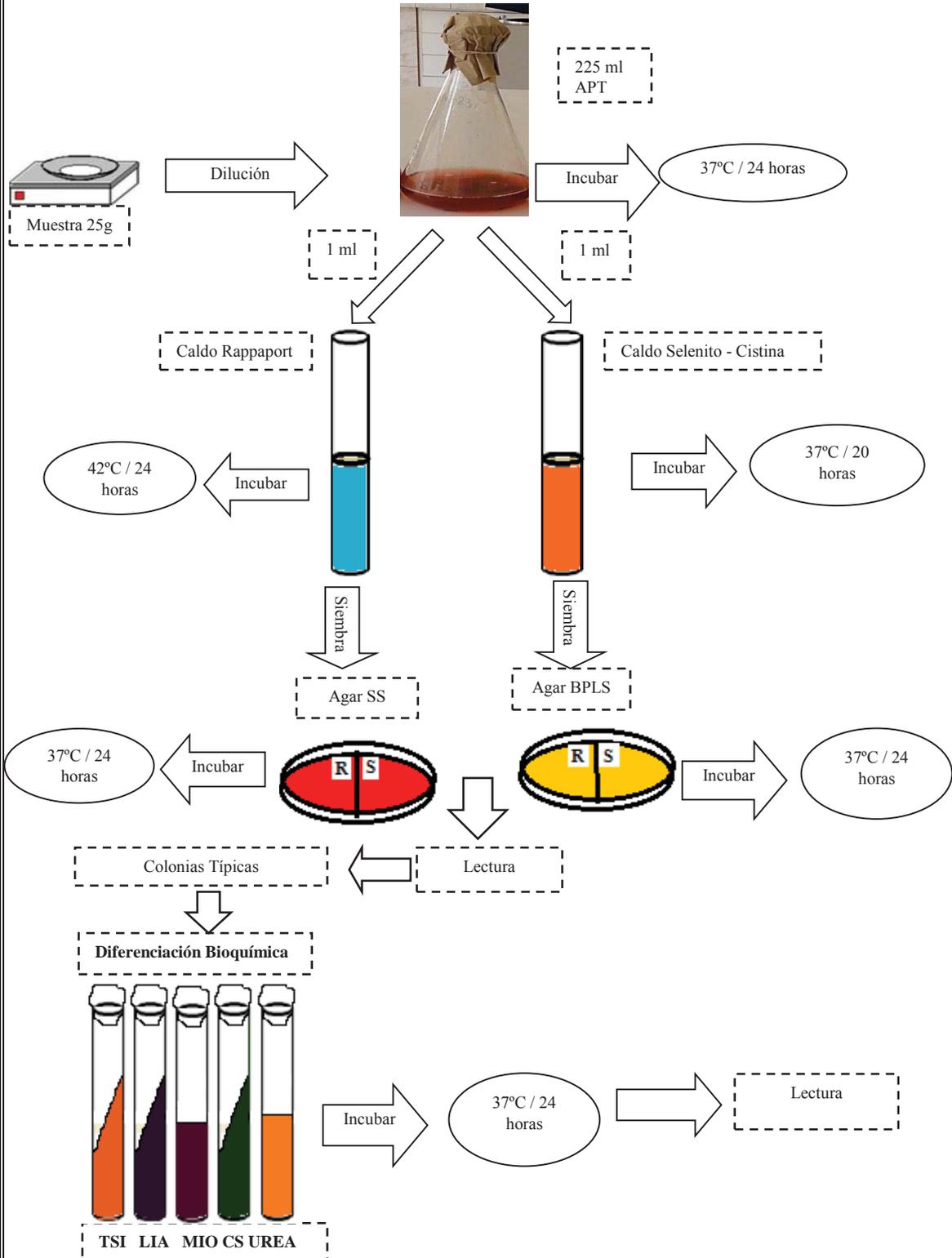
### **2.3.5.1. Tinción de Gram para *salmonella spp.***

- En un portaobjetos se preparó un frotis de las colonias para observar y se fijó a llama directa.

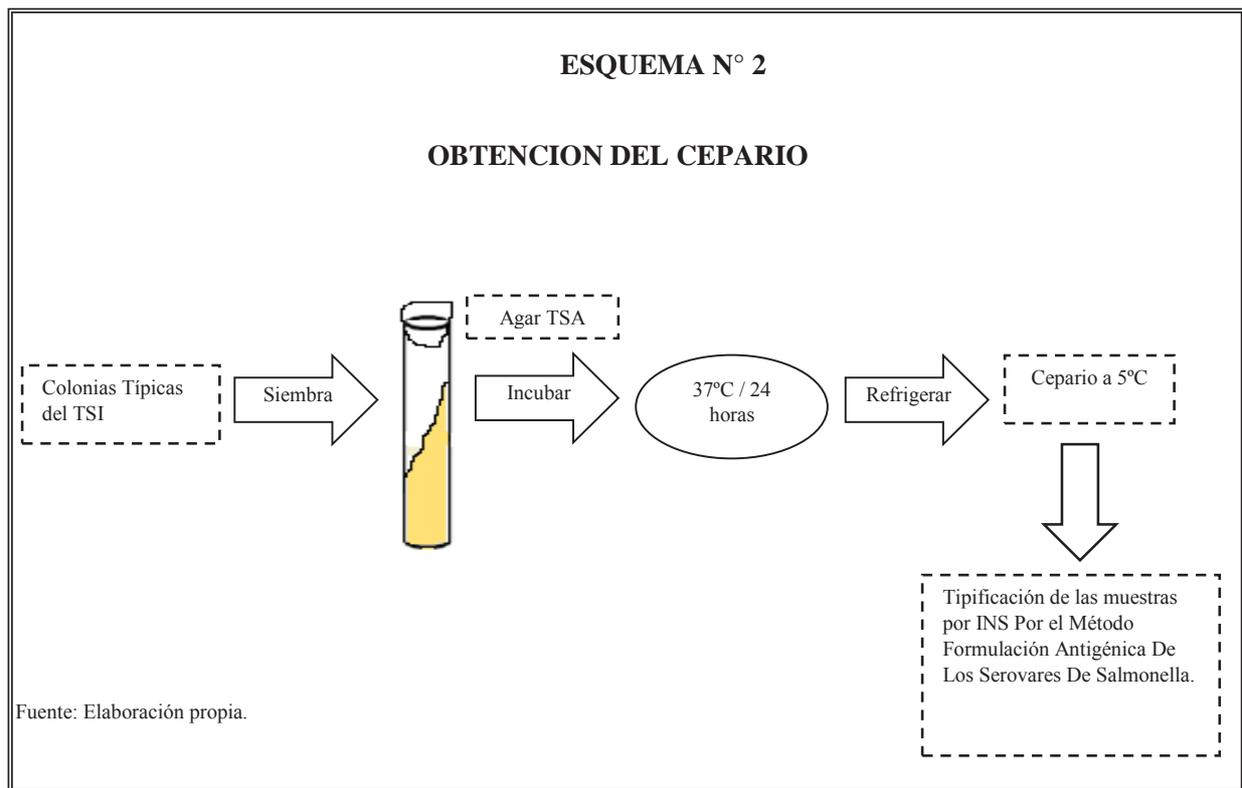
- Se cubrió el frotis con cristal violeta y se dejó reaccionar por 1 min. Se quitó el exceso de colorante y se lavó con agua corriente.
- En seguida se aplicó lugol, se dejó reaccionar por 1 min y se lavó con agua corriente. Con cuidado se agregó alcohol acetona, gota a gota en el portaobjetos inclinándolo, se lavó con agua corriente.
- Se cubrió el frotis con la solución de safranina y se dejó reaccionar por 30 segundos, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar al aire.
- Se observó al microscopio a 100X.

# ESQUEMA N° 1

## PREPARACION DE LA MUESTRA Y DILUCION DEL HIGADO DE CUY



Fuente: Elaboración propia.



### **2.3.6. Evaluación antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) mediante el método Kirby Bauer modificado en pozos.**

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (Método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad (NCCLS, 2001).

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo el cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad

en el laboratorio ha sido estandarizado, a un patrón de 0.5 equivale a  $1.5 \times 10^8$  (UFC) ml en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Hernández, 2003).

Los medios de cultivo más utilizados son el Agar Mueller Hinton y Agar tripticosa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (Winn, 2008).

El fundamento de esta determinación es establecer en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar en un pozo de 6 mm de diámetro con una cantidad de la sustancia (Doughari, 2006). Se incuba la placa 24 horas y se observa la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del pozo o disco que contiene el agente antimicrobiano al cual es susceptible el microorganismo, los microorganismos que son resistentes crecerán hacia la periferia del disco. Su sencillez, rapidez de ejecución, economía y reproducibilidad la convierten en una de las pruebas más útiles, y con seguridad la más empleada para la determinación de la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Forbes (2007) y NCCLS (2002).

### 2.3.6.1. Reconstitución de las cepas (Según Negroni, 2009)

A partir de las cepas de cultivo puro de *salmonella typhimurium*, se cultivó en placa de Tripticasa Soya Agar (TSA) con un desarrollo de 48 horas a 37° C, se seleccionaron 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo morfológico, para la reconstitución de las cepas se procedió de la siguiente manera:

- Se tomaron 5 colonias seleccionadas con un asa de siembra estéril y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo BHI.
- Se incubó el caldo a una temperatura entre 37 °C por 6 horas (para que la bacteria alcance la fase exponencial) y se comparó la turbidez desarrollada del tubo con el patrón de Mc Farland equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland, que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC/ml.
- La cepa reconstituida se sembró en 14 placas Petri (0.1 ml de inóculo en cada placa extendidas con un hisopo estéril) que contenían el agar Muller Hinton, se dejaron secar de tres a cinco minutos.
- Seguidamente se vertió 10ul de las concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* arrayan (10%, 50%, 100%) y la solución control positivo y control negativo.
- Se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se incubó a 37°C durante 24 horas para la primera lectura.
- Finalmente se continuó con la incubación a 37°C durante 24 horas más para una segunda lectura.

### 2.3.6.2. Lectura e interpretación de los resultados

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se precedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de los halos de inhibición, se midieron los diámetros en mm de cada halo de inhibición en tres direcciones, empleando un vernier automatizado (CLSI 2013).

### 2.3.7. Análisis de datos estadísticos

La presente investigación está basada en un estudio experimental aleatorio, el análisis estadístico se determinó por medio de la prueba ANOVA, prueba POST HOC, T STUDENT regresión, coeficiente de correlación y coeficiente de determinación en el paquete estadístico SPSS versión 21.

#### ➤ ANOVA

Para determinar si las medias muestrales son similares o iguales o difieren, se utilizó el siguiente planteamiento de hipótesis.

Planteamiento:

Ho:  $\mu A = \mu B = \mu C = \mu D$ ; esta hipótesis nula se acepta si  $\text{sig} > 0,05$

H1:  $\mu A \neq \mu B \neq \mu C \neq \mu D$ ; esta hipótesis alterna se acepta si  $\text{sig} < 0,05$

Para nuestro caso, nos planteamos el siguiente enunciado

Ho: Las diferentes concentraciones del 10%, 50% y 100% NO INFLUYEN en el incremento del diámetro del halo: esta hipótesis nula se acepta si  $\text{sig} > 0,05$

H1: Las diferentes concentraciones del 10%, 50% y 100% INFLUYEN en el incremento del diámetro del halo: esta hipótesis alterna se acepta si  $\text{sig} < 0,05$ .

➤ PRUEBA POST HOC

Para comprobar grupo por grupo y ver si dentro de ellos existe alguna igualdad o no, de medias, se utilizó la prueba post hoc de HSD de Tukey y de igual manera determinar si existen grupos similares o subconjuntos de grupos homogéneos.

Planteamiento para la prueba del post hoc

Ho: Las medias muestrales de las comparaciones de una concentración con otra concentración NO DIFIEREN (se acepta si  $\text{sig} > 0,05$ )

H1: Las medias muestrales de las comparaciones de una concentración con otra concentración DIFIEREN (se acepta si  $\text{sig} < 0,05$ )

➤ T DE STUDENT

Para este caso se aplica T de student correlacional o para muestras dependientes, ya que se trata de las mismas muestras pero evaluadas con un factor de tiempo diferente (antes-después o inicial-final), siendo dicho factor en este caso las 24 horas como una evaluación inicial y a las 48 horas como la evaluación final.

Planteamiento:

Ho: El factor tiempo de 24 y 48 horas NO INFLUYEN en el incremento del diámetro del halo (se acepta esta hipótesis si el valor de sig es mayor a 0,05,  $\text{sig} > 0.05$ )

H1: El factor tiempo de 24 y 48 horas INFLUYEN en el incremento del diámetro del halo (se acepta esta hipótesis si el valor de sig es menor a 0,05,  $\text{sig} < 0.05$ )

**CAPITULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**3.1. Obtención del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan)**

**Tabla N° 2: Cantidad extraída del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan).**

| Especie                       | Cantidad de materia prima | Cantidad de aceite esencial |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Luma chequen</i> (arrayan) | 4.5 Kg                    | 7.5 ml                      |

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla N° 2, muestra la cantidad extraída de aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) por arrastre a vapor; fue de 7.5 ml a partir de 4.5 kg de materia prima (hojas). Esta cantidad fue adecuada para el estudio de la actividad antibacteriana en el presente trabajo de investigación.

Por lo que difiere con el trabajo de (Mantilla, 1997) que extrajo en relación a 4.5 kg la cantidad de 6.85ml de aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) en el Valle Sagrado de los Incas – Cusco. Demostrando que los factores ambientales como clima, temperatura, humedad y principalmente el tipo de suelo influyen en el rendimiento de aceite esencial.

Gonzales et al. (2014) realizaron de la extracción del aceite esencial *Myrtus communis L.* obteniendo 0.2ml/100g de material fresco por el método de hidrodestilación, equipo Clevenger. Por lo que difiere del presente trabajo de investigación porque el porcentaje de rendimiento fue mayor al obtenido en el presente trabajo de investigación. Sin embargo, es importante recordar que el rendimiento puede variar dependiendo de la región y época de cosecha del arrayán, así como del modo de proceso y preparación de la muestra utilizada; subvalorando la producción de aceites esenciales por la planta.

### 3.2. Control microbiológico del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan).

**Tabla N° 3: Resultados del Control microbiológico del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan).**

| CRITEROS  | Aceite esencial<br><i>Luma chequen</i> (arrayan) |
|---|--|
| Numeración de microorganismos aerobios mesófitas viables UFC/ml | Ausente  |
| Investigación de Salmonella/ shigella UFC/ml                    | Ausente  |
| Investigación de enterobacterias UFC/ml                         | Ausente  |
| Hongos y levaduras UFC/ml                                       | Ausente  |

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla N° 3 los resultados nos indica que el aceite se encuentra libre de contaminantes de microorganismos aerobios mesofilos viables, salmonella, enterobacterias (*Escherichia coli*), hongos y levaduras. Por lo que nos confirma que el aceite esencial es apto para la realización del estudio ya que de esta manera se eliminó los posibles riesgos de contaminación y alteración de resultados que se podrían presentar en el estudio, cumpliendo así con los criterios microbiológicos de calidad por la resolución ministerial N° 615-2003-SA/ DM aprobado por la DIGESA.

### 3.3. Determinación de los componentes del aceite esencial por cromatografía de gases

El aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan), presenta una densidad de 0.88.

**Tabla N° 4: Resumen de la composición química del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan).**

| N° | Compuesto                        | Tiempo de Retención (minutos). | Contenido Relativo % |
|----|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| 1  | Ethyl-2methylbutyrate            | 5.204                          | 0.22                 |
| 2  | 2-Methylbutylacetate             | 5.822                          | 0.12                 |
| 3  | Isobutyl isobutyrate             | 6.672                          | 2.94                 |
| 4  | alpha-phellandrene               | 7.154                          | 0.60                 |
| 5  | alpha-Pinene,                    | 7.483                          | 37.90                |
| 6  | delta-3-carene                   | 7.483                          | 37.90                |
| 7  | gamma-Terpinene                  | 7.483                          | 37.90                |
| 8  | Camphene                         | 7.817                          | 0.35                 |
| 9  | beta-Pinene                      | 8.604                          | 8.95                 |
| 10 | Myrcene                          | 8.773                          | 0.12                 |
| 11 | Geranyl formate                  | 8.773                          | 0.12                 |
| 12 | alpha-Irone                      | 9.644                          | 0.24                 |
| 13 | p-Cymene                         | 9.868                          | 0.45                 |
| 14 | Limonene                         | 10.021                         | 3.70                 |
| 15 | Eucalyptol                       | 10.160                         | 14.07                |
| 16 | Terpinolene                      | 11.784                         | 0.37                 |
| 17 | alpha-terpinene                  | 11.784                         | 0.37                 |
| 18 | Linalol                          | 12.059                         | 9.71                 |
| 19 | Fenchyl alcohol                  | 12.617                         | 0.24                 |
| 20 | Isoborneol (Isomer 2)            | 14.249                         | 0.39                 |
| 21 | 4-Carvomenthenol; terpinene-4-ol | 14.562                         | 0.64                 |
| 22 | alpha-Terpineol                  | 14.947                         | 3.07                 |
| 23 | Citral                           | 17.184                         | 0.22                 |
| 24 | Phenethyl butyrate               | 20.842                         | 0.09                 |
| 25 | beta-Caryophyllene               | 21.835                         | 0.68                 |
| 26 | Valencene                        | 23.662                         | 1.00                 |

**Fuente:** Datos obtenidos en el Laboratorio de cromatografía de gases UNSAAC 2016

En la tabla N°4 la detección de los componentes del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) los componentes mayoritarios son: alpha-Pinene, delta-3-carene y gamma-Terpinene con 37.90%, eucaliptol con 14.07%, linalol 9.71% y beta pinene con un 8.95% a los que podrían atribuirse la propiedad antibacteriana.

Los resultados de la presente investigación difiere de (Moina, 2015), que reporto los siguientes componentes mayoritarios  $\alpha$  – pineno con 61.19%, 4 – carvamenthenol con 9.76%,  $\beta$ -pineno con 8.18% y linalol con 7.41%. Coincidiendo con tres componentes en menores porcentajes al presente estudio se puede decir que el sitio de colecta influye en el porcentaje de componentes.

(Mantilla, 2015), reporto los siguientes componentes mayoritarios  $\alpha$  – pineno con 61.72%, 1,8 cineol con 10.30%;  $\beta$ -pineno con 6.67% y linalol con 6.03%. Concordando con tres componentes en menores porcentajes al presente estudio.

Goncalves y Col. (2001), Portugal. Reportaron que el aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) posee tres componentes principales ( $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y linalol) probablemente responsables de la actividad antibacteriana. La investigación coincide con dos componentes ( $\alpha$ -pineno y linalol).

La diferencia entre los porcentajes de cada componente de las investigaciones se puede deber a diversas razones. Primero, los nutrientes de diferentes suelos y su acumulación en las hojas podría resultar en diferente metabolismo y la producción de diferentes productos biológicos y aceites volátiles. Segundo, el cambio en los genes a través de las generaciones e hibridaciones, puede resultar en la producción de una variedad de aceites volátiles.

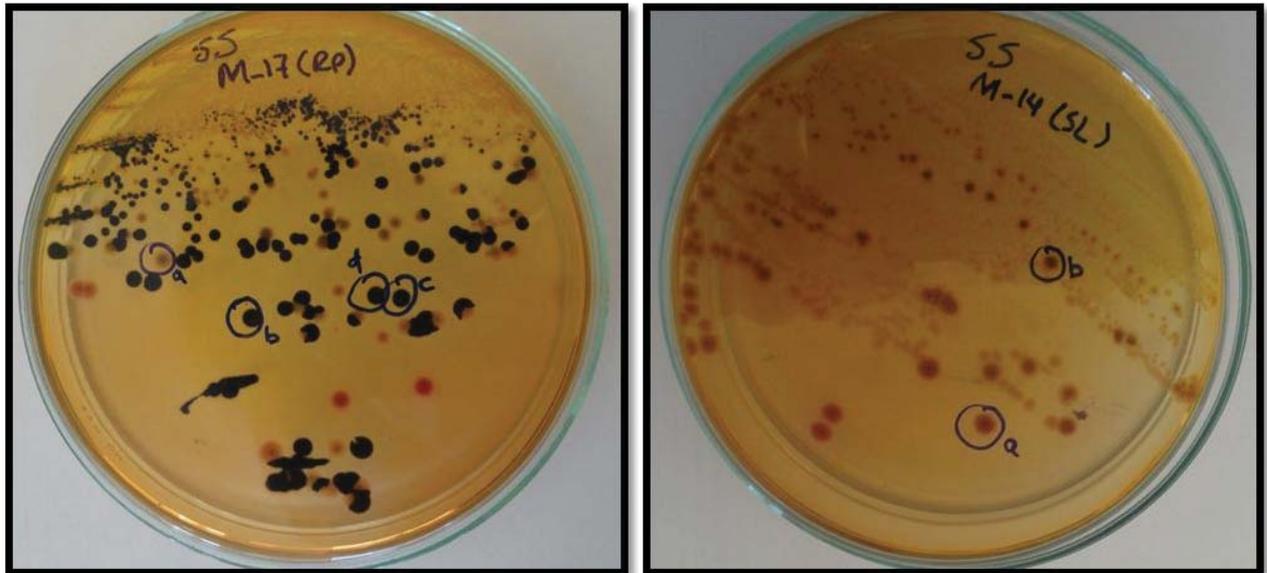
Sin embargo, es difícil comparar directamente los datos con la literatura señalada porque varias variables influyen en los resultados, como la diferente composición química del aceite esencial debido a factores ambientales (como la geografía, la temperatura, la duración del día, nutrientes, etc.) a los que se encuentra expuesta la planta. Estos factores intervienen en las vías biosintéticas y en consecuencia, la proporción relativa de los principales compuestos característicos. Entonces, como la mayoría de los trabajos citados son provenientes de una región completamente distinta a la nuestra, es muy probable que esta sea una de las razones de las discordancias encontradas.

Los resultados del presente trabajo difiere con Carhuapoma (2005) reporto  $\alpha$ -Pinene (57.3%), 1,8-cineole (7.5%) y Linalool (3.7%).

Gonzales et al., (2014) los componentes mayoritarios en el aceite de *M. communis* son:  $\alpha$ -Pinene (29.1%), Limonene (21.5%), 1,8-cineole (17.9%) y Linalool (10.4%), siendo los dos últimos los principales responsables de su efecto antibacteriano. Lo que coincide con este trabajo en uno de los componentes Linalol en (9.71%), Compuestos terpenoide cuyo principal mecanismo de acción propuesto consiste en la destrucción de la membrana celular bacteriana mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana.

### 3.4. Aislamiento de *salmonella spp*, a partir de muestras de hígado de cuy

**Figura N° 7: Desarrollo de colonias de *Salmonella spp* en Agar SS (Agar *Salmonella - shiguela*).**



Colonias típicas de salmonella spp en Agar SS (izquierda), con inóculos de caldo rappaport (derecha) con caldo selenito - cistina.

**Fuente:** Elaboración propia

#### **Resultados:**

En la figura N° 7, se observa ccolonias típicas (negras con halo transparentes.) de *Salmonella spp* en Agar (*salmonella - shiguela*), pprovenientes de hígado de cuy del distrito de Quiquijana de la Provincia de Quispicanchis. El aislamiento y desarrollo para *Salmonella spp*, fue mejor en el agar SS y con inóculos de caldo rappaport.

### 3.5. Identificación de *Salmonella spp* por el perfil bioquímico convencional.

Figura N° 8: Perfil bioquímico convencional de *Salmonella spp*.



#### Resultados:

De los cultivos presuntivos para *Salmonella spp*, para las pruebas bioquímicas diferenciales se identificó (TSI (K/A), LIA (K/K), catalasa positiva, Indol positivo, H<sub>2</sub>S positivo, gas positivo, movilidad positivo, citrato positivo, urea negativa) para los cultivos de las muestras (1,2,6,9,17,18,26,28,29,30). Finalmente se obtuvieron 10 cepas de *Salmonella spp*, provenientes del hígado de cuy del distrito de Quiquijana, como se observa en el anexo N°5.

### 3.5.1. Identificación de la especie del género *Salmonella spp*, del distrito de Quiquijana

**Tabla N° 5: Distribución e identificación de *Salmonella typhimurium***

| Sector              | N° de muestra | Órgano | <i>Salmonella spp</i><br>(Por<br>Diferenciación<br>Bioquímica<br>Convencional ) | <i>Salmonella typhimurium</i> (Por<br>el Método<br>formulación<br>antigénica de los<br>Serovares) |
|---------------------|---------------|--------|---|---|
| CUENCA<br>VILCANOTA | 1             | Hígado | +   | +   |
|                     | 2             | Hígado | +   | +   |
|                     | 3             | Hígado | -   | -   |
|                     | 4             | Hígado | -   | -   |
|                     | 5             | Hígado | -   | -   |
|                     | 6             | Hígado | +   | +   |
|                     | 7             | Hígado | -   | -   |
|                     | 8             | Hígado | Sin crecimiento   | Sin crecimiento   |
|                     | 9             | Hígado | +   | +   |
|                     | 10            | Hígado | Sin crecimiento   | Sin crecimiento   |
| CUENCA<br>ANILMAYO  | 11            | Hígado | -   | -   |
|                     | 12            | Hígado | -   | -   |
|                     | 13            | Hígado | -   | -   |
|                     | 14            | Hígado | -   | -   |
|                     | 15            | Hígado | Sin crecimiento   | Sin crecimiento   |
|                     | 16            | Hígado | -   | -   |
|                     | 17            | Hígado | +   | +   |
|                     | 18            | Hígado | +   | +   |
|                     | 19            | Hígado | -   | -   |
|                     | 20            | Hígado | -   | -   |
| CUENCA<br>HUCHUMAYO | 21            | Hígado | Sin crecimiento   | Sin crecimiento   |
|                     | 22            | Hígado | -   | -   |
|                     | 23            | Hígado | -   | -   |
|                     | 24            | Hígado | -   | -   |
|                     | 25            | Hígado | -   | -   |
|                     | 26            | Hígado | +   | +   |
|                     | 27            | Hígado | -   | -   |
|                     | 28            | Hígado | +   | +   |
|                     | 29            | Hígado | +   | +   |
|                     | 30            | Hígado | +   | +   |
| total               | 30            |        | <b>10</b>   | <b>10</b>   |

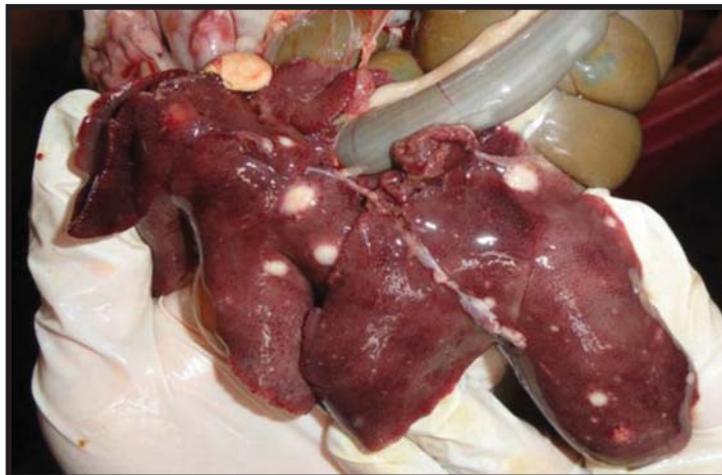
**Fuente:** Elaboración propia en base del anexo N° 5 y anexo N°13

La tabla N° 5, se idéntico *Salmonella typhimurium* por INS para las 10 muestras positivas para *Salmonella Spp*, provenientes de los tres cuencas del distrito de Quiquijana. La presencia de *Salmonella typhimurium* como agente patógeno en un 33.33% (10/30).

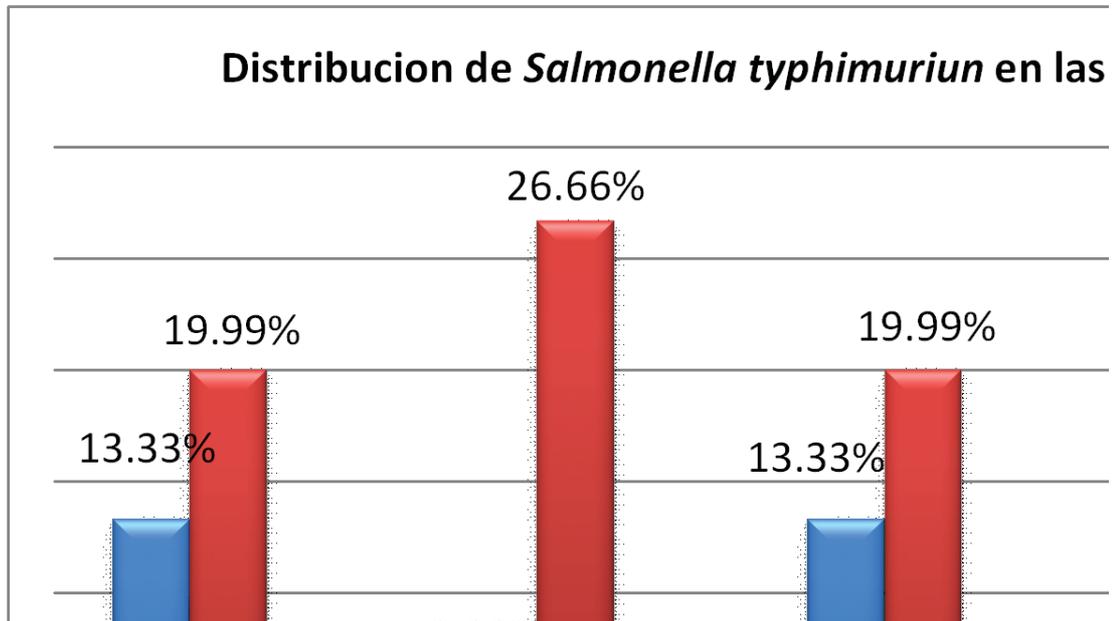
Los resultados obtenidos concuerda con (Guamán, 2014), identifico a *Salmonella typhimurium* como agente patógeno en todos los sistemas de crianza en la Comunidad de Oñacapac del Cantón Saraguro, cuenca del Ecuador en un 35%, lo cual se asemeja al presente estudio.

Los resultados obtenidos para el aislamiento de *Salmonella spp*, se encuentran próximos respecto a Layme M. y Col. (2011) Perú. En sus estudios realizados en **lesiones** anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) el hígado fue órgano donde se aisló con mayor frecuencia *Salmonella spp*, de 80 muestras se identificó 53 muestras con *Salmonella spp*, y se evidenciaron lesiones anatomopatológicas especialmente la hepatitis necrótica. Donde se observó abscesos purulentos presentes en 4 muestras (2, 17, 25,30) ver Figura N° 9.

**Figura N° 9: Abscesos purulentos presentes en el hígado de cuy**



**Grafica N° 1: Presencia de *Salmonella typhimurium*, en las cuencas de Quiquijana**



**Fuente:** Elaboración propia en base a la tabla N°5

La acuerdo a la Grafica N°1 se observar que la evaluación realizada de las 30 muestras fraccionadas en cada cuenca de 10 muestras cada una, genero porcentajes que se observan en la gráfica N°1 de hígados de cuy que se aisló *Salmonella typhimurium*, en las cuencas de Quiquijana: Vilcanota 13.33%, Anilmayo 6.66% y en Huchumayo 13.33%. Esto refleja las bajas condiciones higiénicas sanitarias que cuentan los criaderos de estas zonas.

### 3.6. Determinación de la actividad antibacteriana del aceite de *Luma chequen* (arrayan)

frente a *Salmonella typhimurium*

Tabla N° 6: Resultados de la medición de halos de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* a las 24 horas.

| <i>Salmonella typhimurium</i>                          |             | Concentración del Aceite Esencial<br><i>Luma chequen</i> (Arrayan) |       |       | Enrofloxacina | Dimetil   |
|--|-------------|--|-------|-------|---------------|-----------|
|  |             | 10%  | 50%   | 100%  | 0.10%         | sulfoxido |
|  |             |  |       |       | C (+)         | C (-)     |
| HALO DE INHIBICION EN (mm)<br>evaluadas a las 24 horas | Placa N° 1  | 9.6  | 12.3  | 15.04 | 37.42         | 6         |
|  | Placa N° 2  | 9.54   | 12.44 | 15.82 | 37.52         | 6         |
|  | Placa N° 3  | 9.92   | 12.2  | 15.5  | 36.16         | 6         |
|  | Placa N° 4  | 10.2   | 11.96 | 14.52 | 34.16         | 6         |
|  | Placa N° 5  | 10.06  | 12.1  | 15.12 | 35.94         | 6         |
|  | Placa N° 6  | 9.4  | 12.5  | 14.58 | 35.32         | 6         |
|  | Placa N° 7  | 10.04  | 11.68 | 15.94 | 36.06         | 6         |
|  | Placa N° 8  | 10.26  | 11.64 | 15.48 | 36.48         | 6         |
|  | Placa N° 9  | 9.84   | 12.18 | 15.46 | 37.94         | 6         |
|  | Placa N° 10 | 10.52  | 11.84 | 15.58 | 34.34         | 6         |
|  | Placa N° 11 | 10.3   | 11.44 | 15.3  | 36.92         | 6         |
|  | Placa N° 12 | 9.1  | 12.78 | 15.14 | 36.82         | 6         |
|  | Placa N° 13 | 10.06  | 11.78 | 15.9  | 35.09         | 6         |
|  | Placa N° 14 | 10.14  | 12.76 | 15.13 | 36.06         | 6         |

**Fuente:** Elaboración propia

La tabla N° 6 muestra los diámetros de halos de la actividad antibacteriana del aceite de *Luma chequen* (Arrayan) con las tres concentraciones (10%, 50%, 100%) frente a cepas de *Salmonella typhimurium*, donde se observa sensibilidad a las 24 horas.

De acuerdo con lo reportado por Boderó (2010) que trabajó con el extracto *Mycianthes rhopaloides* (Arrayan) que presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* aislados de infecciones periodontales. En cuanto a *Luma chequen* (arrayan) se confirma que el aceite esencial obtenido a partir de las hojas posee actividad antibacteriana como lo han reportado para especies de la familia Myrtaceae.

Torres (2014) evaluó la actividad antimicrobiana del extractos orgánico *Luma chequen* “arrayán” frente a patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) y fúngicos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) aislados de hemocultivos y cepas controles ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis*). El método de extracciones sucesivas basados en la diferencia de polaridad de los solventes utilizados, mostró resultados favorables ya que el extracto crudo contiene una mezcla de metabolitos bioactivos que presentan actividad biológica, que no necesariamente pueden tener actividad antimicrobiana, posiblemente estos metabolitos actúen como antagonistas, por eso mientras mayor fraccionamiento haya, mayor será la inhibición.

Se eligió el método modificado en pozos porque es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad de aceite esencial facilitando la evaluación del potencial antimicrobiano como lo afirma Ruiz y Huamaní (2005) que refieren tener buenos resultados con este método.

En cuanto al control positivo se usó el antibiótico enrofloxacina que es una fluorquilona bacteriano teniendo en cuenta que es un antibiótico de amplio espectro desarrollado exclusivamente para ser usado en medicina veterinaria y actúa inhibiendo la síntesis proteica de Gram negativos y Gram positivos.

Para diluir el aceites esencial de *Luma chequen* (Arrayan) se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, asimismo como control negativo. Es importante resaltar que no presentó actividad tóxica para *Salmonella typhimurium*, lo cual ratifica que el responsable de la actividad antibacteriana es el aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) utilizado en tres concentraciones (100, 50, y 10%).

**Tabla N° 7: Estadístico ANOVA media de las diferentes concentraciones de *Luma chequen* (Arrayan) para *Salmonella typhimurium* a las 24 horas.**

| Descriptivos                      |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|-----------------------------------|----|---------|---------------------|----------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diámetro del halo (mm) a las 24 H |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
| Concentraciones                   | N  | Media   | Desviación estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media |                 | Mínimo | Máximo |
|                                   |    |         |                     |                | Límite inferior                              | Límite superior |        |        |
| 10 %                              | 14 | 9,9271  | ,39181              | ,10472         | 9,7009                                       | 10,1534         | 9,10   | 10,52  |
| 50 %                              | 14 | 12,1143 | ,41513              | ,11095         | 11,8746                                      | 12,3540         | 11,44  | 12,78  |
| 100%                              | 14 | 15,3221 | ,43772              | ,11699         | 15,0694                                      | 15,5749         | 14,52  | 15,94  |
| Enrofloxacino                     | 14 | 36,1593 | 1,14194             | ,30520         | 35,4999                                      | 36,8186         | 34,16  | 37,94  |
| Total                             | 56 | 18,3807 | 10,55718            | 1,41076        | 15,5535                                      | 21,2079         | 9,10   | 37,94  |

**Fuente:** Elaboración propia

En la Tabla N° 7 presenta los resultados obtenidos al analizar las concentraciones del aceite de *Luma chequen* (arrayan) el efecto sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella typhimurium* haciendo énfasis en la concentración presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 15,32 mm con límites entre  $14,52 \leq \mu \leq 15,94$  mm y el control positivo enrofloxacina (36,15mm) con límites entre  $34,16 \leq \mu \leq 37,94$  mm. Para todas las concentraciones evaluados el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición las concentraciones del aceite de *Luma chequen* (arrayan).

Los diámetros obtenidos de los halos de inhibición del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan), en comparación con los diámetros de los halos de inhibición del antibiótico enrofloxacina son diferentes. Esto se debe a que el antibiótico utilizado es altamente concentrado y purificado lo cual contiene parámetros ya estandarizados, mientras que el aceite

esencial de *Luma chequen* (arrayan), probados en éste estudio son una mezcla de diferentes componentes químicos que pueden interactuar en sinergismo o individualmente. Teniendo en cuenta lo expuesto, es posible que la actividad sobre los microorganismos no se deba a la acción de un único principio activo sino al efecto sinérgico de varios de ellos que en la planta se encuentren en proporción minoritaria.

El hecho que *Luma chequen* (arrayán) presente actividad antibacteriana frente a cepas de *Salmonella typhimurium*, microorganismo patógeno Gram negativo permite plantear la interrogante de ser fuente de metabólicos secundarios con potencial antibacteriano de amplio espectro con acción dirigida y específica.

Teniendo en cuenta la aceptación que existe por la medicina natural por parte de la población Cusqueña y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio nos permite valorar la propiedad antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) frente al principal patógeno *Salmonella typhimurium* aislado del hígado de cuy.

**Tabla N° 8: Estadístico ANOVA análisis de varianza para para *Salmonella typhimurium* a las 24 horas**

| ANOVA                             |                   |    |                  |          |      |
|-----------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| Diámetro del halo (mm) a las 24 H |                   |    |                  |          |      |
|                                   | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F        | Sig. |
| Entre grupos                      | 6106,288          | 3  | 2035,429         | 4469,814 | ,000 |
| Dentro de grupos                  | 23,679            | 52 | ,455             |          |      |
| Total                             | 6129,968          | 55 |                  |          |      |

**Fuente:** Elaboración propia

La Tabla N° 8 nos muestran que los grupos definidos por la bacteria, en este caso cepas de *Salmonella typhimurium* y tipo de concentración de aceite, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor  $p < 0,05$ , (sig = ,000) lo cual indica que las interacciones de las diferentes concentraciones del aceite poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Considerando la diferencia significativa que mostraron los factores evaluados: *Salmonella typhimurium* el aceite de *Luma chequen* (arrayán) y enrofloxacin como control positivo; se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla N° 9: Subconjuntos homogéneos HSD de tukey generales (concentraciones del aceite de *luma chequen*) para 24 horas.**

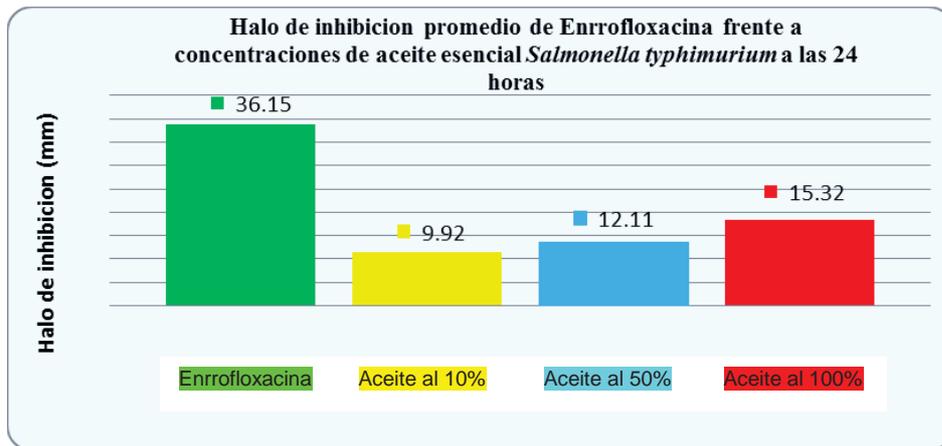
| Diametro del halo (mm) a las 24 H  |                 |    |                              |         |         |         |
|--|-----------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
|  | Concentracion % | N  | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |         |
|  |                 |    | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| HSD Tukey <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 9,9271                       |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 12,1143 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 15,3221 |         |
|  | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 36,1593 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Scheffe <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 9,9271                       |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 12,1143 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 15,3221 |         |
|  | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 36,1593 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. |                 |    |                              |         |         |         |
| a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 14,000.        |                 |    |                              |         |         |         |

**Fuente:** Elaboración propia

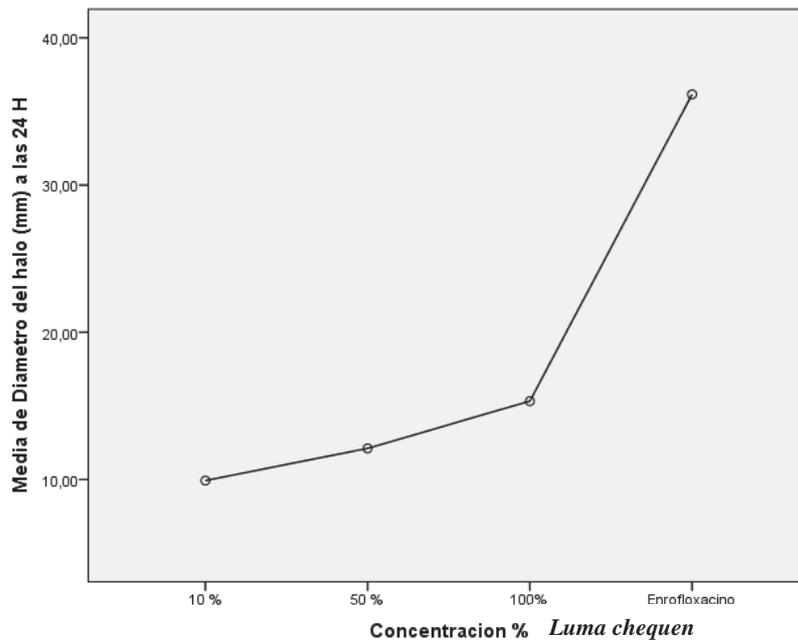
La comparación de medias de las concentraciones de *Luma chequen* (arrayán) la Tabla 09, muestra la columna de color comparaciones con una prueba post de Tukey y Scheffe, un valor de sig = 0,000 este valor es menor al valor de sig 0,05, entonces se acepta:

H1: Las medias muestrales de las comparaciones de una concentración con otra concentración DIFIEREN (se acepta si sig < 0,05) con estos datos se corrobora la prueba de post hoc de Tukey y Scheffe, que cada concentración influye de manera diferente en el diámetro del halo, por esta razón existe cuatro subgrupos diferentes o independientes con una confianza del 95%.

**Grafica N° 2: Media del diámetro del halo de inhibición, según las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) y control positivo frente a *salmonella typhimurium* a las 24 horas**



**Grafica N° 3: Ojiva de halos de inhibición de las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) y control positivo frente a *salmonella typhimurium* las 24 horas.**



**Tabla N° 10: Resultados de la medición de halos de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* a las 48 horas.**

| <i>Salmonella typhimurium</i><br>evaluación a las 48 horas |             | Concentración del Aceite Esencial<br><i>Luma chequen</i> (Arrayan) |       |       | Enrofloxacina | Dimetil       |
|--|-------------|--|-------|-------|---------------|---------------|
|  |             |  |       |       | 0.10%         | sulfoxid<br>o |
|  |             | 10%  | 50%   | 100%  | C (+)         | C (-)         |
| HALO DE<br>INHIBICIO<br>N EN (mm)                          | Placa N° 1  | 11.18  | 14.56 | 17.66 | 37.98         | 6             |
|  | Placa N° 2  | 11.7   | 13.69 | 18.78 | 37.84         | 6             |
|  | Placa N° 3  | 11.9   | 13.4  | 18.4  | 42.88         | 6             |
|  | Placa N° 4  | 11.27  | 13.48 | 17.3  | 36.09         | 6             |
|  | Placa N° 5  | 11.73  | 13.9  | 19.7  | 43.7          | 6             |
|  | Placa N° 6  | 11.11  | 13.19 | 18.4  | 42.06         | 6             |
|  | Placa N° 7  | 11.81  | 13.56 | 17.16 | 43.62         | 6             |
|  | Placa N° 8  | 11.1   | 13.2  | 18.6  | 38.52         | 6             |
|  | Placa N° 9  | 11.7   | 13.45 | 17.2  | 35.64         | 6             |
|  | Placa N° 10 | 11.53  | 13.72 | 18.96 | 36.42         | 6             |
|  | Placa N° 11 | 11.54  | 13.94 | 16.32 | 42.64         | 6             |
|  | Placa N° 12 | 11.64  | 13.4  | 18.32 | 42            | 6             |
|  | Placa N° 13 | 11.93  | 13.8  | 19.14 | 37.02         | 6             |
|  | Placa N° 14 | 11.10  | 13.66 | 19.9  | 37.52         | 6             |

**Fuente:** Elaboración propia

La tabla N°10 muestra los diámetros de halos de la actividad antibacteriana del aceite de *Luma chequen* (Arrayan) con las tres concentraciones (10%, 50%, 100%) frente a cepas de *Salmonella typhimurium*, donde se presenta sensibilidad a las 48 horas se realizó la prueba de ANOVA para determinar si las medias muestrales son similares o difieren entre ellos.

La evaluación de la actividad antibacteriana para discernir si el aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) evaluado presenta o no actividad y si esta es válida, se tomó como referencia el halo de inhibición del control positivo (Enrofloxacina) empleado, descrito por el CLSI (2013). En el caso del control positivo, todas las cepas fueron sensibles al antibiótico (Enrofloxacina) (Tabla 06 y 09). En lo que respecta al control negativo, los halos de inhibición fueron de 0 mm para todas las cepas de *Salmonella typhimurium*.

**Tabla N° 11: Estadístico ANOVA media de las diferentes concentraciones de *Luma chequen* (Arrayan) para *Salmonella typhimurium* a las 48 horas**

| Descriptivos                |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|-----------------------------|----|---------|---------------------|----------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diametro del halo a las 48H |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
| Concentraciones             | N  | Media   | Desviación estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media |                 | Mínimo | Máximo |
|                             |    |         |                     |                | Límite inferior                              | Límite superior |        |        |
| 10 %                        | 14 | 11,5171 | ,30625              | ,08185         | 11,3403                                      | 11,6940         | 11,10  | 11,93  |
| 50 %                        | 14 | 13,6393 | ,35282              | ,09430         | 13,4356                                      | 13,8430         | 13,19  | 14,56  |
| 100%                        | 14 | 18,2743 | 1,03152             | ,27568         | 17,6787                                      | 18,8699         | 16,32  | 19,90  |
| Enrofloxacino               | 14 | 39,5664 | 3,04772             | ,81454         | 37,8067                                      | 41,3261         | 35,64  | 43,70  |
| Total                       | 56 | 20,7493 | 11,34689            | 1,51629        | 17,7106                                      | 23,7880         | 11,10  | 43,70  |

En la Tabla N°11 presenta los resultados obtenidos al analizar las concentraciones del aceite de *Luma chequen* (arrayan) el efecto sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella typhimurium* haciendo énfasis en la concentración presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 15,32 mm con límites entre  $14,52 \leq \mu \leq 15,94$  mm y el control positivo enrofloxacina (36,15mm) con límites entre  $34,16 \leq \mu \leq 37,94$  mm. Para todas las concentraciones evaluados el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición las concentraciones del aceite de *Luma chequen* (arrayan).

**Tabla N° 12: Estadístico ANOVA análisis de varianza para para *Salmonella typhimurium* a las 48 horas**

| ANOVA                       |                   |    |                  |         |      |
|-----------------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Diametro del halo a las 48H |                   |    |                  |         |      |
|                             | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F       | Sig. |
| Entre grupos                | 6943,931          | 3  | 2314,644         | 875,857 | ,000 |
| Dentro de grupos            | 137,421           | 52 | 2,643            |         |      |
| Total                       | 7081,352          | 55 |                  |         |      |

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla N° 12 nos muestran que los grupos definidos por la bacteria, en este caso cepas de *Salmonella typhimurium* y tipo de concentración de aceite, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor  $p < 0,05$ , (sig = ,000) lo cual indica que las interacciones de las diferentes concentraciones del aceite poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Considerando la diferencia significativa que mostraron los factores evaluados: *Salmonella typhimurium* el aceite de *Luma chequen* (arrayán) y enrofloxacina como control positivo; se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla N° 13: subconjuntos homogéneos HSD de tukey generales (concentraciones del aceite de *luma chequen*) para 48 horas.**

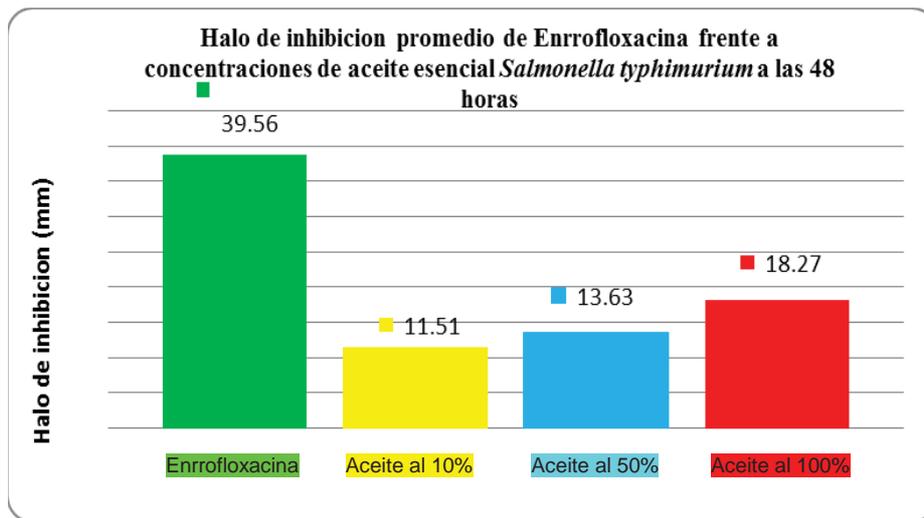
| Diámetro del halo a las 48H  |                 |    |                              |         |         |         |
|--|-----------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
|  | Concentración % | N  | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |         |
|  |                 |    | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| HSD Tukey <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|  | Enrofloxacina   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Duncan <sup>a</sup>  | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|  | Enrofloxacina   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Scheffe <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|  | Enrofloxacina   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. |                 |    |                              |         |         |         |
| a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 14,000.        |                 |    |                              |         |         |         |

**Fuente:** Elaboración propia

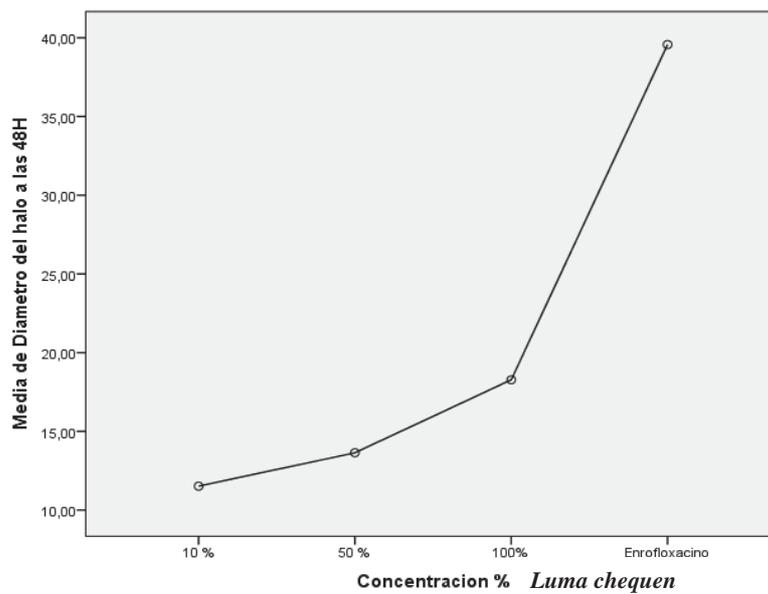
La comparación de medias de las concentraciones de *Luma chequen* (arrayán) la Tabla 13, muestra la columna de color amarillo comparaciones con una prueba post de Tukey y Scheffe, un valor de sig = 0,000 este valor es menor al valor de sig 0,05, entonces se acepta:

H1: Las medias muestrales de las comparaciones de una concentración con otra concentración DIFIEREN (se acepta si sig < 0,05) con estos datos se corrobora la prueba de post hoc de Tukey y Scheffe, que cada concentración influye de manera diferente en el diámetro del halo, por esta razón existe cuatro subgrupos diferentes o independientes con una confianza del 95%.

**Grafica N° 4: Media del diámetro del halo de inhibición, según las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) y control positivo frente a *Salmonella typhimurium* a las 48 horas.**



**Grafica N° 5: Ojiva de halos de inhibición de las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) y control positivo frente a *salmonella typhimurium* a las 48 horas.**



**Tabla N° 14: Prueba de T de Student comparando (las 24 y 48 horas) de las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) y control positivo en cepas de *Salmonella typhimurium*.**

| Diámetro de Halo (mm) a las 24 horas y<br>Diámetro de Halo (mm) a las 48 horas |               | Diferencias emparejadas |                        |                               |   |          | gl | Sig.<br>(bilateral) |
|--|---------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|---|----------|----|---------------------|
|  |               | Media                   | Desviación<br>estándar | Media de<br>error<br>estándar | 95% de intervalo de<br>confianza de la diferencia |          |    |                     |
|  |               |                         |                        |                               | Inferior  | Superior |    |                     |
| Par 1  | 10%           | -1,59000                | ,50175                 | ,13410                        | -1,87970  | -1,30030 | 13 | ,000                |
| Par 2  | 50%           | -1,52500                | ,56961                 | ,15224                        | -1,85388  | -1,19612 | 13 | ,000                |
| Par 3  | 100%          | -2,95214                | 1,08837                | ,29088                        | -3,58055  | -2,32373 | 13 | ,000                |
| Par 4  | Enrofloxacina | -3,40714                | 3,14719                | ,84112                        | -5,22428  | -1,59001 | 13 | ,001                |

**Fuente:** Elaboración propia

Para todos los casos se observa, que el valor de sig, (columna celeste) es menor a 0,05, entonces se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y aceptamos la hipótesis alterna,  $H_1$ : El factor tiempo de 24 y 48 horas INFLUYEN en el incremento del diámetro del halo (se acepta esta hipótesis si el valor de sig es menor a 0,05,  $sig < 0.05$ ). De la Tabla N° 14 observamos que existe una diferencia significativa en las medias del diámetro del halo evaluadas a las 24 y 48 horas, en conclusión el tiempo (24 y 48 horas) si tiene efecto en el incremento del diámetro del halo, o dicho de otra manera el variable tiempo influye en el variable diámetro del halo.

**Tabla N° 15: Grado de correlación existente entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 24 horas.**

| Resumen del modelo <sup>b</sup>                                |                   |            |                     |                                 |
|--|-------------------|------------|---------------------|---------------------------------|
| Modelo   | R                 | R cuadrado | R cuadrado ajustado | Error estándar de la estimación |
| 1  | ,999 <sup>a</sup> | ,998       | ,996                | ,17158                          |
| a. Predictores: (Constante), Concentración (%) de Luma chequen |                   |            |                     |                                 |
| b. Variable dependiente: Diámetro del halo (mm) a las 24 horas |                   |            |                     |                                 |

**Fuente:** Elaboración propia

### Análisis de resultado

Como  $r = 0,999$  Entonces existe una correlación positiva muy alta casi perfecta

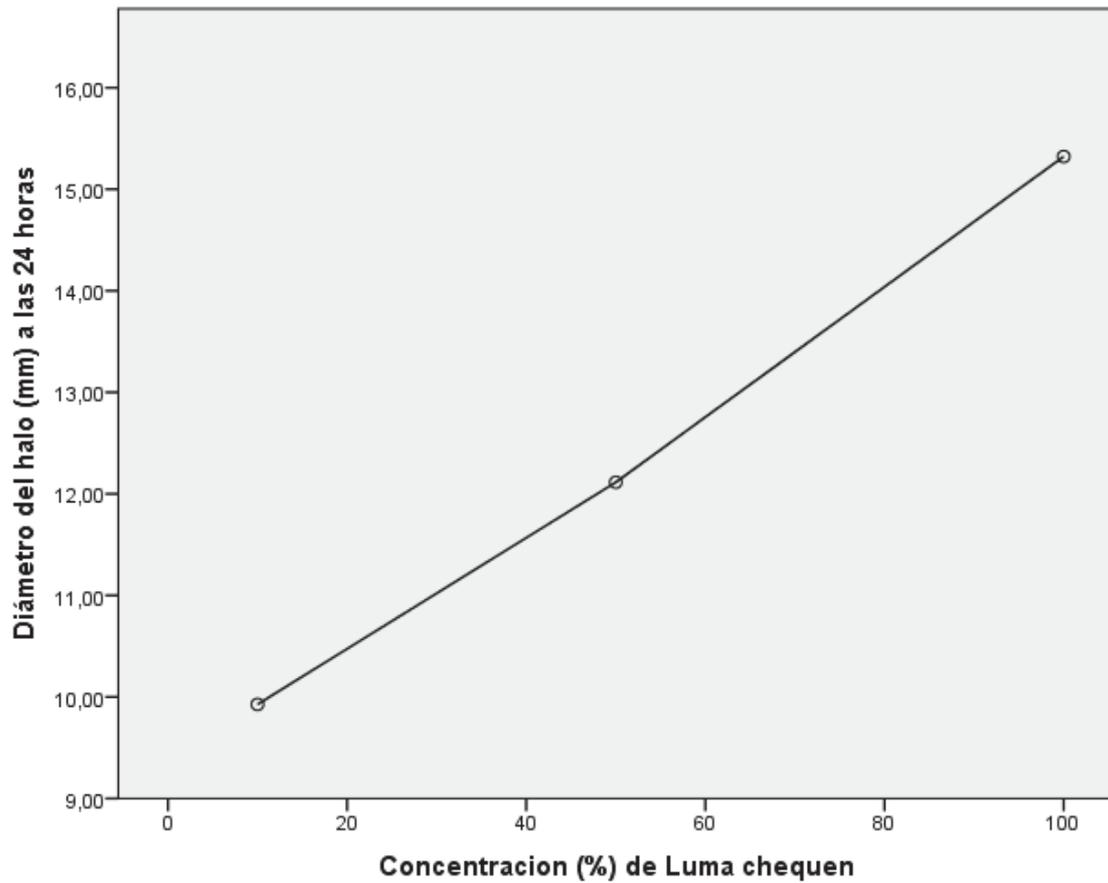
- **Coefficiente de terminación (CD):** Indica en cuanto por ciento afecta la concentración en el diámetro del halo

$$CD = r^2 \times 100 = \% \text{ de determinación}$$

$$CD = (0,999)^2 \times 100 = 99,8 \%$$

La tabla N° 15 indica que el coeficiente de determinación de la concentración fue un factor determinante para el incremento del halo en un, 99,8% y el 0,2 % que se debió a factores externas. La variable independiente *luma chequen* (Arrayan) influye directamente en el incremento del diámetro del halo para las 24 horas.

**Grafica N° 6:** Ojiva del Grado de correlación de halos de inhibición frente a las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) a las 24 horas.



**Fuente:** Elaboración propia

De la gráfica N° 6, Como el valor de  $r$  es mayor a 0 y la distribución que se observa en este diagrama, nos indica que existe una correlación positiva perfecta, además observamos un incremento del diámetro del halo a medida que la concentración de *Luma chequen* (Arrayan) aumenta.

**Tabla N° 16: valor predictorio mediante la pendiente de la intersección de la recta entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 24 horas.**

| Coeficientes <sup>a</sup>                                      |                                   |                                |                |                             |        |      |
|--|-----------------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------|--------|------|
| Modelo   |                                   | Coeficientes no estandarizados |                | Coeficientes estandarizados | t      | Sig. |
|  |                                   | B                              | Error estándar | Beta                        |        |      |
| 1  | (Constante)                       | 9,248                          | ,174           |                             | 53,037 | ,012 |
|  | Concentración (%) de Luma chequen | ,060                           | ,003           | ,999                        | 22,343 | ,028 |
| a. Variable dependiente: Diámetro del halo (mm) a las 24 horas |                                   |                                |                |                             |        |      |

**Fuente:** Elaboración propia

### **Análisis de resultado**

Hallando la pendiente y el punto de intersección de la recta, de acuerdo a los resultados del cuadro.

$$\text{Ecuación de la recta: } \bar{Y} = B_0 + B_1 \cdot X = \bar{Y} = 9,248 + (0,06 X)$$

$$\text{Dónde: } B_0 = 9,248$$

$$\mathbf{B_1 = 0,06}$$

De la tabla N ° 16, el valor predictorio B<sub>1</sub> nos indica que por cada 1% de aumento de la concentración, el halo también aumenta en 0,06 mm.

**Tabla N° 17: Grado de correlación existente entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 48 horas.**

| Resumen del modelo <sup>b</sup>                                |                   |            |                     |                                 |
|--|-------------------|------------|---------------------|---------------------------------|
| Modelo   | R                 | R cuadrado | R cuadrado ajustado | Error estándar de la estimación |
| 1  | ,989 <sup>a</sup> | ,978       | ,957                | ,71786                          |
| a. Predictores: (Constante), Concentracion (%) de Luma chequen |                   |            |                     |                                 |
| b. Variable dependiente: Diámetro del halo (mm) a las 48 horas |                   |            |                     |                                 |

**Fuente:** Elaboración propia

### Análisis de resultado

Como  $r = 0,989$  Entonces existe una correlación positiva muy alta casi perfecta

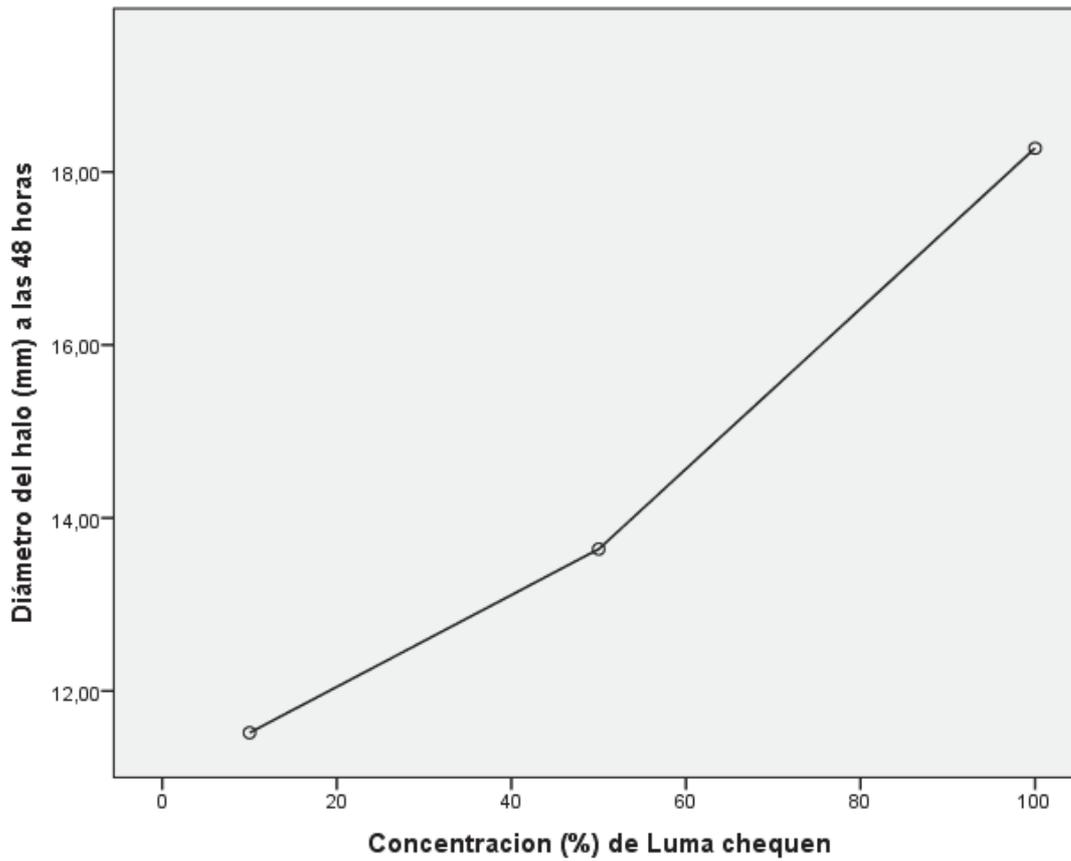
- **Coefficiente de terminación (CD):** Indica en cuanto por ciento afecta la concentración en el diámetro del halo

$$CD = r^2 \times 100 = \% \text{ de determinación}$$

$$CD = 0,978 \times 100 = 99.8 \%$$

La tabla N° 17, nos indica que el coeficiente de determinación de la concentración fue un factor determinante para el incremento del halo en un, 97,8% y el 2,2 % que se debió a factores externas. La variable independiente *Luma chequen* (Arrayan) influye directamente en el incremento del diámetro del halo para las 48 horas.

**Grafica N° 7: Ojiva del Grado de correlación de halos de inhibición frente a las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (arrayan) a las 48 horas.**



**Fuente:** Elaboración propia

De la gráfica N° 07, como el valor de  $r$  es mayor a 0 y la distribución que se observa en este diagrama, nos indica que existe una correlación positiva muy alta, observamos un incremento del diámetro del halo a medida que la concentración de *Luma chequen* (Arrayan) aumenta.

**Tabla N° 18: valor predictorio mediante la pendiente de la intersección de la recta entre la concentración y el diámetro de halo de inhibición para *salmonella typhimurium* a las 48 horas.**

| Modelo  | Coeficientes no estandarizados    |                | Coeficientes estandarizados | t      | Sig.  |
|---|-----------------------------------|----------------|-----------------------------|--------|-------|
|   | B                                 | Error estándar | Beta                        |        |       |
| 1   | (Constante)                       | 10,434         | ,730                        | 14,302 | ,044  |
|   | Concentración (%) de Luma chequen | ,076           | ,011                        | ,989   | 6,734 |
| <b>a. Variable dependiente: Diámetro del halo (mm) a las 48 horas</b> |                                   |                |                             |        |       |

**Fuente:** Elaboración propia

Hallando la pendiente y el punto de intersección de la recta, de acuerdo a los resultados del cuadro.

$$\text{Ecuación de la recta: } \bar{Y} = B_0 + B_1 \cdot X = \bar{Y} = 10.434 + (0,76 X)$$

$$\text{Dónde: } B_0 = 9,248$$

$$\mathbf{B_1 = 0,76}$$

De la tabla N ° 18, el valor predictorio B nos indica que por cada 1% de aumento de la concentración, el halo también aumenta en 0,76 mm para las 48 horas.

## CONCLUSIONES

1. Se extrajo el aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) por Arrastre a Vapor en relación a 4.5 kg de materia prima fresca (hojas) y se obtuvo 7.5 ml, utilizadas en el presente trabajo de investigación.
2. Se realizó el análisis microbiológico del aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) encontrándose libre de contaminantes y el análisis cromatografico por cromatografía de gases del aceite *Luma chequen* (Arrayan) posee los siguientes componentes mayoritarios: alpha-Pinene, delta-3-carene, gamma-Terpinene con 37.90%; eucaliptol con 14.07%; linalol con 9.71% y beta pinene con 8.95%.
3. Se aisló el género *Salmonella spp*, en un 33.33% en tres cuencas (Anilmallo, Huchumallo, Vilcanota) del Distrito de Quiquijana Provincia de Quispicanchis.
4. Se Identificó la especie de *salmonella typhimurium* en un 33.33% (10/30) por el Instituto nacional de salud como agente patógenos en los hígados de cuy en las zonas muestreadas del distrito de Quiquijana.
5. El aceite esencial de *Luma chequen* (Arrayan) mostro actividad antibacteriana frente a cepas de *Salmonella typhimurium* a tres concentraciones (10%, 50% y 100%) siendo la concentración del 100% la que presentó mayor diámetro del halo de inhibición, con una media de 15.32 y 18.27 mm (a las 24 y 48 horas) respectivamente a comparación de la concentración al 50% que obtuvo una media de 12.11 y 13.63 mm (a las 24 y 48 horas) y la concentración de 10% que presentó una media de 9.92 y 11.51 mm (a las 24 y 48 horas). A una temperatura optima de incubación de 37°C. Se considera que a mayor concentración del aceite es mayor la reducción de las bacterias.

## RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación de *luma chequen* y otras especies vegetales que contengan aceite esencial y realizar estudios in vitro frente a otras bacterias de importancia médica.
- Realizar estudios encaminados en aislar, identificar, separar las moléculas presentes en el aceite de *Luma chequen* responsable de la actividad antimicrobiana y determinar su mecanismo de acción, con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antibacterianos de amplio espectro a partir de una fuente de origen natural.
- Probar de forma in vitro (experimental) el aceite de *luma chequen* en muestras de alimentos de los cuyes para evaluar el efecto que tiene como medios de prevención para la salmonelosis en esta población.
- La alimentación es uno de los factores que por no ser bien llevadas desde su inicio hasta el consumidor, suele ser una de las causas principales de ciertas enfermedades (enfermedades diarreicas agudas) que ponen en riesgo la salud; se recomienda una adecuada manipulación de las carnes de cuy en vista que son materia prima cruda que contiene salmonella.
- Continuar con la investigación de *Salmonella typhimurium* frente a otros tipos de agentes antibacterianos para un control de esta bacteria en los cuyes.
- Informar y asesorar a los productores de cuyes sobre los diversos factores que afectan a la calidad de la producción de sus cuyes a través de campañas educativas y concientización.

## BIBLIOGRAFIA

- Ameghino EF. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*): 3er boletín extraordinario. Lima: IVITA. 260 p.
- Bergey DH, Holt JG. 2001. Bergey's manual of sytematic bacteriology. 2da. Ed. EE.UU.:Springer.
- Bodero Poveda María Verónica 2010. Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana (*in vitro*) de los extractos fluidos de arrayán y pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. Asesores. Dra. Susana Abdo y Dra. Janneth Gallegos Tesis de Grado Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Escuela de Bioquímica y Farmacia .Riobamba - Ecuador.
- Cabrera, A., 1953. Los roedores argentinos de la familia Cavidae., Universidad de Buenos Aires., Vol. 6., Buenos Aires-Argentina., Pp. 48-56.
- Caffer M, Terragno R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas. 37p
- Carhuapoma Y. M., 2002. Plantas Medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas. UNSCH. Ayacucho;
- Carhuapoma Y. Mario, Bonilla R. Pablo, Suarez C. Silvia, Villa Roser Y Lopez G. Sofía., 2005. Estudio De La Composición Química Y Actividad Antioxidante Del Aceite Esencial De *Luma chequen* (Malina) A. Gray "Arrayán". Revista Ciencia e Investigación 8(2) Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2005ISSN 1561-0861.

- Carhuapoma Y. Mario, López G, Sofía, Roque A. Mirtha, Velapatiño Billie. Bell C. Whu W. Delia., 2009. Actividad Antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis Griseb* "Yuraqmuña.
- Christianson WT., 1992. Stillbirths, mummies, abortions and early embryonic death. Vet Clin North Am Food Anim Pract 8: 623-639.
- Cazar, M. y Cazar., 2011. Curso de técnicas en laboratorios biotecnológicos. Especialización en Biotecnología Vegetal, Cuenca Ecuador, pg 12.
- Correa R., 2000. Sanidad en Cuyes. V Curso Latinoamericano de Cuyicultura. Puerto Ayacucho – Venezuela.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2014. A report from the American Heart Association.
- Clinical and Laboratory Standards, 2012. Institute Administrative Procedures (CLSI) This document is effective as of October.
- Cronquist A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Edit. Columbia University Press. New York.
- Chauca, L., Producción de cuyes., INIPA., 1997. No. 1 Lima-Perú., Pp. 34-53
- DIGESA., 1999. Dirección General de Salud Criterios de Calidad Ssanitaria e Inocuidad de Alimentos.
- Doughari JH, 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. Trop. Pharmaceutical Research. 5(2): 597.
- Estupinan, Enrique., 2003. Crianza y Manejo De Cuyes: Experiencia en el Centro Experimental y de Producción Salache Latacunga: UTC, PRIMERA EDICION.

- Evans A., 2005. Import risk Analysis: Domestic Guinea Pig, *Cavia porcellus*, imported from Australia. Draft Reports. Citado el 02/09/14. Disponible en: [http://piggyville.com/guinea\\_pigs/NZriskanalysis.pdf](http://piggyville.com/guinea_pigs/NZriskanalysis.pdf)
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS., 2007. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edition. Elsevier Mosby. St. Louis USA.
- Figueroa I. y Verdugo A., 2005. Mecanismos Moleculares de Patogenicidad de *Salmonella sp.* Revista Latinoamericana de Microbiología. 47: 25-42.
- Flores R., 2014. Perú. Determino la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan” frente *Streptococcus mutans*. Tesis de grado Lima- Perú
- García. C., 2002. Caracterización de las Fracciones Extractables Contenidas en el Fruto del Palo de Cera, Palo de Arrayan o Palo de Cera San Pascual (*Myrica cerifera* L) (Proyecto de tesis) (Ing. Bioq.). San Carlos-Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, 59p.
- Garcés R., 2015. Trabajo la incidencia de enterobacterias en cuyes del cáserio acapulco en el cantón mocha” Cevallos- Ecuador.
- Gonzales B., Mansilla T., Rengifo U. y Arévalo O., 2014. Perú. Extracción de aceite esencial de *Myrtus communis* y estudio de su actividad antimicrobiana Lima – Perú.
- Ganaway JR., 1976. Bacterial, Mycoplasma, and Rickettsial diseases. En: Wagner JE, Manning PJ (eds). The biology of guinea pig. USA: Academic Press. p 121-135.
- Goncalves MJ, Calvaleiro C, Salgueiro LR, Proenca AC., 2001. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Luma chequen*. University of Coimbra.

Portugal; Vol. 18, nº 1,p 108-110. Disponible en: [http://the-medical-dictionary.com/dimethyl\\_sulfoxide\\_article\\_5.htm](http://the-medical-dictionary.com/dimethyl_sulfoxide_article_5.htm)

- Grimont P, Weill F., 2007. Antigenic Formulae of the Salmonella serovars, 9th Ed., World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France. 166p
- Guamán M., 2014. Determinación del género y especie de *Salmonella* en cuyes mestizos en diferentes sistemas de crianzas en la comunidad de oñacapac del Canton Saraguro, Cuenca-Ecuador.
- Hernández JT, García E, Giono S, Aparicio G., 2003. Bacteriología Médica Diagnóstica. Ediciones Cuéllar. México D.F
- Huckinghaus, F,1961. Zur Nomenclatur und Abstammung des Hausmeerschweinchens., Universidad Christian-Albrechts., Vol. 2. Munich-Alemania Pp. 65- 128.
- INEI., 2012. Instituto Nacional de estadística e informática IV Censo nacional agropecuario 2012-sistema de consulta de cuadros estadísticos. Perú: INEI. Internet, Agosto 2014. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados>.
- Justo S., 2014. Aspectos generales de la crianza de cuy y su agente infeccioso: boletín científico. 2014. 1(2): 35-36.
- Kawasaki Lucia y Holst Bruce K., 2006. Myrtaceae endémicas del Perú. Rev. Perú biol .online., vol.13, n.2 [citado 29-03-2014], pp. 463-468. Disponible en: <[http://Kawasaki, Lucia Y Holst, Bruce K. Myrtaceae endémicas del Perú. Rev. Perú biol. \[online\]. 2006, vol.13](http://Kawasaki,Lucia%20Y%20Holst,Bruce%20K.%20Myrtaceae%20end%C3%A9micas%20del%20Per%C3%BA.%20Rev.%20Per%C3%BA%20biol.%20[online].%202006,%20vol.13)
- Lopez R, 2007. Caracterización Físico–Química de *Passiflora incarnata* L. Para su Uso en la Industria Farmacéutica. Revista Cubana De Química (Cuba), vol.19 (1). pp.78-80.

- Layme A., 2010. Frecuencia de Lesiones Anatomopatológicas en Cobayos con Diagnóstico Bacteriológico de *Salmonella sp.* Remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el período 2001-2007. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Layme A., 2011. Frecuencia de Lesiones Anatomopatológicas en Cobayos con Diagnóstico Bacteriológico de *Salmonella spp* Remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el período 2001-2007. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Leguía P., 1993. Enfermedades infecciosas y Parasitarias en Cuyes. Primer Curso Regional de Reproducción en Cuyes. La Molina – Perú.
- Lizcano Ramón Andrea Jimena y Vergara González. Jenny Lisseth., 2008. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y/o Aceites Esenciales de las Especies Vegetales *Valeriana Pilosa*, *Hesperomeles Ferruginea*, *Myrcianthes Rhopaloides* Y *Passiflora Manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Asesores: María Eugenia Torres y Freddy Alejandro.
- Lujan M. y Blas G., 2007. *Salmonella*. En: Microbiología Veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires – República Argentina. 594 p.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2001. Disk diffusion supplemental tables M100-S10 (M2). Wayne, Pennsylvania.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS), 2002.

- Negroni M., 2009. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2da Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Normas ISO 6579., 2006. Directiva general concerniente a los métodos de investigación de salmonella.
- OMS., 2007. Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16202s/s16202s.pdf>.
- OMS, 2004. Quality control methods for medicinal plants. Geneva, World, Health Organization.
- Maldonado Elena., 2008. Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) *McVaugh, Myrtaceae*, y evaluación de su actividad biológica. Revista La granja - Ecuador.
- Matsuura A., Morales S., Calle S. y Ara M., 2010. Susceptibilidad a Antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de Cuyes de Crianza Familiar-Comercial en la Provincia de Carhuaz - Áncash. Revista de Investigación Veterinaria del Perú. 21(1): 93-99.
- Mahajan, R. K; Khan, D; Chandel, S; Kumar, N; Hans,C Y Chudhty, R. 2003. Fatal case of *salmonella enteric subsp. arizonae* gastroenteritis in an infant with microcephaly. Journal of clinical microbiology. 41: 5830- 5832
- Mantilla J., 1997. Aprovechamiento sostenido y evaluación de cinco especies medicinales y aromáticas en el Valle Sagrado de los Incas – Cusco- Perú.

- Morales S, Mattos J, Calle S., 2007. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella enterica* en cobayos. En: Reunión ALPA. Cusco: Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
- Mantilla Holguin J., Olazábal Castillo O., 2008. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra “Pachamama Hampi Qhoranchiskuna”. Valle sagrado de los Incas – Cusco .Instituto de ecología y plantas medicinales. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/116895801/Las-Plantas-Medicinales-de-Nuestra-MadreTierra-Pachamama-Hampi-Qhoranchiskuna>.
- Moina., 2015. Determino la actividad antibacteriana In-Vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales e *Luma chequen* (Feuileé ex Molina) A. Gray y *Minthostachys spicata* (Benth). Epling “Yuraq muña” Frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Moreno, R., 1989. El cuy., 2a ed., Lima- Perú., UNA La Molina., Pp. 100-110
- Muñiz V., 1992. Etnobotánica de la flora medicinal de la provincia de Paruro. Ciencias biológicas UNSAAC. Cusco: s.n. Tesis de grado.
- Pío J, Díaz S., López M., Uribe M, Willms K, López G, Montes J, Delgado F., 2013. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) *Kunth*), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* *Kunth*). Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat Vol 12, n°4, [citado 29-03-2014] p .356 – 364. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85628141003.pdf>.
- Peters L.J., 1981. The guinea pig: An overview Part II. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 3: 403.

- Pinedo E., 1996. Aromaterapia, plantas aromáticas y Aceites esenciales. Volumen I. Fleurus, belgica. pp 2-5, 10-14y26.
- Ramírez A., 1972. Estudio Bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Reynel C. y Marcelo., 2009. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Serie Investigación y Sistematización No. 9. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. Lima.
- Richardson V. C., 2000. Diseases of Domestic Guinea Pigs. 2th ed. Oxford: Blackwell science Ltd. 145p.
- Ruiz Quiroz, J. R., Huamaní Achata, M. E., 2005. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Programa Cybertesis Perú.
- Saxena S, Gomber C., 2006. Antimicrobial potential of *Callistemon rigidus*. Journal Pharmaceutical Biology 44(3): 194-201.
- Selbitz, H.J; Sinell, H.J Y Sziegoleit, A., 1995. Das Salmonellen – Problem. Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart.
- Sotta N. 2000. Plantas aromáticas y medicinales de la región de Arequipa. Edit. Akuarella. Arequipa.
- Smit, D.T; Conant, N.F. Y Beard, J., 1952. Zinseer's textbook of bacteriology. Ed. Appietoh century cofts. 10 Edition. USA.

- Stanchi, O., 2007. Microbiology veterinaria. Primera Edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires- República Argentina. pag 210 -214.
- Suter, E., 1956. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. Bacteriology reviews. 20: 94- 132.
- Terragno R, Caffer M, Bruna S, Binsztein N., 2003. Manual de procedimientos. Salmonella: Parte I. Aislamiento, identificación y serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm- Surv y CDC, Buenos Aires, Argentina.
- Torres J., 2014. Evaluacion de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. agray “arrayan” frente a patógenos aislados de hemocultivos del hospital nacional de Guillermo Almenara Irogeyen, Lima-Peru.
- Turnbull, P.C.B., 1979. Food poisoning with special reference to *Salmonella* – its epidemiology pathogenesis and control. Clinical Gastroenterology. 8: 586-594.
- Wagner J y Manning P., 1976. The Biology of Guinea Pig. Academic Press. Londres. Edición 1.
- Winn W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Procop G.W., Schrenckenberger P.C., Woods G.L., 2008. Koneman Diagnóstico Microbiológico Edición: 6ª Médica Panamericana.

# ANEXOS

**ANEXO N° 1. Recolección de la muestra y obtención del aceite de *Luma chequen* (Arrayan)**



Planta de *Luma chequen* (Arrayan)



Recolección de la planta



Limpieza y selección de las hojas.



Vista del aceite esencial en el decantador.



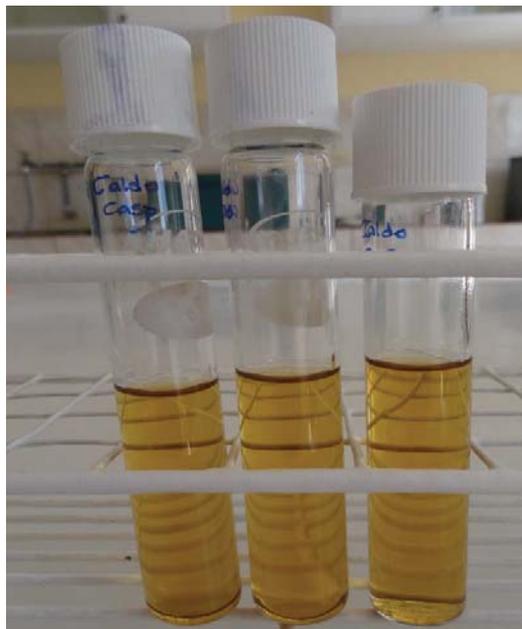
Descarte de las hojas después de extracción.

**ANEXO N° 2. Fotos del control microbiológico del aceite *Luma chequen* (Arrayan)**



Crecimiento negativo para  
Hongos y Levaduras en Agar  
OGA

Crecimiento negativo para  
Mesofilos viables en Agar  
Plate Count.



Resultado negativo para  
enterobacterias en Caldo CASOY

**ANEXO N° 3. Colecta de muestra y aislamiento de *Salmonella spp*, a partir de hígado de cuy.**



Cuy tipo I utilizado en el estudio



Obtención del hígado de cuy



Obtención de la muestra de hígado.



Caldo de pre-Enriquecimiento APT (agua peptonada tamponada)



Muestra de hígado triturado 25 g.



Muestra de hígado en el caldo APT.



Incubación de la muestra.



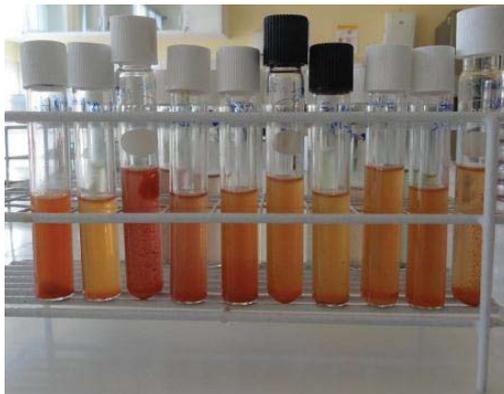
Caldo de enriquecimiento Rappaport



Caldo de enriquecimiento Selenito- cistina



Agregando muestra al Caldo de enriquecimiento Rappaport



Muestra en Caldo de Enriquecimiento Selenito – Cistina después de la incubación



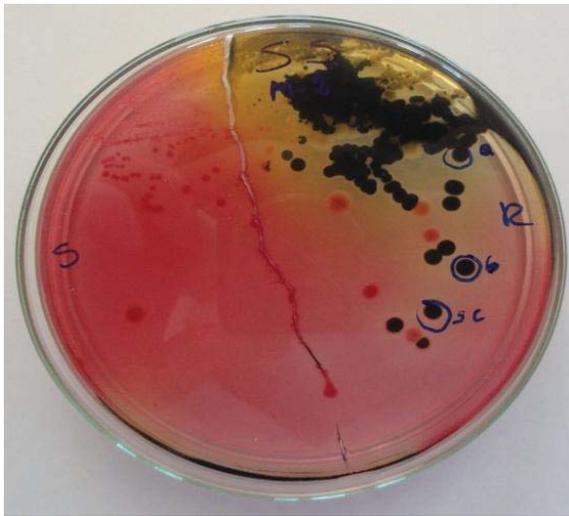
Muestra en Caldo de Enriquecimiento Rappaport después de la incubación.



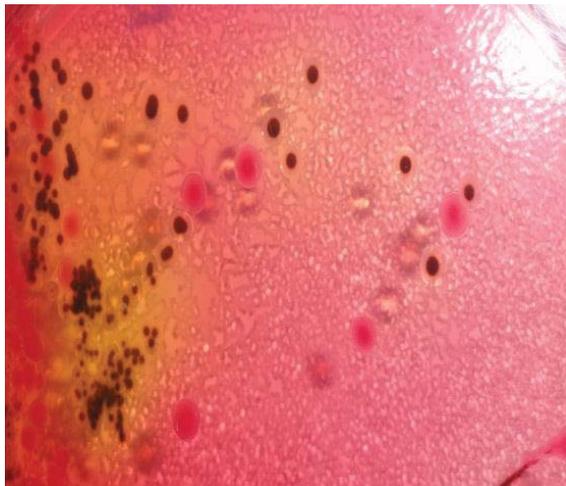
Siembra en agar SS y BPLS



Incubación de la muestra.



Placa con Agar SS  
(*salmonella - shiguella*) donde se observa colonias de *Salmonella spp*



Agar SS, con colonias características, translucidas con centro negro.

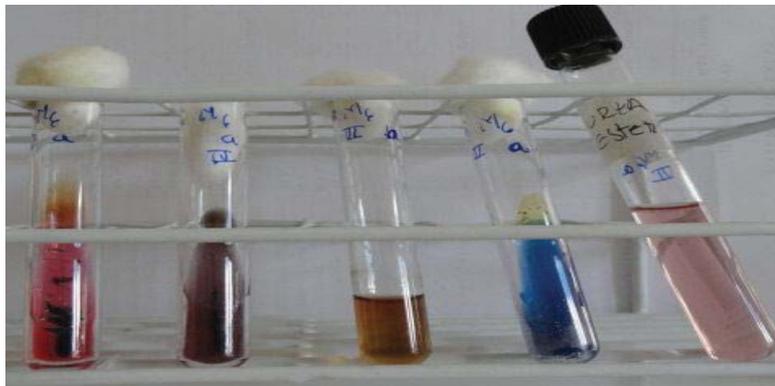
**ANEXO N° 4. Identificación de *salmonella spp*, mediante perfil bioquímico convencional**



Preparación del material para el perfil bioquímico.



Perfil bioquímico convencional  
TSI; LIA, MIO, CITRATO,  
UREA.



Perfil bioquímico positivo para *Salmonella typhimurium*  
TSI (K/A), LIA (K/K), MIO (+), C.S (-) y UREA (negativo)



TSI  
K/A



LIA  
K/K



MIO  
+



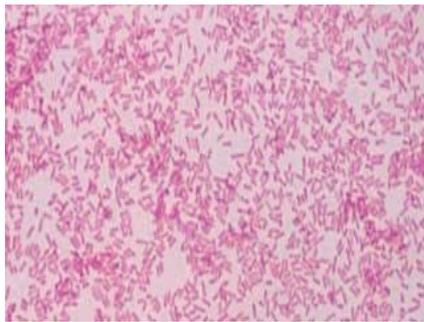
C.S.  
+



UREA  
-



A partir del Agar TSI positivo se trasvaso al Agar TSA para mantener la bacteria en Cepario. Después de la incubación por 24 horas se mantendrá refrigerado a 5°C hasta la tipificación.



Coloración Gram: Bacilos cortos Gram Negativos.  
Observación microscópica (100 X).



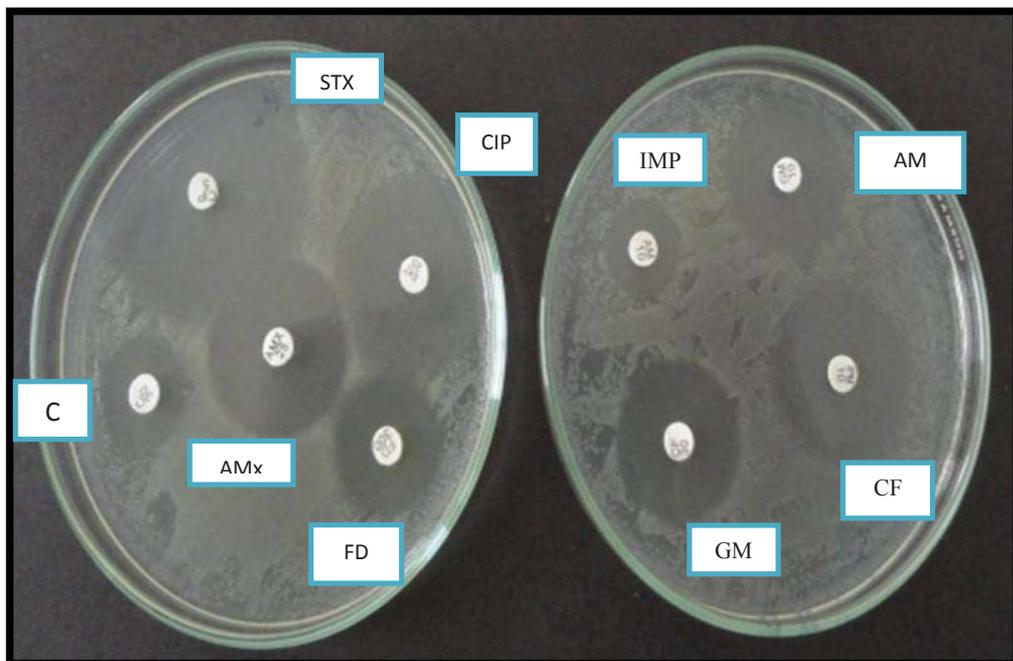
Catalasa positiva, Salmonella produce burbujas ya que posee la enzima catalasa para degradar el peróxido de hidrogeno.

**ANEXO N° 5: Resultado del perfil bioquímico de identificación convencional para *salmonella spp.***

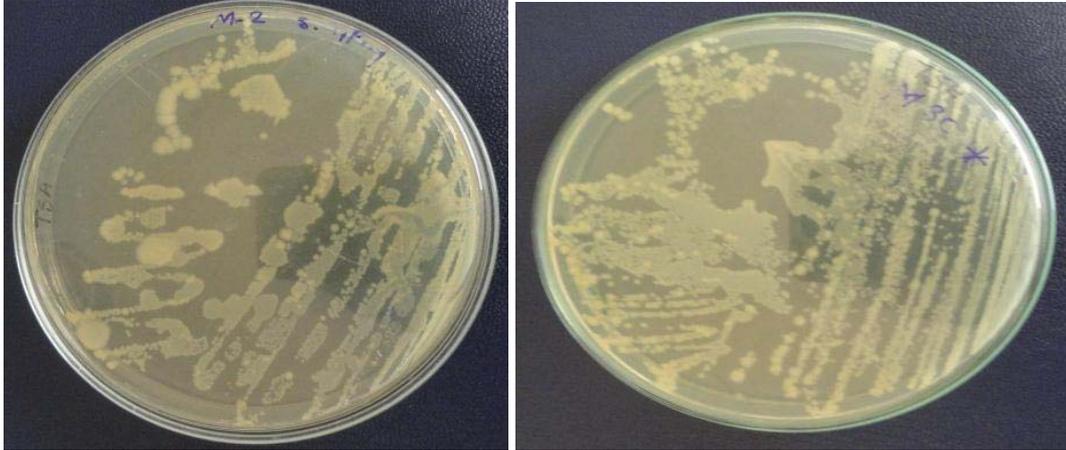
| Cuenca           | N° de muestra | Agua tamponada peptonada | Crecimiento en caldo selenito | Crecimiento en caldo rappaport | Crecimiento en agar SS | Crecimiento en agar BPLS | Colonias típicas para salmonella | Perfil bioquímico convencional |     |                  |     |     |         |      | agente presente en la muestra (ESPECIE) |
|------------------|---------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----|------------------|-----|-----|---------|------|---|
|                  |               |                          |                               |                                |                        |                          |                                  | TSA                            | LIA | H <sub>2</sub> S | GAS | MOV | CITRATO | UREA |   |
| CUENCA VILCANOTA | 1             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 2             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 3             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 4             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 5             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 6             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 7             | -                        | -                             | -                              | -                      | -                        | -                                | -                              | -   | -                | -   | -   | -       | -    | Sin crecimiento                         |
|                  | 8             | -                        | -                             | -                              | -                      | -                        | -                                | -                              | -   | -                | -   | -   | -       | -    | Sin crecimiento                         |
|                  | 9             | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 10            | -                        | -                             | -                              | -                      | -                        | -                                | -                              | -   | -                | -   | -   | -       | -    | Sin crecimiento                         |
| CUENCA ANILMAYO  | 11            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 12            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 13            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 15            | -                        | -                             | -                              | -                      | -                        | -                                | -                              | -   | -                | -   | -   | -       | -    | Sin crecimiento                         |
|                  | 16            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 17            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 18            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 19            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 20            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 21            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
| CUENCA HUCHUMAYO | 22            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 23            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 24            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 25            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 26            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 27            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Rosadas                          | A/A                            | K/K | -                | +   | +   | -       | -    | <i>Eschericha coli</i>                  |
|                  | 28            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 29            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |
|                  | 30            | +                        | +                             | +                              | +                      | +                        | Negras                           | K/A                            | K/K | +                | +   | +   | +       | -    | <i>Salmonella spp</i>                   |

**ANEXO N° 6: Resultado del antibiograma de *salmonella typhimurium* a nueve antibióticos**

| Método Kirby Bauer |                      |               | <i>Salmonella enteritidis</i> |
|--------------------|----------------------|---------------|-------------------------------|
| N°                 | Antimicrobiano       | Diámetro (mm) | Sensibilidad                  |
| 1                  | Cloranfenicol (C)    | 13.28         | Intermedia                    |
| 2                  | Ampicilina (AM)      | 18.52         | Sensible                      |
| 3                  | Ciprofloxacina (CIP) | 30.76         | Sensible                      |
| 4                  | Nitrofurantoina (FD) | 24.40         | Sensible                      |
| 5                  | Cefalotina (FC)      | 17.06         | Sensible                      |
| 6                  | Imipenen (IMP)       | 12.92         | Sensible                      |
| 7                  | Gentamicina (GM)     | 21.70         | Sensible                      |
| 8                  | Amoxicilina (AMx)    | 19.70         | Sensible                      |
| 9                  | Trimetropin (SXT)    | 37.28         | Sensible                      |



**ANEXO N° 7. Determinación de la actividad antibacteriana de *Luma chequen* (Arrayan)**



Colonias de *Salmonella typhimurium* en Agar TSA. (Tripticasa Soya Agar) A las 48 horas de incubación.



Preparación de placas con Agar Muller Hinton.



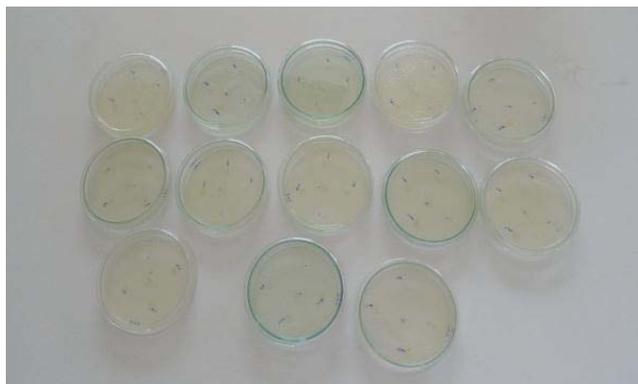
Homogenización del inoculo en el Vortex y comparación con la escala Mac Farland.



Sembrado del inóculo en el Agar Muller Hinton.



Concentración del aceite a (10,50 y 100 %).



Inoculación del aceite en los pozos



Halos de inhibición de *Salmonella typhimurium* a las 24 horas de evaluación



Halos de inhibición de *Salmonella typhimurium* a las 48 horas de evaluación

## ANEXO N° 8: Zonas de recolección de las muestras de hígados de cuye



Vista panorámica de la cuenca Vilcanota del distrito de Quiquijana



Venta de los cuyes de los pobladores de la cuenca Vilcanota.



Venta de los cuyes de los pobladores de la cuenca Anilmayo

**ANEXO N° 9: Tratamiento estadístico ANOVA para *salmonella typhimurium* a las 24 horas.**

**Estadísticos descriptivos**

| Descriptivos                      |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|-----------------------------------|----|---------|---------------------|----------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diametro del halo (mm) a las 24 H |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|                                   | N  | Media   | Desviación estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media |                 | Mínimo | Máximo |
|                                   |    |         |                     |                | Límite inferior                              | Límite superior |        |        |
| 10 %                              | 14 | 9,9271  | ,39181              | ,10472         | 9,7009                                       | 10,1534         | 9,10   | 10,52  |
| 50 %                              | 14 | 12,1143 | ,41513              | ,11095         | 11,8746                                      | 12,3540         | 11,44  | 12,78  |
| 100%                              | 14 | 15,3221 | ,43772              | ,11699         | 15,0694                                      | 15,5749         | 14,52  | 15,94  |
| Enrofloxacino                     | 14 | 36,1593 | 1,14194             | ,30520         | 35,4999                                      | 36,8186         | 34,16  | 37,94  |
| Total                             | 56 | 18,3807 | 10,55718            | 1,41076        | 15,5535                                      | 21,2079         | 9,10   | 37,94  |

**Fuente:** Elaboración propia.

**Prueba post hoc *salmonella typhimurium* evaluadas a las 24 horas**

| Diametro del halo (mm) a las 24 H  |                 |    |                              |         |         |         |
|--|-----------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
|  | Concentracion % | N  | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |         |
|  |                 |    | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| HSD Tukey <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 9,9271                       |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 12,1143 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 15,3221 |         |
|  | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 36,1593 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Scheffe <sup>a</sup>   | 10 %            | 14 | 9,9271                       |         |         |         |
|  | 50 %            | 14 |                              | 12,1143 |         |         |
|  | 100%            | 14 |                              |         | 15,3221 |         |
|  | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 36,1593 |
|  | Sig.            |    |                              | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. |                 |    |                              |         |         |         |
| a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 14,000.        |                 |    |                              |         |         |         |

**Fuente:** Elaboración propia.

## Tratamiento estadístico ANOVA para *salmonella typhimurium* a 48 horas

### Estadísticos descriptivos

| Descriptivos                |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|-----------------------------|----|---------|---------------------|----------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diametro del halo a las 48H |    |         |                     |                |  |                 |        |        |
|                             | N  | Media   | Desviación estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media |                 | Mínimo | Máximo |
|                             |    |         |                     |                | Límite inferior                              | Límite superior |        |        |
| 10 %                        | 14 | 11,5171 | ,30625              | ,08185         | 11,3403                                      | 11,6940         | 11,10  | 11,93  |
| 50 %                        | 14 | 13,6393 | ,35282              | ,09430         | 13,4356                                      | 13,8430         | 13,19  | 14,56  |
| 100%                        | 14 | 18,2743 | 1,03152             | ,27568         | 17,6787                                      | 18,8699         | 16,32  | 19,90  |
| Enrofloxacino               | 14 | 39,5664 | 3,04772             | ,81454         | 37,8067                                      | 41,3261         | 35,64  | 43,70  |
| Total                       | 56 | 20,7493 | 11,34689            | 1,51629        | 17,7106                                      | 23,7880         | 11,10  | 43,70  |

**Fuente:** Elaboración propia.

### Prueba post hoc *salmonella typhimurium* evaluadas a las 48 horas

| Diametro del halo a las 48H |                 |    |                              |         |         |         |
|-----------------------------|-----------------|----|------------------------------|---------|---------|---------|
|                             | Concentracion % | N  | Subconjunto para alfa = 0.05 |         |         |         |
|                             |                 |    | 1                            | 2       | 3       | 4       |
| HSD Tukey <sup>a</sup>      | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|                             | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|                             | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|                             | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|                             | Sig.            |    | 1,000                        | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Duncan <sup>a</sup>         | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|                             | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|                             | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|                             | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|                             | Sig.            |    | 1,000                        | 1,000   | 1,000   | 1,000   |
| Scheffe <sup>a</sup>        | 10 %            | 14 | 11,5171                      |         |         |         |
|                             | 50 %            | 14 |                              | 13,6393 |         |         |
|                             | 100%            | 14 |                              |         | 18,2743 |         |
|                             | Enrofloxacino   | 14 |                              |         |         | 39,5664 |
|                             | Sig.            |    | 1,000                        | 1,000   | 1,000   | 1,000   |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 14,000.

**Fuente:** Elaboración propia.

ANEXO N° 10: Certificado de identificación de la especie vegetal del herbario Vargas (cuz)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- |   |  |  |
|---|--|--|
| • APARTADO POSTAL<br>N° 921 - Cusco - Perú  | • CIUDAD UNIVERSITARIA<br>Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226 | • MUSEO INKA<br>Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380   |
| • FAX: 238156 - 238173 - 222512   | • CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210<br>243835 - 243836 - 243837 - 243838                                 | • CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA<br>San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246                          |
| • RECTORADO<br>Calle Tigre N° 127<br>Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398 | • LOCAL CENTRAL<br>Plaza de Armas s/n<br>Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015                               | • COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"<br>Av. De la Cultura N° 721<br>"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192 |

EL QUE SUSCRIBE PROFESOR INVESTIGADOR ASOCIADO AL HERBARIO VARGAS

(CUZ)

C E R T I F I C A .

Que las Señoritas **Rosario Santos Valer** y **Yenny Farfán Salas**, Bachilleres de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado a la Dirección del Herbario (CUZ), un espécimen de planta herborizada para su determinación taxonómica, la que al ser diagnosticada utilizando claves dicotómicas, consultas con bibliografía especializada y comparación con muestras del Herbario, pertenecen a la especie *Luma apiculata* la misma que en concordancia con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group. APG IV - 2016), presenta la siguiente posición taxonómica:

|            |  |
|------------|--|
| Clase      | Equisetopsida                                    |
| Subclase   | Magnoliidae                                      |
| Superorden | Rosanae  |
| Orden      | Myrtales   |
| Familia    | Myrtaceae  |
| Género     | <i>Luma</i>                                      |
| Especie    | <i>Luma chequen</i> (Feuillee ex Molina) A. Gray |

**Sinonimias:** *Eugenia bella* Phil., *E. chequen* Feuillée ex Molina, *E. gayana* Barnéoud, *E. myrtomimeta* Diels, *Luma gayana* (Barnéoud) Burret, *Myrceugenella chequen* (Feuillee ex Molina) Kausel, *M. gayana* (Barnéoud) Kausel, *Myrtus chequen* (Feuillee ex Molina) Spreng, *M. gayana* (Barnéoud) O. berg., *M. uliginosa* Miq.

**Nombres comunes:** Mirto, Arrayán, Arrayana.

Se expide la presente certificación para fines de investigación.

Cusco, 14 de mayo del 2016

  
M. Ca. Bigo. Alfredo Tapayachi Herrera  
Prof. Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ)

**ANEXO N° 11: Constancia de extracción de aceite esencial**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA Y PLANTAS MEDICINALES  
IEPLAM-CUSCO**

Edificio Santa Fe, Pasaje Constancia 102, oficina 209, segundo piso. Wanchaq-Cusco  
Teléfono: 084-248660 – email: aromainka@hotmail.com

**CONSTANCIA**

El que suscribe profesor investigador en plantas medicinales y aromáticas andinas (aceites esenciales).

**El que suscribe:**

**JUSTO MANTILLA HOLGUIN, identificado con DNI N° 23806875 colegiado COLBIOP N° 3467.**

**Hace constar lo siguiente:**

Que las Señoritas **ROSARIO SANTOS VALER Y YENNY FARFAN SALAS**, Bachilleres De La Escuela Profesional De Biología de La Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional De San Antonio Abad de Cusco; Han extraído aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A.Gray-Myrtaceae, "arrayan", por arrastre de vapor bajo la supervisión de mi persona.

Se expide la presente constancia, a solicitud de las interesadas para fines que vieran por conveniente.



  
Justo Mantilla Holguín  
BIOLOGO  
C.B.P. 3467

Cusco, 01 de septiembre del 2016

## ANEXO N° 12: Constancia de análisis cromatografico del aceite esencial



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

### CONSTANCIA DE ANÁLISIS

El que suscribe, analista responsable del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que las Bachilleres Yenny Farfan Salas y Rosario Santos Valer de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad De Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ha presentado al laboratorio un frasco con aceite esencial para su identificación de sus componentes y determinar su densidad relativa, como parte de su proyecto de investigación titulado "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL Aceite *Luma chequen* (Arrayan) FRENTE A *Salmonella spp* AISLADAS DE CUYES DEL DISTRITO DE QUIQUIJANA. La composición química fue caracterizado utilizando el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N, acoplado a un Espectrómetro de Masas. La identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de cada componente del aceite con los datos compilados en la librería NIST011a (Wiley) y Flavor v2, la densidad se determino por el método gravimetrico

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 21 de Diciembre del 2016

Arre:



  
Jorge Chejuenara Pari  
C.Q.P. N° 914

ANEXO N° 13: Constancia de tipificación de cepas de *Salmonella spp*



**INFORME DE RESULTADO**

|                          |  |                                      |            |
|--------------------------|--|--------------------------------------|------------|
| <b>CODIGO DE ORIGEN</b>  | M1                                       |                                      |            |
| <b>ESTABLECIMIENTO</b>   | LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL CUSCO |                                      |            |
| <b>LABORATORIO</b>       | ENTEROPATOGENOS                          |                                      |            |
| <b>ENFERMEDAD</b>        | ENTEROPATOGENOS                          |                                      |            |
| <b>MÉDICO</b>            | JOSE SANTA CRUZ QUIPE                    |                                      |            |
| <b>DOC REFERENCIA</b>    | 8622016GRUCUSCORRACDGLSP                 | <b>FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA</b> | 29/09/2016 |
| <b>TIPO DE MUESTRA</b>   | CEPA                                     | <b>FECHA DE RECEPCION LAB REG</b>    |            |
| <b>CODIGO DE MUESTRA</b> | INS103294916                             | <b>FECHA DE RECEPCION EN INS</b>     | 21/10/2016 |

**PRUEBAS**

| CULTIVO Y TIFICACION ENTEROPATOGENOS | Res Laboratorio de Origen: | Res Lab Referencial   | COMENTARIOS |
|--------------------------------------|----------------------------|---|-------------|
| Código LANARE                        |                            | Fecha 21/10/2016<br>Salmonella<br>Typhimurium<br>4.492-2016 |             |

| PRUEBA DE SENSIBILIDAD ENTEROPATOGENOS | Res Laboratorio de Origen: | Res Lab Referencial             | COMENTARIOS |
|--|----------------------------|---------------------------------|-------------|
| Clotrexone 30 ug                       |                            | Fecha 21/10/2016<br>_NO REALIZO |             |
| Ampicilina 10 ug                       |                            | Sensible                        |             |
| Cloramfenicol 30 ug                    |                            | Sensible                        |             |
| Ciprofloxacina 5 ug                    |                            | Intermedia                      |             |
| Cotrimoxazol                           |                            | Sensible                        |             |
| Cefotaxima 30 ug                       |                            | Sensible                        |             |
| Acido nalidixico                       |                            | Sensible                        |             |
| Amoxicilina + Ac Clavulánico           |                            | Sensible                        |             |
| Nitrofurantoina 300 ug                 |                            | Sensible                        |             |
| Tetraciclina 30 ug                     |                            | Sensible                        |             |
| Ceftazidima                            |                            | Sensible                        |             |

Observaciones:



COORD. DE LABORATORIO:  
ronnie gustavo gavilan chavez