



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE
Dysphania ambrosioides FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y
Staphylococcus aureus MULTIDROGORESISTENTES**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. YENY ANGELICA YANQUI CALSIN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y

LABORATORIO CLÍNICO

PUNO – PERÚ

2024



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL A CEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambros*

AUTOR

YENY ANGÉLICA YANQUI CALSIN

RECuento de PALABRAS

33848 Words

RECuento DE CARACTERES

199381 Characters

RECuento DE PÁGINAS

166 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

4.8MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 21, 2024 4:18 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Aug 21, 2024 4:21 AM GMT-5

● 15% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 13% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 7% Base de datos de trabajos entregados
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

Juan Pablo
Huarachi
Valencia

Resumen



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN
VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* FRENTE A
Pseudomonas aeruginosa Y *Staphylococcus aureus* MULTIDROGORESISTENTES

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. YENY ANGELICA YANQUI CALSIN

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

APROBADA POR:

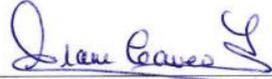
PRESIDENTE:


Dra. ROXANA DEL CARMEN MEDINA ROJAS

PRIMER MIEMBRO:


Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

SEGUNDO MIEMBRO:


Mg. DIANA ELIZABETH CAVERO ZEGARRA

DIRECTOR / ASESOR:


M.Sc. JUAN PABLO HUARACHI VALENCIA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 23/08/2024

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUBLINEA: Diagnóstico y Epidemiología




V^oB^o Dra. VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN-FCCBB



DEDICATORIA

A Dios por guiarme mi camino, cuidar mis pasos, darme fuerza y voluntad para continuar con mis estudios

A mis queridos padres Moisés Yanqui Sucasaca y Domitila Calsin Quispe quienes fueron mi principal guía, apoyo, paciencia y por motivarme durante el desarrollo de mi vida y mostrarme el camino correcto a través de sus enseñanzas y consejos para lograr mis metas y sueños.

A mis hermanos y hermana por su cariño y apoyo.

Yeny Angelica Yanqui Calsin



AGRADECIMIENTOS

A Dios por protegerme y cuidarme en este camino.

Mi gratitud a mi alma mater la “Universidad Nacional del Altiplano - Puno”, y en especial a mi querida Facultad de Ciencias Biológicas, y a la plana docente, quienes aportaron con su conocimiento y compartiendo sus experiencias e ideas por exigirnos día a día para superarnos.

A mis padres por confiar en mí, ayudándome y apoyándome incondicionalmente en todo momento, también agradecer a mis hermanos.

A mi distinguido asesor MSc. Juan Pablo Huarachi Valencia, mi sincero agradecimiento por su guía, apoyo, disponibilidad y paciencia durante el transcurso de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado, Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas, Mg. Dante Mamani Sairitupac y Mg. Diana Elizabeth Cavero Zegarra por sus recomendaciones brindadas para la mejora de este proyecto.

Al Blgo. Balbino Lorgio Palacios Frisancho encargado del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional del Altiplano, por su apoyo en todo el transcurso de la ejecución de mi proyecto de investigación.

Blgo. Jhonny Rafael Coaquira Toro por sus sugerencias y consejos, siendo un gran soporte, mi más sincero agradecimiento.

A mis amistades y amigos a todos los que estuvieron presentes motivándome a no desistir, especialmente a Fanny, por sus ánimos, conversaciones inspiradoras y su apoyo.

Yeny Angelica Yanqui Calsin



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ACRÓNIMOS	
RESUMEN	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 ANTECEDENTES	20
2.2 MARCO TEÓRICO	29
2.2.1 <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin y Clemants.....	29
2.2.1.1 Descripción botánica.....	29
2.2.1.2 Clasificación taxonómica.....	30
2.2.1.3 Usos medicinales.....	30
2.2.2 Aceites esenciales.....	31
2.2.2.1 Descripción	31



2.2.2.2	Composición química	32
2.2.2.3	Terpenos.....	32
2.2.2.3.1	Monoterpenos.....	33
2.2.2.3.2	Sesquiterpenos.....	37
2.2.2.3.3	Diterpenos	41
2.2.2.4	Actividad biológica.....	41
2.2.2.5	Métodos de extracción	43
2.2.3	Resistencia antibiótica.....	47
2.2.3.1	Definición.....	47
2.2.3.2	Origen.....	47
2.2.3.3	Mecanismos de resistencia.....	49
2.2.4	Microorganismos.....	58
2.2.4.1	Definición.....	58
2.2.4.2	Tipos de microorganismos	58
2.2.4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
2.2.4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	65
2.2.5	Técnicas de la actividad antimicrobiana	76
2.2.5.1	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	76
2.2.5.2	Concentración mínima bactericida (CMB).....	76
2.2.5.3	Método del Kirby – Bauer	76

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	ÁREA DE ESTUDIO	78
3.2	DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO.....	78
3.3	POBLACIÓN Y MUESTRA	79



3.3.1	Población.....	79
3.3.2	Muestra.....	79
3.4	METODOLOGÍA	80
3.4.1	Identificación de los constituyentes volátiles del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i>	80
3.4.1.1	Recolección e identificación del material vegetal.....	80
3.4.1.2	Extracción del aceite esencial	84
3.4.1.3	Caracterización de los constituyentes del aceite esencial	85
3.4.2	Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes	88
3.4.2.1	Obtención de las cepas clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes	88
3.4.2.2	Concentración mínima bactericida frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	93
3.4.2.3	Susceptibilidad antibiótica en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	94
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	97

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	CONSTITUYENTES VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Dysphania ambrosioides</i>.....	99
4.2	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Dysphania</i>	



<i>ambrosioides</i> FRENTE A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes.....	112
4.2.1 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes mediante la técnica de macrodilución en caldo .	112
4.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> frente a <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes mediante el método de Kirby-Bauer	120
V. CONCLUSIONES.....	128
VI. RECOMENDACIONES.....	129
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
ANEXOS.....	152

ÁREA: Ciencias Biomédicas

SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Diagnostico y epidemiologia

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 23 de agosto del 2024



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Clasificación química y estructura química de terpenos y terpenoides (alcoholes, aldehídos, cetonas, esterés, éteres, peróxidos y fenoles).....	40
Figura 2 Mecanismos de resistencia antibacteriana en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Figura 3 Principales mecanismos de resistencia antibacteriano en <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Figura 4 Perfil cromatográfico de los constituyentes volátiles presentes en el aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> identificados por CG-EM.....	110
Figura 5 Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento bacteriano (UFC x 100/ml) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y la concentración de aceite esencial de hojas y parte aérea de <i>Dysphania ambrosioides</i>	113
Figura 6 Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento bacteriano (UFC x 100/ml) de <i>Staphylococcus aureus</i> y la concentración de aceite esencial de hojas de <i>Dysphania ambrosioides</i>	117
Figura 7 Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto del aceite esencial de hojas y parte aérea de <i>Dysphania ambrosioides</i>	121
Figura 8 Análisis de variabilidad de Kruskal Wallis y prueba comparaciones múltiples de Dunn de la susceptibilidad en <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto del aceite esencial de hojas y parte aérea de <i>Dysphania ambrosioides</i>	124



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Dysphania ambrosioides</i> (paico).....	30
Tabla 2 Tipos de monoterpenos	34
Tabla 3 Tipos de sesquiterpenos	39
Tabla 4 Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Tabla 5 Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	66
Tabla 6 Constituyentes volátiles del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> identificados por CG-EM.....	99
Tabla 7 Clasificación de los constituyentes volátiles del aceite esencial de <i>Dysphania</i> <i>ambrosioides</i> identificados por CG-EM	106



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Lugar de estudio y secado de la especie <i>Dysphania ambrosioides</i>	152
ANEXO 2. Extracción y análisis físico del aceite esencial <i>Dysphania ambrosioides</i>	153
ANEXO 3. Elaboración de los medios de cultivo, macrodilución en caldo, y la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer.	154
ANEXO 4. Desarrollo experimental para el análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i>	155
ANEXO 5. Concentración mínima inhibitoria frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes para el aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i>	156
ANEXO 6. Concentración mínima bactericida frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes para el aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i>	157
ANEXO 7. Susceptibilidad antibiótica en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> multidrogoresistentes para el aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i>	158
ANEXO 8. Ficha de informe clínico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> conforme con el sistema Vitek 2.0.	159
ANEXO 9. Ficha de informe clínico de <i>Staphylococcus aureus</i> conforme con el sistema Vitek 2.0.	160
ANEXO 10. Constancia de la determinación taxonómica de paico realizado en el Herbarium Arequipense de la Universidad Nacional de San Agustín.....	161



ANEXO 11. Constancia de ejecución del proyecto de tesis en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la UNA PUNO	162
ANEXO 12. Ficha de colección de un espécimen de <i>Dysphania ambrosioides</i> (Paico)	163
ANEXO 13. Matriz de tabulación de datos	164
ANEXO 14. Declaración jurada de autenticidad de tesis.....	165
ANEXO 15. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio Institucional	166



ACRÓNIMOS

AE:	Aceite esencial
ATCC:	American Type Culture Collection
CG-EM:	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CLSI:	Comité de Laboratorios y Estándares Clínicos
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CMB:	Concentración mínima bactericida
<i>et al.:</i>	y colaboradores
Kg:	Kilogramo
MDR:	Multidrogoresistente
µl/ml:	Microlitro/mililitro
MH:	Agar Müeller Hinton
mm:	Milímetro
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
OMS:	Organización Mundial de Salud
<i>P. aeruginosa:</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus:</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC:	Unidad formadora de colonia



RESUMEN

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias están presentando una creciente resistencia a los antibióticos convencionales. En este contexto, los aceites esenciales (AE) derivados de plantas se perfilan como una alternativa prometedora para el tratamiento. Por tanto, este estudio se enfocó en investigar los constituyentes volátiles y la actividad antibacteriana del AE de paico (*Dysphania ambrosioides*) contra cepas multidrogoresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La investigación comenzó con la recolección de las partes aéreas de paico en el distrito de Pusi, Huancané, seguido por el secado de dichas partes. Posteriormente, se obtuvo el AE a través de hidrodestilación. La identificación de los constituyentes volátiles se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), se llevó en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad de San Antonio de Abad del Cusco, mientras que la actividad antibacteriana se evaluó utilizando tres métodos: concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y difusión en disco frente a 2 cepas multidrogoresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, identificadas mediante el sistema Vitek 2.0. El análisis reveló la presencia de 20 compuestos volátiles en el AE, siendo los principales (+)-2-careno (44%), (+)-4-careno (26%) y m-cimeno (20%), la mayoría de los cuales pertenecen a la categoría de monoterpenos (65%), con predominio de hidrocarburos (69%) y monoterpenos oxigenados (31%). En cuanto a la actividad antibacteriana, el AE de *Dysphania ambrosioides* produjo un halo de inhibición de 14.24 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 200^{ab} µl/ml, mientras que para *Staphylococcus aureus* se observó un efecto similar en la inhibición del crecimiento a concentraciones de 200^{ab} y 100^{abc} µl/ml (10.96 mm y 10.01 mm de halo de inhibición respectivamente), con un efecto parecido a la clorhexidina. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) frente a *Pseudomonas aeruginosa* fue de 154 y 155 µl/ml, respectivamente, mientras que para *Staphylococcus aureus* fueron de 160 y 162 µl/ml, respectivamente. Se concluye, que algunos de los componentes volátiles del AE de paico exhiben una mayor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* multidrogoresistente según el método de difusión en disco, y contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: Aceite esencial, antibacteriano, *Dysphania ambrosioides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.



ABSTRACT

Infectious diseases caused by bacteria are showing increasing resistance to conventional antibiotics. In this context, essential oils (EO) derived from plants emerge as a promising alternative for treatment. Therefore, this study focused on investigating the volatile constituents and antibacterial activity of paico EO (*Dysphania ambrosioides*) against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The research began with the collection of the aerial parts of paico in the district of Pusi, Huancané, followed by the drying of said parts. Subsequently, the EO was obtained through hydrodistillation. The identification of the volatile constituents was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), it was carried out in the Chromatography and Spectrometry Laboratory of the University of San Antonio de Abad of Cusco, while the antibacterial activity was evaluated using three methods: minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and disk diffusion against 2 multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, identified using the Vitek 2.0 system. The analysis revealed the presence of 20 volatile compounds in the EO, the main ones being (+)-2-carene (44%), (+)-4-carene (26%) and m-cymene (20%), the majority of which belong to the category of monoterpenes (65%), with a predominance of hydrocarbons (69%) and oxygenated monoterpenes (31%). Regarding antibacterial activity, *Dysphania ambrosioides* EO produced an inhibition zone of 14.24 mm against *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 200^{ab} µl/ml, while for *Staphylococcus aureus* a similar effect was observed in growth inhibition at concentrations of 200^{ab} and 100^{abc} µl/ml (10.96 mm and 10.01 mm inhibition zone respectively), with an effect similar to chlorhexidine. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) against *Pseudomonas aeruginosa* were 154 and 155 µl/ml, respectively, while for *Staphylococcus aureus* they were 160 and 162 µl/ml, respectively. It is concluded that some of the volatile components of paico EO exhibit greater antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* according to the disk diffusion method, and against *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Essential oil, antibacterial, *Dysphania ambrosioides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un desafío alarmante para la salud global, exacerbado por el uso inapropiado y desmedido de estos medicamentos. La Organización Mundial de la Salud ha identificado microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, particularmente preocupantes debido a su resistencia a múltiples fármacos, lo que dificulta su control y tratamiento efectivo (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Esta resistencia bacteriana ha alcanzado proporciones críticas, contribuyendo a millones de fallecimientos anuales en todo el mundo. En América Latina, la situación es igualmente alarmante, con países como Colombia, México y Venezuela enfrentando una carga significativa de muertes debido a infecciones resistentes a los antibióticos; situación que empeoraría en los próximos años con proyecciones de hasta 10 millones de muertes para el 2050 relacionados a infecciones por bacterias patógenas (British, 2022).

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo predominante en las infecciones nosocomiales, con una alta resistencia antimicrobiana, afectando al 7.1% en Estados Unidos y al 8.9% en países europeos. En Asia, aproximadamente el 42.8% de las neumonías nosocomiales causadas por *Pseudomonas aeruginosa* son multirresistentes, mientras que el 4.9% son ultrarresistentes (Paz-Zarza et al., 2019).

Según la distribución geográfica de las resistencias en el Perú, se observa un mayor número de aislamientos en instituciones como EsSalud, con un 81.6%, seguido del MINSA, con un 18.4%. Asimismo, se destacan las regiones de Cusco (12.4%), La Libertad (6.4%), Callao (6.4%) y Lambayeque (4.9%) como las áreas con mayor prevalencia (Mayta-Barrios et al., 2021).



Las cepas de *Staphylococcus aureus* en América Latina muestran una alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* multidrogoresistente (MRSA) (>40%), con cierta variabilidad entre países. Además, Brasil y Venezuela registran las tasas más altas, con un 62% y un 57%, respectivamente. En Perú, la frecuencia reportada oscila entre 50% y 54% (Cabrejos et al., 2021).

La resistencia bacteriana surgiría del uso inapropiado de antibióticos, falta de innovación en nuevos medicamentos y solo la priorización de enfermedades crónicas por parte de la industria farmacéutica (Fernandez y Serrano, 2018).

Los principales mecanismos de resistencia antibacteriana en *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentran en la expresión de la cefalosporinasa AmpC inducible, la producción en la forma constitutiva (MexAB-OprM) como inducible (MexXY) de las bombas de eflujo, así como la baja permeabilidad de su membrana externa, adicional a esto se ha observado la existencia de un resistoma mutacional generado por mutaciones cromosómicas (Horcajada et al., 2019).

En el caso de *Staphylococcus aureus*, se asocia la multidrogoresistencia con diversos mecanismos, tales como el desarrollo de penicilinasas, betalactamasas, metilación ribosomal, y la presencia de bombas de eflujo. Además, se han identificado alteraciones en la estructura de precursores de peptidoglucano, así como mutaciones en diversas enzimas como la topoisomerasa IV, la DNA girasa, la RNA polimerasa, la dihidropteroato sintasa, la dihidrofolato reductasa, el RNA ribosomal 23S y la proteína ribosomal L3 del 50S (Kakoullis et al., 2021).

Ya que en la región Puno, existe una diversidad etnobotánica muy rica que señala que especies como *Dysphania ambrosioides* tiene una amplia gama de usos, principalmente frente a diarreas, dolor estomacal, desórdenes gastrointestinales, pasado



de frío, resfrío, próstata, matriz entre otros, lo cual probablemente se debería a microorganismos patógenos entre ellos bacterias, lo cual se ve reflejado en un buen índice de uso y aceptabilidad cultural (Suaña, 2022), es que este contexto, surge la necesidad de explorar alternativas terapéuticas derivados de plantas, que no generan resistencia bacteriana y protegen la salud, emergiendo como una opción prometedora. Sin embargo, su eficacia y seguridad deben ser evaluadas rigurosamente a través de la investigación científica, por lo cual resulta importantes alternativas terapéuticas eficaces y seguras para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas con niveles elevados de resistencia a los antibióticos convencionales.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los constituyentes volátiles y actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes tipificados por el sistema Vitek 2.0.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los constituyentes volátiles del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants.
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistentes mediante concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida y difusión en discos



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

El contenido de δ -3-careno en el aceite esencial de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* recolectadas en Marruecos fue notablemente alto (61.51%), seguido por el p-cimeno con un 14.67% y el 1,2:3,4-diepoxi-p-mentano (6.19%), de igual modo, el aceite esencial de las inflorescencias también tuvieron los mismos compuestos, aunque con cantidades variables: el δ -3-careno representó 44.29%, el 1,2:3,4-diepoxi-p-mentano alcanzó el 19.46% y el p-cimeno un 17.85% (Kasrati *et al.*, 2024).

Kandsi *et al.* (2022) en Francia hallaron que el AE de *Dysphania ambrosioides* contenía principalmente (+)-4-careno (50.5%, tallo), m-cimeno (20.74%, hoja) y trans- β -terpinil butanoato (31.13% flor), ejerciendo mayor efecto antibacteriano el AE de flores, tallos y hojas frente a *Escherichia coli* (CMB 12, 18 y 110 $\mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus aureus* (CMB 18, 18 y ≥ 110 $\mu\text{g/ml}$) y *Enterococcus faecalis* (CMB 110, 110 y ≥ 110 $\mu\text{g/ml}$) respectivamente.

En Nigeria, Owokotomo (2022) observó que el origen geográfico de la planta tiene influencia en la composición de *Dysphania ambrosioides*, identificando ocho componentes principales que representan el 99.6% del aceite, entre los cuales están α -terpineno (41.36%), acetato de α -terpinenilo (31.81%), timol (8.23%), carvacrol (6.7%), p-cimeno (5.76%), fitol (2.97%), ascaridol (2.62%) y alcanfor (0.18%).

En otro estudio, Abdoul *et al.* (Abdoul-Latif *et al.*, 2022) en Djibouti, señalan que los aceites esenciales de *Tagetes minuta* y *Lavandula coronopifolia*, con un rendimiento de 0.45 y 0.42% contenían especialmente dihidrotagetona (21%) y cis-cariofileno



(18.9%) ejerciendo actividad antibacteriana frente a 5 microorganismos como (*Corynebacterium sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei* y *Salmonella enterica*) y 9 microorganismos (*Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella sonnei* y *Salmonella enterica sv. Typhimurium*) respectivamente.

Asimismo, D'Aquila *et al.*, (2022) en Italia encontraron que de 10 plantas aromáticas, el AE de *Clinopodium nepeta* (CMB 1µl/ml), *Origanum vulgare* (CMB 0.4 µl/ml) y *Foeniculum vulgare* (CMB 0.3 1µl/ml) tienen mayor efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* JM109, siendo el óxido de piperitona (34.28%), p-timol (47.31%) y estragol (45.3%), sus principales componentes respectivamente.

Las investigaciones realizadas por Ouadja *et al.* (2021) en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* originario de Kara, en el norte de Togo, revelaron que los principales compuestos fueron 2-careno (37.79%), O-cimeno (33.27%) y α -terpineno (20.94%).

Según Ali *et al.* (2021) en Pakistan mediante CG-EM demostraron que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* contiene 4-careno en un 56.59% seguido en orden de importancia de o-cimeno, (41.46%), los cuales se informaron por primera vez en esta especie, no encontrando ascaridol.

De otro lado, en Pakistán, Ali *et al.* (2021) determinaron que el AE de *Chenopodium ambrosioides* presenta altos niveles de α -terpineno (53.4%), ascaridol (17.7%) y γ -cimeno (12.1%), así como otros compuestos presentes en cantidades relativamente menores, como carvacrol (7.3%) e isoascaridol (2.1%).



En Marruecos, Zefzoufi *et al.* (2020) observaron que el aceite esencial de partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Chenopodium ambrosioides* presentaban como principales constituyentes el ascaridol (34%), α -terpineno (13.3%), p-cimeno (18.2%), timol (6.4%) y carvacrol (6.1%).

En Nigeria, Fatokun *et al.* (2019) también analizaron la composición química del AE de *Chenopodium ambrosioides* a través de CG-EM se reveló presencias de un total de veinte compuestos entre los cuales estaban ∞ -terpineno (48.68%), o-cimeno (21.71%) y trans-beta-terpinil butanoato (17.15%), seguido de compuestos menores como ascaridol (5.67%), gamma-terpineno (2.16%) y D-limoneno (1.83%).

Almeida *et al.* (2019) en Brasil, analizaron como alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos el aceite esencial de paico mostrando actividad antibacteriana contra *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082).

Adicionalmente, en Nigeria, Fatokun *et al.* (2019) encontraron que el aceite esencial de hojas de *Dysphania ambrosioides* tiene especialmente ascaridol (8.7%) ejerciendo efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* (CMI 10 μ l/ml), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI 10 μ l/ml), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI 20 μ l/ml) y *Bacillus subtilis* (CMI 20 μ l/ml).

Para Mokni *et al.* (2019) en Túnez, empleando el proceso de hidrodestilación y utilizando técnicas de CG-EM y CG-FID identificaron 44 componentes en el aceite esencial de paico, de los cuales los más relevantes fueron cis-ascaridol (60.33 %), m-cimeno (22.17 %) y α -terpineno (1.79 %).



Almeida *et al.* (2019) mediante análisis cromatográfico del aceite, identificaron la presencia de 16 constituyentes, entre ellos, el monoterpeno α -terpineno que destacó como el principal compuesto, representando el 54.09% de la composición total. Asimismo, el ascaridol se destacó como el segundo terpeno más abundante en el aceite, con un 15.13%.

De otro lado, Cabrera (2017) en Ecuador, identificó 22 compuestos que representan el 92.86% del aceite esencial del paico (0,9494 g/cm³), siendo los principales el limoneno (29.73%), menta-2,8-dien-1-ol<trans- p-> (10.86%), p-cimeno (8.92%), α -terpineno (8.83%) y menta-1(7),8-dien-2-ol<trans-p-> (6.90%), teniendo actividad biológica con una CMI de 0.625 mg/ml frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Asimismo, Cubides y Sarmiento (2022) en Colombia evaluaron formulaciones a base de *Chenopodium ambrosioides* y sus metabolitos secundarios hallando que el trans- β -cariofileno (B-C), carvacrol, α -terpineno y un extracto comercial de epazote, tenía actividad antileishmaniásica (*Leishmania braziliensis*) (CI₅₀ 2.58 μ g/ml). De igual modo, Damasceno (2013) en Brasil, determinaron 0.7% de rendimiento de extracción encontrando en el aceite esencial de las hojas la presencia de α -terpineno (42.14%) y α -terpinenil-acetato (31.57%), siendo mucho menor el ascaridol (0.87%).

De otro lado, Pavela *et al.* (2018) registraron cis y trans ascaridol en proporciones de 35.4% y 26.0%, respectivamente, junto con p-cimeno (29.2%) como compuestos mayoritarios. Kulitz *et al.* (2017) por su parte, en Brasil, reportaron que las hojas de *Chenopodium ambrosioides* presentan triterpenoides, esteroides, catequinas, flavononas, compuestos fenólicos, taninos y saponinas con posibles propiedades vermífuga, insecticida y bactericida, entre otras. Así también en este país, Lacerda *et al.* (2021) mencionan que el AE de paico tiene actividad insecticida (contra abejas y moscas



domésticas), antiviral, antihelmíntica, antifúngica, antileishmanial y antioxidante debido al ascaridol, isoascaridol, p-cimeno, limoneno y γ -terpineno demostrando que el γ -terpineno es seguro en pruebas de fetotoxicidad embrionaria en ratas.

En Brasil, Degenhardt *et al.* (2016) encontraron como principales fitoquímicos presentes en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, el p-cimeno (42.32%) y el ascaridol 2 (49.77%), mientras que Oliveros (2016) en Guatemala en la misma especie vegetal determinó D-limoneno, trans-carveol, 2-metilen-5-(1-metiletenil)-ciclohexanol, S(+)-carvona, trans-p-menta-2,8-dieno-1-ol y fitol; sin embargo no se reportó ascaridol que si fue significativa en otras investigaciones señalando que las condiciones climáticas donde se desarrolla la planta, el tipo de suelo, el estado fenológico, son determinantes para la composición de sus metabolitos.

De otro lado, Pereira *et al.* (2015) en Brasil, indican que *Chenopodium ambrosioides* L., “mastruz”, se utiliza para tratar la bronquitis crónica, tuberculosis, hematomas, hernias, como antiparasitario y antibiótico, presentando 21.0 mg/g de equivalentes de ácido gálico y 135.4 mg/g de flavonoides, sin embargo, no se observó actividad antibacteriana, pero sí cuando se asoció a aminoglucósidos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Brahim *et al.* (2015) en Marruecos informaron que, mediante el análisis realizado con CG-EM, detectaron la presencia de un total de 24 compuestos del aceite *Chenopodium ambrosioides* var. *Ambrosioides*, entre los cuales se encontraban principalmente constituyentes como α -terpineno (23.77%), ascaridol (14.48%), ep-cimeno (12.22%), neral (8.08%), geraniol (5.60%), ascaridol (2.96%) y 2-careno (2.77%).



Concerniente a Ávila *et al.* (2014) en México estudiaron a *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants indicando que es una planta herbácea muy conocida como antihelmíntica, vermífuga y emenagoga, siendo utilizada en trastornos digestivos, respiratorios, urogenitales, vasculares y nerviosos, con actividad antifúngica del aceite esencial (ascaridol, principal compuesto activo) frente a *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides* y *Helminthosporium oryzae*. De igual modo, Gutierrez (2017) en Bolivia, encontró efecto antimicrobiano bajo a moderado del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides*, frente al basidiomiceto *Moniliophthora roreri* a 100 y 200 mg/ml.

Además, la composición química reportada por Alitonou *et al.* (2012), en Brasil, quienes estudiaron tres aceites esenciales extraídos de *Chenopodium ambrosioides* señalan que en éstos, están presentes α -terpineno (48.8–63.7%), ascaridol (11.7–9.7%), p-cimeno (15.4–19.1%) e isoascaridol (0.7–2.5%). Asimismo, Lohani *et al.* (2012) en la India encontraron α -terpineno (44.7%), p-cimeno (21.3%) y ascaridol (17.9%).

Es importante destacar que los cambios en la composición pueden ocurrir incluso después de la extracción de los aceites esenciales debido a reacciones químicas, como la autooxidación del α -terpineno, la cual puede aumentar la concentración de otros componentes, como el ascaridol, mientras que su concentración se reduce al entrar en contacto con el aire (Rudbäck *et al.*, 2012).

Estas variaciones en la composición fitoquímica en el aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides* se deberían a diversas variables presentes en los estudios, como el tipo de suelo, los índices de pluviosidad, la intensidad del viento, la época y temporada de recolección; diferencias que han sido previamente documentadas (Chu *et*



al. 2011). En ese sentido, Boutkhal *et al.* (2009), en Marruecos, encontraron para el aceite esencial de las partes aéreas principalmente terpineno (61.04%), 4-careno (13.55%) y p-cimeno (12.94%) con actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus retgerii*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella enteritidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Trichosporon mucoides*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Aspergillus niger*.

La variación en el porcentaje y compuestos químicos puede deberse a las diversas ubicaciones geográficas existentes, el tiempo de recolección de brotes/hojas en diferentes etapas, los procedimientos de extracción y los métodos de secado (Rohloff *et al.* 2005). Otros factores que determinan la variabilidad en la composición química del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* son los genéticos, que están basados en la evolución de las especies, junto a las condiciones fisiológicas y ambientales (Figueiredo *et al.*, 2008).

En Camerún, Chekem *et al.* (2010) reportaron para el aceite esencial obtenido de las partes aéreas del *Chenopodium ambrosioides* principalmente α -terpineno (51.3%), p-cimeno (23.4%) y p-menta 1,8 dieno, de forma similar, Singh *et al.* (2008), pero en la India, al evaluar aceite esencial de las hojas revelaron la presencia de α -terpineno (47.37%), p-cimeno (25.77%) y cis-ascaridol.

Jardim *et al.* (2008) en Brasil reportaron actividad antifúngica del aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides* especialmente (Z)-ascaridol (61%), mientras que Tapondjou *et al.* (2002), en Camerún encontraron concentraciones superiores a 50% de p-cimeno, cuyas diferencias en la composición química pueden atribuirse a factores como la variabilidad genética de la planta, las condiciones de crecimiento, el clima y los métodos de extracción utilizados en cada estudio.



De otro lado, los componentes predominantes sobre el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* procedente de distintas regiones como el de Yemen fueron el ascaridol (54.2%), isoascaridol (27.7%) y p-cimeno (8.1%). Al-kaf *et al.*, (2016), en Madagascar también reportaron especialmente ascaridol (41.8%), isoascaridol (18.1%) y p-cimeno (16.2%) (Cavalli *et al.*, 2004). En Cuba lo fue el ascaridol (30.5-47.1%), el p-cimeno (20.2-21.1%) y el α -terpineno (17.0-20.7%) (Monzote *et al.*, 2011); de igual modo en Brasil se encontró principalmente el ascaridol (61.4%), isoascaridol (18.6%) (Potawale *et al.*, 2008), y en *Chenopodium ambrosioides* cultivado en Uttarakhand (India) lo fue el ascaridol (45.0%), isoascaridol (2.9%), p-cimeno (27.1%), α -terpineno (8.3%) (Lohani *et al.*, 2012) y en China lo constituyó el ascaridol (29.7%), isoascaridol (13.0%) y p-cimeno (12.7%) (Chu *et al.*, 2011).

En India, Prasad *et al.* (2010) reportaron el m-cimeno que es el componente principal, representando el 43.9% del aceite, mientras que en estudios realizados como en Nigeria por Owolabia *et al.* (2009) se reportaron α -terpineno (63.1%), p-cimeno (26.4%) y ascaridol (3.9%) en *Dysphania ambrosioides* silvestre. Y en el sur de la India Gupta *et al.* (2002) hallaron α -terpineno (63.6%) y p-cimeno (19.5%), mientras que en Camerún se encontró principalmente p-cimeno (50.00%) (Tapondjou *et al.*, 2002).

A nivel nacional, Guzmán y Rodríguez (2021), en Huancayo, hallaron en extracto etanólico de hojas, compuestos fenólicos, taninos, triterpenos, lactonas α,β -insaturadas y alcaloides, la que al 50% no presentó efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, sin embargo, al combinarlo con extracto de *Schinus molle* al 50% si hubo efecto antibacteriano.

En Lima, Acostupa (2020), analizó el extracto foliar de *Chenopodium ambrosioides* encontrando antocianinas, catequinas, flavonoides, terpenoides y esteroides.



Concerniente a Lezama (2019) en Trujillo, determinó que el aceite esencial de hojas de paico al 75% vs 25% tenía mejor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ($p < 0.05$), sin embargo, fue menor al de la tetraciclina ($p < 0.05$).

A nivel local, en la región de Puno, Puma (2019) realizó la extracción de AE de hojas y frutos de *Dysphania ambrosioides* y su caracterización, obteniendo un rendimiento de 0.449%, siendo los componentes identificados el bornileno (47.45%), m-cimeno (19.23%) y δ -careno (15.17%). De igual modo, Aquino (2017) analizó la actividad antimicrobiana de cuatro dosis del AE del paico (*Chenopodium ambrosioides*) y otras plantas medicinales sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, encontrando que el AE tiene una mayor actividad antimicrobiana en *Escherichia coli* a una dosis de 20 μ l, ejerciendo una inhibición porcentual de dos veces al control positivo, alcanzando un halo de inhibición de 10 mm ($p < 0.01$).



2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin y Clemants

2.2.1.1 Descripción botánica

La *Dysphania ambrosioides* (sinonimia *Chenopodium ambrosioides*), tiene diferentes nombres vernaculares según el país de origen como paico (Perú y Argentina), epazote (México), yerba de Santa María y té de los jesuitas. Es una hierba aromática anual siendo, a veces de características leñosas en la base, variando desde glabra a pilosa, con tricomas eglandulares y glandulares (Mosyakin y Clemants, 2002).

Los tallos son erectos con abundantes costillas, su hoja es angosto-elíptica, pinnatinervada, peciolada, aserrada y posee glomérulos en panojas terminales. Los pétalos no están presentes. Su cáliz está constituido por cinco sépalos membranáceos, glabros y libres hasta la mitad. Presenta cinco estambres, un ovario esférico y comprimido y un estilo breve. El fruto se encuentra totalmente encerrado en un cáliz inflado; estando este último ubicado en la región apical con cinco gibas laterales; con un pericarpio translúcido, no adherente, con tricomas glandulares de color ámbar, que generalmente están en el ápice. Sus semillas tienen 0.6 a 0.8 mm de diámetro y son de color marrón brillante. Es categorizada como una maleza secundaria de cultivos y en montes frutales (Mosyakin y Clemants, 2002).

2.2.1.2 Clasificación taxonómica

Recientemente se hizo una modificación en la familia *Chenopodiaceae*, la cual se reclasificó a la familia *Amaranthaceae*, pasando a constituir la subfamilia *Chenopodioideae*, que contiene al paico, denominada inicialmente *Chenopodium ambrosioides*, actualmente llamada *Dysphania ambrosioides* (Mosyakin y Clemants, 2002).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Dysphania ambrosioides (paico)

Categoría taxonómica	Descripción
Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Carophyllales
Familia	Amaranthaceae
Subfamilia	Chenopodioideae
Género	<i>Dysphania</i>
Especie	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosakyn y Clemants, 2002

Fuente: Schoch *et al.* (2020)

2.2.1.3 Usos medicinales

Según la farmacopea, las hojas y flores de *Dysphania ambrosioides* demostraron tener muy buenas propiedades antihelmínticas sobre ascáridos, oxiuros y anquilostomas, para lo cual es usado principalmente, también se le atribuye acciones carminativas, antipalúdicas, antiinflamatorias, analgésicas y antimicrobianas, además se le atribuye efectos vermífugos y abortivos. El aceite esencial posee actividad antihelmíntica (particularmente contra *Ascaris lumbricoides*),



antibacteriana, antifúngica y entre otras, cabe mencionar a dosis considerables la cual tiene efectos irritantes en la membrana mucosa gastrointestinal ocasionando la muerte en casos de dosis excesiva. Las extracciones acuosas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* adicionalmente tienen actividad antiamebiana y antifúngica (Gadano *et al.*, 2002; Budeguer *et al.*, 2012).

Se tiene documentado que el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* además de ser un agente antibacteriano y antifúngico son alelopáticos y antioxidantes. También se describe como un producto letal para los estadíos larvarios de *Aedes aegypti* y para los agentes etiológicos de enfermedades tropicales (Pereira *et al.*, 2022).

2.2.2 Aceites esenciales

2.2.2.1 Descripción

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO) los aceites esenciales son líquidos concentrados parcialmente hidrofóbicos que poseen compuestos químicos relativamente volátiles. Aparte de que los aceites esenciales son compuestos volátiles también son naturales y complejos, cuya peculiaridad resaltante es el fuerte olor estando constituidos en las plantas aromáticas por metabolitos secundarios. Pueden ser extraídas de diferentes partes de la planta: hojas, semillas, raíces, brotes, flores, cáscaras y frutos, por técnicas de destilación al vapor (el más común), presión (en frío) y otros métodos físicos (Bakkali *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2023).



2.2.2.2 Composición química

Los principales compuestos químicos de los aceites esenciales se sintetizan en el citoplasma y los plastidios de las células vegetales que se originan primordialmente por tres vías biosintéticas: vía del metileritritol fosfato, que conduce a la formación de los mono y diterpenos; la vía del mevalonato, que permite la formación de los sesquiterpenos; y la vía del ácido shikímico que permite producir fenilpropenos (Zheng y Bossier, 2023).

Por lo general, un aceite esencial contiene en promedio de 20 a 60 componentes químicos, y estos últimos son nombrados según la cantidad como: constituyentes principales (20 al 90%); constituyentes secundarios (1 al 20 %); y componentes traza (<1%). Hasta la fecha se han identificado más de 3000 aceites esenciales diferentes, teniendo una gran variedad de estructuras moleculares. Los principales compuestos químicos se clasifican en monoterpenos (p. ej., limoneno, ocimeno), monoterpénos (p. ej., linalool, tujanol), diterpenos (p. ej., fitol, taxadieno), alifáticos (p. ej., neral, citronelal), cumarinas (p. ej., cumarina), aromáticos (p. ej., cinamaldehído), ácidos carboxílicos (p. ej., ácido isovalérico), diterpenos (p. ej., esclareol), ésteres (p. ej., acetato de linalilo), cetonas (p. ej., pulegona), lactonas (p. ej., alantolactona), fenoles (p. ej., carvacrol) y óxidos (p. ej., 1,8-cineol) (Bhavaniramy *et al.*, 2019).

2.2.2.3 Terpenos

Éstos agrupan compuestos químicos con estructura y funciones diferentes estando constituidos por unidades de 5 carbonos llamados



isopreno. La biosíntesis de los terpenos consta de tres etapas: inicia con la síntesis del precursor isopentenil difosfato (IPP) y la adición repetitiva de IPP para formar el precursor de prenildifosfato de los diversos tipos de terpenos, seguido de la modificación del prenildifosfato alílico por sintetasas para formar el esqueleto del terpeno específico y, finalmente, la modificación enzimática secundaria por reacciones de oxidoreducción del esqueleto lo cual le atribuye características funcionales a los diversos terpenos (Eslahi et al., 2018).

Los principales terpenos son: monoterpenos (con dos isoprenos, C10), sesquiterpenos (con tres isoprenos, C15), hemiterpenos (isopreno de C5), diterpenos (con cuatro isoprenos, C20), triterpenos (con seis isoprenos, C30) y tetraterpenos (con ocho isoprenos, C40). Un terpeno que contiene oxígeno o es sustituido su grupo metilo se llama terpenoide, siendo el resultado de modificaciones enzimáticas (Gyawali y Ibrahim, 2014).

2.2.2.3.1 Monoterpenos

Están constituidos por la unión de dos unidades de isopreno (C10). Representan el 90% de los aceites esenciales teniendo una gran diversidad de estructuras moleculares. Poseen una variedad de grupos funcionales y son clasificados en (Degenhardt *et al.*, 2009):

Tabla 2*Tipos de monoterpenos*

Tipo de monoterpeno	Ejemplos
Hidrocarburos	- Acíclicos: o-cimeno, mirceno, etc. - Monocíclicos: terpinenos, p-cimeno, felandrenos, etc. -Bicíclicos: pinenos, -3-careno, canfeno, sabineno, etc.
Aldehídos	- Acíclico: geranial, neral, citronelal, etc.
Ésteres	- Acíclicos: acetato de citronelilo, acetato o propionato de linalilo, etc. - Monocíclicos: acetato de mentilo o a-terpinilo, etc. - Bicíclicos: acetato de isobornilo, etc.
Peróxidos	- Ascaridol, etc.
Alcoholes	- Acíclicos: geraniol, linalol, citronelol, lavandulol y nerol. - Monocíclicos: mentol, α -terpineol, carveol, etc. - Bicíclicos: thuyan-3-ol, borneol, fenchol, chrysanthenol.
Cetonas	- Acíclicas: tegetona, etc - Monocíclicas: piperitona, mentonas, pulegona, carvona, - Bicíclicas: pinocarvona, alcanfor, tuyona, fenchona, pinocanfona, ombelulona, etc
Éteres	- Mentofurano, 1,8-cineol, etc.
Fenoles	- Carvacrol, timol, etc.

Fuente: Adaptado de Degenhardt *et al.* (2009)

Los compuestos bioactivos son ópticamente activos, los dos enantiómeros de éstos están muy a menudo presentes en diferentes aceites esenciales, por ejemplo: (+)- α -pineno de *Pinus palustris*, (-)- β -pineno de *Pinus caribaea* y *Pinus pinaster*, (-) linalol de cilantro, (+)-linalol de



algunos árboles de alcanfor, etc. Existen casos, donde la forma racémica es la que se encuentra con más frecuencia: (\pm)-citronelol está muy extendida, la forma (+) es característica de *Eucalyptus citriodora*, la forma (-) es común a los aceites esenciales de rosa y geranio (Degenhardt *et al.*, 2009).

Los monoterpenos aromáticos incluyen un anillo de benceno, tales como el timol, p-cimeno, alcohol feniletílico y carvacrol siendo componentes frecuentes en numerosos aceites esenciales. Por ejemplo, se encuentran en el aceite de tomillo (*Thymus sp.*), orégano (*Origanum sp.*), ajedrea (*Satureja sp.*) y rosa (*Rosa sp.*) (Hüsni *et al.*, 2007).

a) Monoterpenos acíclicos

Forman una pequeña clase que incluye alcoholes como geraniol, nerol, citronelol, linalol, entre otros, así como trienos (mirceno y ocimeno). Además, el citral es una mezcla natural de los aldehídos geranial y neral. Dentro de este grupo también se encuentra el citronelal, otro aldehído acíclico. Es notable la variación en el esqueleto de 2,6-dimetiloctano (Hüsni *et al.*, 2007).

b) Monoterpenos cíclicos

Se clasifican en tres:

- Monoterpenos monocíclicos

Los monoterpenos de p-mentano son los principales monoterpenos naturales y se originan a partir del esqueleto de 1-metil-4-isopropil-ciclohexano. Los p-mentadienos, derivados del catión α -terpinilo, son



hidrocarburos monoterpenos, mientras que los monoterpenos aromáticos, como el p-cimeno y sus variantes, están siempre acompañados por otros compuestos como α -terpineno y γ -terpineno. Se pueden obtener metabolitos como el p-cimeno-8-ol y el alcohol cumínico a partir del p-cimeno. Además, hay otros derivados oxigenados y aldehídos en esta clase de compuestos (Hüsni *et al.*, 2007).

- **Monoterpenos bicíclicos**

Los monoterpenos oxigenados bicíclicos, como el 1,8-cineol, el 1,4-cineol y el ascaridol, constituyen una categoría importante. Los monoterpenos pinano, tales como el α -pineno y el β -pineno, son comunes en aceites esenciales y resultan de la reorganización intramolecular del catión α -terpinilo. Otro grupo significativo son los monoterpenos del tipo borneano, camfaniano y fencano, que comprenden compuestos como el borneol y el alcanfor y tienen un esqueleto bicíclico. Los monoterpenos del tipo tuyano, que incluyen α -tuyeno y sabineno, son inusuales debido a la presencia de un anillo de ciclopropano. Finalmente, los monoterpenos del tipo carano, como el δ -3-careno, también tienen un anillo de ciclopropano y son comunes en varios aceites esenciales (Hüsni *et al.*, 2007).

- **Monoterpenos tricíclicos**

El triciclono, también conocido como 1,7,7-trimetiltriciclo [2.2.1.0] heptano, ejemplifica una estructura química notable presente con frecuencia en una variedad de aceites esenciales. Su presencia en estos aceites resalta su importancia y versatilidad en la industria de los aromas



y fragancias, donde contribuye a proporcionar una amplia gama de aromas y propiedades terapéuticas (Hüsni *et al.*, 2007).

2.2.2.3.2 Sesquiterpenos

Están constituidos por el ensamblaje de tres unidades de isoprenos (C₁₅). La misma prolongación de la cadena incrementa la posibilidad del número de ciclaciones, resultando en una gran gama de estructuras moleculares. La estructura como el grupo funcional de los sesquiterpenos son semejantes a los monoterpenos. Los ejemplos de plantas medicinales que contienen estos compuestos químicos son alcaravea, angélica, citronela, bergamota, apio, cilantro, enebro, eucalipto, limoncillo, geranio, menta, limón, mandarina, hierba buena, naranja, tomillo, pino, salvia y romero (Degenhardt *et al.*, 2009):

a) Sesquiterpenos acíclicos

El β -farneseno, presente en el aceite de lúpulo y otros, tiene como isómero estructural al α -farneseno. El farnesol, ampliamente distribuido en aceites florales como el de rosa, acacia y ciclamen, es isomérico con el nerolidol, presente en el aceite de neroli y otros. Su isómero E es más común en la naturaleza que el isómero Z (Hüsni *et al.*, 2007).

b) Sesquiterpenos cíclicos

Se clasifican en dos:



- **Los sesquiterpenos monocíclicos**

El α -bisaboleno, está ampliamente distribuido en la naturaleza. Este hidrocarburo sesquiterpénico es un componente común en una variedad de aceites esenciales, incluyendo bergamota, mirra y otros. Sus derivados oxigenados, como el α -bisabolol [6-metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-5-hepten-2-ol] y el β -bisabolol [4-metil-1-(6-metilhept-5-en-2-il)ciclohex-3-enol], se encuentran abundantemente en la manzanilla (Hüsnü *et al.*, 2007).

- **Sesquiterpenos bicíclicos**

El cadineno es un grupo de isómeros presentes en varios aceites esenciales, como el de cubeba, derivado del enebro Cade. Se clasifican como sesquiterpenos tipo naftaleno. Otros componentes incluyen los selinenos, eudesmoles y ciprona, presentes en diversos aceites esenciales. También se encuentra la eremofilona en el aceite de madera de *Eremophila mitchellii*, azulenos responsables del color azul en algunos aceites y vetivanos en el aceite de vetiver. Por último, el guaicol se encuentra en el aceite de madera de guayaco (Hüsnü *et al.*, 2007).



Tabla 3

Tipos de sesquiterpenos

Tipo de sesquiterpeno	Ejemplos
Hidrocarburos	Cadinenos, azuleno, logifoleno, b-bisaboleno, b-cariofileno, curcumenos, elemenos, ingiberenoz, farnesenos, etc.
Alcoholes	Farnesol, bisabol, b-santalol, cedrol, b-nerolidol, viridiflorol, carotol, patchoulol, etc.
Cetonas	Cis-longipinan-2,7-diona, germacrona, turmerones, nootkatona, b-vetinona, etc.
Epóxido	Epóxidos de humuleno, óxido de cariofileno, etc

Fuente: Adaptado de Degenhardt *et al.* (2009)

Figura 1

Clasificación química y estructura química de terpenos y terpenoides

(alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles)

<p>Hidrocarburos (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos)</p>	<p>Alcoholes (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos)</p>
<p>Mirreno p-Cimeno Sabineno</p>	<p>Geraniol Mentol Borneol</p>
<p>Aldehídos (acíclicos)</p>	<p>Cetonas (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos)</p>
<p>Geranial Neral Citronelal</p>	<p>Pulegona Alcanfor</p>
<p>Ésteres (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos)</p>	<p>Éteres</p>
<p>Acetato de citroneli Acetato de mentilo Acetato de isobornilo</p>	<p>Mentofurano 1,8-cineol</p>
<p>Peróxidos</p>	<p>Fenoles</p>
<p>Ascaridol</p>	<p>Carvacrol Timol</p>

Fuente: Adaptado de Degenhardt *et al.* (2009)



2.2.2.3.3 Diterpenos

Se forman mediante la reorganización de cuatro unidades de isopreno y son comunes en resinas, como el ácido pimárico y el ácido abiético. Algunos diterpenoides también se encuentran en aceites esenciales, como el fitol. Debido a su mayor peso molecular, los diterpenos requieren más energía para evaporarse que los monoterpenos y sesquiterpenos, lo que resulta en tiempos de destilación más largos. La DNP identifica 118 tipos estructurales de diterpenoides, algunos de los cuales son importantes en aceites esenciales (Hüsünü *et al.*, 2007).

2.2.2.4 Actividad biológica

Son conocidos por sus acciones antisépticas (es decir con propiedades bactericidas, viricidas, fungicidas), medicinales, aromatizadores, útiles en el embalsamamiento, antimicrobianos, conservación de alimentos, analgésicos, antiinflamatorios, sedantes, anestésicos locales y espasmolíticos. Hasta la fecha estas propiedades no mostraron muchos cambios, sin embargo, hoy se conoce con más detalle algunos de sus mecanismos de acción, particularmente su poder antimicrobiano (Bakkali *et al.*, 2008).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la actividad biológica de los aceites esenciales sobre las estructuras bacterianas, siendo destacables la alteración a nivel de la membrana externa, membrana celular y proteínas de membrana, reducción de la reserva energética del ATP intracelular e inhibición de la detección del quórum (Zheng y Bossier, 2023).



Las bacterias Gram negativas muestran ser más consistentes a la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales que las bacterias Gram positivas debida a las diferencias en la estructura bacteriana. Las bacterias Gram negativas están constituidas por una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una membrana externa, la cual está constituida por lipopolisacárido de carácter hidrofílico, que cumple una función de barrera de permeabilidad selectiva. La membrana externa limita la difusión de compuestos químicos de naturaleza hidrofóbica en los aceites esenciales. Sin embargo, la pared celular de las bacterias Gram-positivas están constituidos aproximadamente de 90 a 95% de peptidoglicano, permitiendo a los compuestos de los aceites esenciales que ingresen y actúen sobre la membrana celular, incrementando la eficacia antimicrobiana (Alizadeh *et al.*, 2019).

Los aceites esenciales que poseen terpenos con grupos funcionales de aldehídos o fenoles (cital carvacrol, timol o eugenol) como sus compuestos principales muestran una mayor actividad antibacteriana, seguido por los que contienen compuestos alcohol terpénicos. Otros aceites esenciales que contienen cetonas o ésteres (β -mirceno, cetato de gerenilo o α -tujona) presentan una actividad mucho más débil, mientras que los aceites esenciales que poseen hidrocarburos terpénicos se caracterizan por ser inactivos. Los aceites esenciales que contienen diferentes componentes terpenoides logran relacionarse de tal manera que reducen o aumentan su eficacia antimicrobiana. Los grupos hidroxilo en los terpenos son los responsables de la acción biológica, las variaciones de la estructura molecular y la posición del grupo hidroxilo en los terpenos



influyendo en la eficacia del compuesto contra los microorganismos (Tariq *et al.*, 2019).

Debido a las interacciones entre los compuestos se pueden generar cuatro posibles efectos: indiferente, aditivo, antagónico o efecto sinérgico. Es decir, cuando los efectos combinados son iguales a la suma de los efectos individuales, se denomina efecto aditivo; si, cuando el efecto de uno o ambos compuestos es menor cuando se aplican juntos que cuando se aplican individualmente se denomina antagonismo; mientras si el efecto combinado de las sustancias es mayor a la suma de los efectos individuales, la observación es denominada como sinergismo; y la ausencia de interacción se llama como indiferencia. La eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales están asociadas a una serie de factores vinculantes como el tipo de microbio a inhibir, los métodos de evaluación entre otros (Faleiro, 2011; Tariq *et al.*, 2019).

2.2.2.5 Métodos de extracción

Se utilizan varios métodos para extraer los aceites esenciales de numerosas plantas, en particular se tiene a la destilación, la extracción con solventes y por microondas sin solventes. Entre todos estos métodos, la destilación al vapor ha sido el más utilizado, particularmente para la producción a escala comercial (Faleiro, 2011).

El método empleado para la extracción determina la calidad de los aceites esenciales, un inadecuado proceso de extracción puede provocar la alteración de los compuestos en los aceites esenciales. Adicionalmente se debe considerar la temperatura, el tiempo de extracción, el número de



extracciones repetidas de la muestra y la elección de los solventes de extracción las cuales son condiciones cruciales para el rendimiento de la extracción (Ribeiro y Simões, 2019).

a. Destilación

- **La destilación al vapor:** es una forma más empleada para la extracción de los aceites esenciales en vegetales. En esta técnica se emplea el calor, y el vapor que pasa sobre el material vegetal. El vapor caliente permite liberar compuestos aromáticos que se evaporan, los que luego pasan a través de un sistema de enfriamiento para condensar el vapor, generando un líquido a partir del cual se separan el agua y el aceite esencial. En este método, el vapor del agua hirviendo pasa a través del vegetal por una a muchas horas, permitiendo obtener la mayoría de sus compuestos fragantes volátiles (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).
- **Hidrodifusión.** Es un tipo de destilación de vapor, que solamente varía la forma de vapor de entrada, la cual ocurre hacia abajo. Esta técnica se usa particularmente cuando el material vegetal ha sido secado y no este dañado a temperatura de ebullición (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).
- **Hidrodestilación:** Se basa en los mismos principios que la destilación de vapor, generalmente se aplica para aislar compuestos no solubles en el agua y tienen un mayor punto de ebullición. Este proceso, se diferencia porque el material vegetal



se sumerge directamente en el agua hirviendo, el cual protege a los aceites extraídos hasta un cierto punto ya que el agua envolvente actúa como un impedimento para evitar que se sobrecaliente (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

b. Extracción con solventes

- **Extracción con solventes orgánicos:** Este método es aplicado principalmente en vegetales frágiles o delicados, intolerantes al calor. Se emplean diferentes solventes para la extracción (etanol, metanol, acetona o hexano). Durante este proceso, el solvente se mezcla con el vegetal, seguido de calentamiento y filtración. Posteriormente, el filtrado se somete a la ebullición del solvente, que luego se junta con alcohol puro para la extracción del aceite esencial y se destila a una baja temperatura. Posteriormente, el alcohol con la fragancia se evapora y el aceite aromático permanece (Ribeiro y Simões, 2019).
- **Dióxido de carbono supercrítico:** La extracción por fluidos supercríticos se basa en el uso de fluidos supercríticos, que por encima de su punto crítico presentan propiedades de líquido y de gas. El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más utilizado, ya que es inodoro, altamente puro, seguro, rentable, no tóxico, no inflamable y reciclable que permite una operación supercrítica a presiones relativamente bajas y temperatura ambiente cercana. En consecuencia, en condiciones de alta presión, el CO₂ se convierte en líquido que se usa como medio inerte y seguro para extraer los



compuestos del material vegetal. Durante el procedimiento de extracción, la baja viscosidad del CO₂ le permite penetrar la matriz para alcanzar el material vegetal que se extrae. Posteriormente, el bajo calor latente de evaporación y la alta volatilidad del CO₂ permiten su fácil eliminación sin dejar un residuo de solvente en el producto final (Da Silva et al., 2021).

c. Extracción por microondas sin solventes

Los métodos utilizados convencionalmente para la extracción, como la destilación al vapor, la hidrodestilación o la extracción con solventes, tienen varios inconvenientes, como el tiempo de extracción largo, cambios químicos en los compuestos de aceite esencial debido a las altas temperaturas, la pérdida de compuestos volátiles y los residuos de solvente tóxico en el producto constituyendo algunas de las desventajas de los métodos convencionales. La extracción por microondas sin solventes es una técnica de extracción rápida para los aceites esenciales de hierbas aromáticas frescas, especias y semillas secas que presentan numerosos beneficios, los que incluyen un tiempo de extracción corto, mayor rendimiento, selectividad y es ecológico. Esta técnica combina el calentamiento de microondas con destilación seca, realizada a presión atmosférica (Ribeiro y Simões, 2019).

Finalmente, se han probado técnicas alternativas para la extracción de aceites esenciales, como la extracción asistida por microondas, la extracción asistida por ultrasonido y la hidrodestilación óhmica, cuyo



objetivo es mejorar la eficiencia, la sostenibilidad y la economía en el proceso de extracción (Da Silva et al., 2021).

2.2.3 Resistencia antibiótica

2.2.3.1 Definición

Se denomina generalmente al rasgo adquirido por bacterias que antes fueron susceptibles, lo cual es atribuido a la adquisición horizontal de nuevos genes o por mutaciones espontáneas en genes localizados dentro del cromosoma que luego es transmitida verticalmente en cada división bacteriana (Cox y Wright, 2013)

Convencionalmente, la resistencia a los antibióticos se ha clasificado en las bacterias como resistentes o susceptibles frente a la posibilidad de curar las infecciones que producen. Sin embargo, desde el punto de vista clínico se define, a un microorganismo susceptible por el nivel de actividad antimicrobiana con alta probabilidad de tener éxito el tratamiento terapéutico, y un microorganismo resistente por el nivel de actividad antimicrobiana con alta probabilidad de fracaso terapéutico (Martinez, 2014).

2.2.3.2 Origen

A. Resistencia natural

La resistencia natural puede darse de dos formas, por un lado, se tiene a la resistencia intrínseca que siempre se expresa en la bacteria, y por otro lado se tiene a la resistencia inducida, en donde si bien los genes se encuentran presentes naturalmente en la bacteria, pero éstos solo se



expresan a niveles de resistencia luego de la exposición a un antibiótico. Asimismo, la resistencia intrínseca podría ser definida como una característica compartida universalmente dentro de una especie bacteriana, que es autónomo de la exposición previa a los antibióticos y no se relaciona con la transferencia horizontal de genes. Los mecanismos de la resistencia intrínseca bacteriana que están involucradas más comúnmente son la baja permeabilidad de la membrana externa, en específico por el lipopolisacárido (LPS) y la acción natural de las bombas de eflujo (Cox y Wright, 2013).

B. Resistencia adquirida

La resistencia por adquisición del material genético, es posible a través de estas principales vías: transformación, transducción y conjugación; que forman parte de la transferencia horizontal de genes; en otros casos, la bacteria puede sufrir mutaciones en el ADN cromosómico. Esta adquisición de material genético puede ser de manera temporal o permanente. La transmisión por conjugación de los genes de resistencia en plásmidos es la vía más común para adquirir el material genético externo; La adquisición por medio de bacteriófagos es sumamente rara. En ciertas bacterias se da por transducción como en *Acinetobacter* spp. que son capaces de obtener material genético directamente de su entorno exterior. Cabe señalar, que existe traslado de material genético al interior de la bacteria de las secuencias de inserción y las integrinas. Las bacterias sometidas a factores estresantes como inanición, radiación ultravioleta, productos químicos, etc. causan mutaciones genéticas (eliminaciones, sustituciones, etc.). Las mutaciones generan resistencia a los



antimicrobianos las cuales están en genes que codifican dianas, transportadores, reguladores que controlan los transportadores de los fármacos y los que codifican las enzimas modificadoras de antibióticos (Reygaert, 2018).

2.2.3.3 Mecanismos de resistencia

A. Limitaciones para la absorción de drogas

Existe un mecanismo natural con capacidad de limitar la absorción de antibióticos en las bacterias. El lipopolisacárido de bacterias Gram negativas crea un impedimento para algunas moléculas y les confiere una resistencia natural. La membrana externa de las micobacterias poseen alto contenido de lípidos, que permite a los antibióticos hidrofóbicos tener un acceso más fácil a la célula para la rifampicina y las fluoroquinolonas, a diferencia de los antibióticos hidrofílicos que tienen un acceso limitado (Reygaert, 2018).

B. Modificación de la molécula diana

Las variaciones naturales o los cambios adquiridos en las dianas impiden la unión de los antibióticos, actuando como un mecanismo común de resistencia. A menudo es por mutación espontánea de un gen bacteriano en el cromosoma. La interrelación del antibiótico con la diana es bastante específico, una pequeña alteración de la diana tiene un efecto importante en la unión del antibiótico. Estas alteraciones se dan a diferentes niveles de la estructura bacteriana:



- **Alteraciones en la subunidad 30S o subunidad 50S:** conducen a la resistencia de los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, es decir, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol y tetraciclina. Los aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S, mientras que el cloranfenicol, los macrólidos, las lincosamidas y la estreptogramina B se unen a la subunidad 50S (Tenover, 2006).
- **Alteración de la PBP:** es un mecanismo importante de resistencia en bacterias Gram positivas, mientras que la producción de β -lactamasas es un mecanismo relevante en bacterias Gram negativas. La mutación en la proteína de unión a penicilina (PBP) conduce a una poca afinidad a los β -lactámicos. La resistencia antibiótica de *Enterococcus faecium* a la ampicilina y de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina se da por este mecanismo. En *Staphylococcus aureus* la resistencia a la meticilina y la oxacilina está asociada a la integración de un elemento genético móvil (cromosoma mec del casete estafilocócico), donde el cromosoma de *Staphylococcus aureus* que contiene el gen mecA codifica a la proteína PBP2a, una nueva proteína de unión a la penicilina que muestra una alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistentes pueden presentar resistencia cruzada a todos los antibióticos betalactámicos, estreptomycin y tetraciclina hasta a la eritromicina (Alekhun y Levy, 2007).
- **Precursos alterados de la pared celular:** la síntesis de los precursores de la pared celular en bacterias Gram-positivas que



puede ser inhibida por glucopéptidos (vancomicina o teicoplanina) por medio de una cohesión a los residuos de D-alanil-D-alanina que son los precursores de peptidoglucano. La D-alanil-alanina se convierte en D-alanil-lactato inhibiendo a los glicopéptidos los que no se entrecruzan con ellos. *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* tienen una mayor resistencia como a la vancomicina y la teicoplanina (resistencia de tipo Van A). La resistencia de tipo Van B y Van C las hace resistentes a la vancomicina, pero sensible a la teicoplanina (Giedraitiene *et al.*, 2011).

- **La ADN girasa y topoisomerasa IV mutados:** las quinolonas se unen a la subunidad A de la girasa. El mecanismo de resistencia implica el cambio de dos enzimas: como el ADN girasa que es (codificada por los genes *gyr A* y *gyr B*) y la topoisomerasa IV (codificada por los genes *par C* y *par E*). Las mutaciones en los genes *gyr A* y *par C* conllevan a la falla de la replicación y, como resultado, las fluoroquinolonas no pueden unirse (Giedraitiene *et al.*, 2011).
- **Mecanismos de protección ribosómica:** confieren resistencia a las tetraciclinas.
- **Mutaciones de la ARN polimerasa:** confieren resistencia a la rifampicina.

C. Inactivación de antibióticos

Hay tres tipos de enzimas principales que inactivan los antibióticos: β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y cloranfenicol acetiltransferasas (Kapoo y Saigal, 2017).

- **β -lactamasas**

Las β -lactamasas hidrolizan casi todos los β -lactámicos que poseen un enlace éster y amida (penicilinas, monobactámicos, cefalosporinas y carbapenémicos). A la actualidad se identificaron más de 300 β -lactamasas. La clasificación de las β -lactamasas es por dos sistemas principales: Bush-Jacoby-Medeiros (funcional) y Ambler (estructural). Según el sistema de clasificación de Ambler se tiene (Kapoor y Saigal, 2017):

- **β -lactamasas de clase A (penicilinasas):** son sensibles al ácido clavulánico. Dos tipos se encuentran comúnmente en miembros de la Familia Enterobacteriaceae que son designados como TEM-1, SHV-1. Estas penicilinasas poseen ninguna o poca actividad contra las cefalosporinas. Estos son progenitores de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Los ESBL que son enzimas que cambian el perfil del sustrato debido a la sustitución de aminoácidos que permite la hidrólisis de la mayoría de las cefalosporinas. Las BLEE son resistentes a penicilinas, cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, aztreonam, cefoperazona, cefamandol, pero son sensibles a metoxicefalosporinas (cefamicinas) y carbapenémicos, siendo inhibidas por inhibidores de β -lactamasas (sulbactam, ácido clavulánico o tazobactam) (Kapoor y Saigal, 2017).

- **β -lactamasas de clase B (metalo- β -lactamasas):** Estas enzimas necesitan del zinc o metales pesados para la catálisis siendo su actividad inhibida por agentes quelantes. Estas enzimas son consistentes a la



inactivación por el clavulanato, sulbactam, aztreonam y carbapenémicos. Por ejemplo, metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (Kapoor y Saigal, 2017).

- **β -lactamasas de clase C (cefalosporinas):** Estos son producidos por todas las bacterias Gram-negativas con excepción de Salmonella y Klebsiella. La clase C hidrolizan las cefalosporinas, incluidas las cefalosporinas de espectro extendido, en comparación con las β -lactamasas de clase A; estas tienen grandes cavidades y, como resultado, pueden unirse a la voluminosa penicilina de espectro extendido. Un ejemplo de este tipo son las β -lactamasas Amp C. Esta clase de enzimas es resistente a todos los betalactámicos excepto a los carbapenémicos y no son inhibidos por el ácido clavulánico (Kapoor y Saigal, 2017).

- **β -lactamasas de clase D:** hidrolizan la oxacilina, se encuentran normalmente más en Enterobacteriaceae y en *Pseudomonas aeruginosa*. Estas enzimas confieren resistencia a la penicilina, cloxacilina, oxacilina y meticilina. Son inhibidos débilmente por el ácido clavulánico, pero son inhibidos por el cloruro de sodio (Kapoor y Saigal, 2017).

- **Enzimas modificadoras de aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos pueden ser modificados por enzimas específicas tales como fosforiltransferasas, adenililtransferasas o nucleotidiltransferasas. El resultado es la reducción de la afinidad a la subunidad ribosomal 30S, confiriendo un espectro extendido de resistencia a aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Estas enzimas modificadoras de aminoglucósidos han sido identificados en cepas de *Staphylococcus*



aureus, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae* (Kapoor y Saigal, 2017).

- **Cloranfenicol acetiltransferasas**

Algunas bacterias grampositivas como gramnegativas y cepas de *Haemophilus influenzae* son resistentes al cloranfenicol y tienen una enzima cloranfenicol transacetilasa que modifica químicamente los grupos hidroxilo del cloranfenicol. El cloranfenicol modificado no puede unirse correctamente a la subunidad ribosomal 50S (Kapoor y Saigal, 2017).

D. Bombas de expulsión (eflujo)

Las proteínas situadas en la membrana celular (transportadores) que expulsan antibióticos del interior al exterior de la célula manteniendo las concentraciones bajas, se denominan bombas de eflujo. Las proteínas que constituyen las bombas de eflujo difieren de las porinas ubicadas de la membrana externa. Todas las clases de antibióticos, a excepción de la polimixina, son afectados por los sistemas de eflujo. Los tipos de bombas de eflujo pueden ser específicas para determinados antibióticos (Džidić *et al.*, 2008).

E. Transportadores ABC, MATE, SMR, RND y MFS

- **Familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette)**

Estos sistemas de transporte son para la captación y eflujo. Los transportadores de esta familia utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP para transportar diversos sustratos a través de las membranas, como polisacáridos, aminoácidos, iones, fármacos, proteínas y azúcares. Estos



transportadores ABC generalmente están constituidos por seis segmentos transmembrana con estructura de hélices α , funcionan en la membrana en pares, ya sea como homodímeros o heterodímeros, y trabajan en conjunto con ATPasas de citoplasma. Estos transportadores tienen sustratos bastante específicos y en bacterias de importancia clínica se encuentra muy poco. Un transportador ABC bien conocido identificado en *Vibrio cholerae* (VcaM) sería capaz de bombear fluoroquinolonas y tetraciclinas (Lubelski *et al.*, 2007).

- **Familia de transportadores MATE (multidrug and toxic compound extrusión)**

Obtienen energía a través del gradiente de Na^+ ; que permite transportar colorantes catiónicos, la mayoría de las fluoroquinolonas y algunos aminoglucósidos. Estos transportadores están constituidos por doce segmentos transmembrana. Se encuentran mayormente en bacterias Gram negativas y muy pocos de estos se han localizado en bacterias Gram positivas. El transportador NorM codificado por el ADN cromosómico del *Vibrio parahaemolyticus* fue el primero en identificarse. Otras especies bacterias de importancia clínica que poseen estas bombas NorM incluyen a *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Kuroda y Tsuchiya, 2009).

- **La familia de transportadores SMR (small multidrug resistance)**

Emplea la fuerza motriz gradiente del ion protón (H^+), tiene carácter hidrofóbico y principalmente transporta cationes lipofílicos, presentando un rango de sustratos muy reducido. Son codificados por



genes presentes en el ADN cromosómico, plásmidos y elementos transponibles. Estos transportadores están constituidos por cuatro segmentos transmembrana y funcionan como homotetrámeros asimétricos. Transportan muy pocos antibióticos, confiriendo resistencia a los β -lactámicos y algunos aminoglucósidos en algunos casos. Estos transportadores se observan en *Staphylococcus epidermidis* (transporta eritromicina, ampicilina y tetraciclina) y *Escherichia coli* (transporta eritromicina, vancomicina y tetraciclina) (Bay *et al.*, 2008).

- **Familia de transportadores RND (resistance-nodulation-cell division)**

Transportan por un mecanismo antiport sustrato/H⁺ el cual está presente en la mayoría de bacterias Gram negativas. Efluyen antibióticos (todos transportadores de múltiples fármacos), solventes, detergentes, metales pesados, tintes y muchos otros sustratos. Existen bombas específicas para un antibiótico o para una clase de antibióticos, como la bomba Tet (tetraciclina) y bomba Mef (macrólidos). Otras bombas RND transportan una amplia gama de antibióticos, como en *Pseudomonas aeruginosa*, asimismo la bomba MexAB-OprM confiere resistencia intrínseca a los β -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprima/sulfametoxazol y algunas fluoroquinolonas (Kourtesi *et al.*, 2013; Munita y Arias, 2016).

Son bombas con multicomponentes complejos frecuentemente conformado por doce segmentos transmembrana (TMS) y con dos grandes asas periplásmicos entre TMS 1 y 2, y TMS 7 y 8. Estas bombas funcionan

conectándose a una porina de la membrana externa, y estos comparten un alto grado de homología entre los miembros de la familia RND. Los genes que los codifica se organizan como un operón. La bomba AcrAB-TolC de *Escherichia coli* probablemente sea la bomba RND más estudiada, conferieren resistencia a cloranfenicol, penicilinas, macrólidos, tetraciclina y fluoroquinolonas (Kourtesi *et al.*, 2013; Munita y Arias, 2016).

- **Familia de transportadores MFS (major facilitator superfamily)**

Transporta por un mecanismo llamado simport de soluto/catión (H⁺ o Na⁺) o del antiport de soluto/H⁺. Viabilizan aniones, antibióticos (ejemplo: macrólidos y tetraciclina), metabolitos (sales biliares, etc) y azúcares. Las bombas MFS pueden transportan gran diversidad de sustratos como grupos, pero particularmente tienden a ser específicas del sustrato. Los ejemplos de bombas MFS con especificidad de sustrato se encuentran en *Acinetobacter baumannii* que tienen separadas las bombas para eritromicina (SmvA), cloranfenicol (CraA y CmlA), y *Escherichia coli* con bombas MFS para fluoroquinolonas (QepA), macrólidos (MefB) y trimetoprima (Fsr). Existen bombas MFS con poca especificidad al sustrato como la bomba NorA de *Staphylococcus aureus* que efluye fluoroquinolonas y cloranfenicol (estos dos antibióticos son los más comúnmente transportados por las bombas MFS) o la bomba LmrS que efluye eritromicina, linezolid, trimetoprima y cloranfenicol. Estas bombas están compuestas de doce o catorce TMS, la mayoría codificados por cromosomas bacterianos, y cabe mencionar que casi el 50 % de



transportadores de eflujo en *Escherichia coli* son bombas MFS (Kourtesi *et al.*, 2013; Uddin *et al.*, 2021).

2.2.4 Microorganismos

2.2.4.1 Definición

Los microorganismos o microbios son organismos microscópicos que existen como formas unicelulares, multicelulares o agrupaciones celulares. Los microorganismos están bien distribuidos en la naturaleza y gran parte son beneficiosos para la vida, pero algunos pueden causar graves daños al ser humano. Los microorganismos se pueden dividir en cinco tipos principales: protozoarios, bacterias, hongos, arqueas, y virus. Los microbios son ubicuos en la biosfera, y su presencia invariablemente afecta el entorno en el que crecen (Kazi Madina Maraz y Ruhul Amin Khan, 2021).

2.2.4.2 Tipos de microorganismos

A. Microorganismos patógenos

Es un microorganismo patógeno como (virus, rickettsia, bacteria, hongo, protozooario) capaz de causar infección o una enfermedad infecciosa, son portadores de antígenos capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria.

B. Microorganismos no patógenos

Son microorganismos que intervienen en procesos ecológicos permitiendo funcionar los ecosistemas. Son los principales encargados de

desintegrar de la materia orgánica y de los ciclos biogeoquímicos (fósforo, carbono, azufre, nitrógeno, etc.). Por ejemplo, en el reciclaje y fijación del nitrógeno participan tanto bacterias simbióticas como *Rhizobium* y *Frankia*, o bacterias de vida libre como *Azotobacter*, *Thiobacillus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, incluidas las cianobacterias: *Nostoc* y *Anabaena* (Montaño *et al.*, 2010).

2.2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A. Morfología

Son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos (forma de bastón) aproximadamente de 0.5-1 μm de diámetro y 1.5-5 μm de largo, generalmente son móviles debido a sus flagelos lofótricos (Peix *et al.*, 2009).

B. Taxonomía

La clasificación taxonómica de este microorganismo es:

Tabla 4

Clasificación taxonómica de Pseudomonas aeruginosa

Categoría taxonómica	Descripción
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter, 1872)

Fuente: Schoch *et al.* (2020)



C. Metabolismo

Son bacilos Gram negativos no fermentadores de lactosa y glucosa, aerobios estrictos, catalasa y oxidasa positivos, utilizan carbohidratos para obtener energía a través de la oxidación que es una vía metabólica diferente a la fermentación, tienen capacidad de emplear acetato y amoníaco como fuentes de carbono y nitrógeno, muestran un crecimiento abundante a las 24 horas sobre la superficie aerobia del agar hierro de Kligler o agar triple azúcar-hierro (TSI), pero en ninguno de ellos se utiliza la glucosa presente en el fondo del tubo y por lo tanto no existe acidificación de esta zona. En el metabolismo respiratorio el oxígeno es el aceptor final de electrones; sin embargo, en ocasiones utilizan el nitrato como aceptor final de electrones de esta forma permite el crecimiento en anaerobiosis (Martínez Hernández, 2010).

Puede crecer a 20 y 43°C, y el crecimiento a las altas temperaturas diferencia al resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se considera como bacteria aerobia facultativa por la capacidad de crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como aceptores de protones (Paz-Zarza et al., 2019).

D. Patogenia

Pseudomonas aeruginosa produce infecciones graves en personas con quemaduras, heridas traumáticas, heridas quirúrgicas, sondas en las vías urinarias; con padecimientos en enfermedades en los sistemas hematopoyético, retículo endotelial y linfático, y en quienes tienden a tener problemas en la respuesta inmunológica (humoral o celular). Se ha



reportado que pacientes hospitalizados y con fibrosis quística padecen infecciones pulmonares con este microorganismo (Martínez Hernández, 2010).

La patogenia es desencadenada por una serie de factores como la producción de elastasas y proteasas (proteasa IV y proteasa alcalina), enzimas que tienen la capacidad de destituir diversas proteínas inmunoregulatoras, proteínas surfactantes A y D, inmunoglobulinas, el suplemento y péptidos antibacterianos. Los efectos patológicos de *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto respiratorio son bastante estudiados; pero también causan infecciones corneales y queratitis (por acción de la proteasa alcalina y proteasa IV) (Driscoll *et al.*, 2007).

El flagelo de *Pseudomonas aeruginosa* posee la proteína flagelar FliD, que permite a la bacteria tener la suficiente capacidad para adherirse a la mucosa de las vías respiratorias. Además, de los factores de virulencia secretados, esta bacteria es capaz de producir una cápsula extracelular de alginato, que es un polímero lineal de dos monómeros alternantes (ácido manurónico y ácido glucurónico), constituyendo parte de la biopelícula secretada por la bacteria, confiriéndole un mecanismo de evasión a los anticuerpos y de fagocitosis por las células inmunológicas (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

E. Epidemiología

Particularmente *Pseudomonas aeruginosa* es ubicua en el ambiente hospitalario, localizándose particularmente en cualquier zona que exista humedad, inclusive en equipos médicos, soluciones desinfectantes y



jabones; que pueden llegar a persistir de manera eficiente en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Las personas sanas tienen una tasa de colonización baja, sin embargo, en los pacientes hospitalizados la tasa se incrementa proporcionalmente al tiempo de hospitalización (Martínez Hernández, 2010).

La capacidad de continuar en condiciones ambientales adversas y los mecanismos de patogenicidad la han convertido a *Pseudomonas aeruginosa* en el principal responsable de las infecciones nosocomiales adquiridas en hospitales a nivel mundial (10 a 15%).

De todas las infecciones a nivel mundial ocupa el quinto lugar, constituyendo la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto lugar en infecciones de zonas quirúrgicas y el séptimo lugar como responsable de sepsis.

F. Multidrogoresistencia

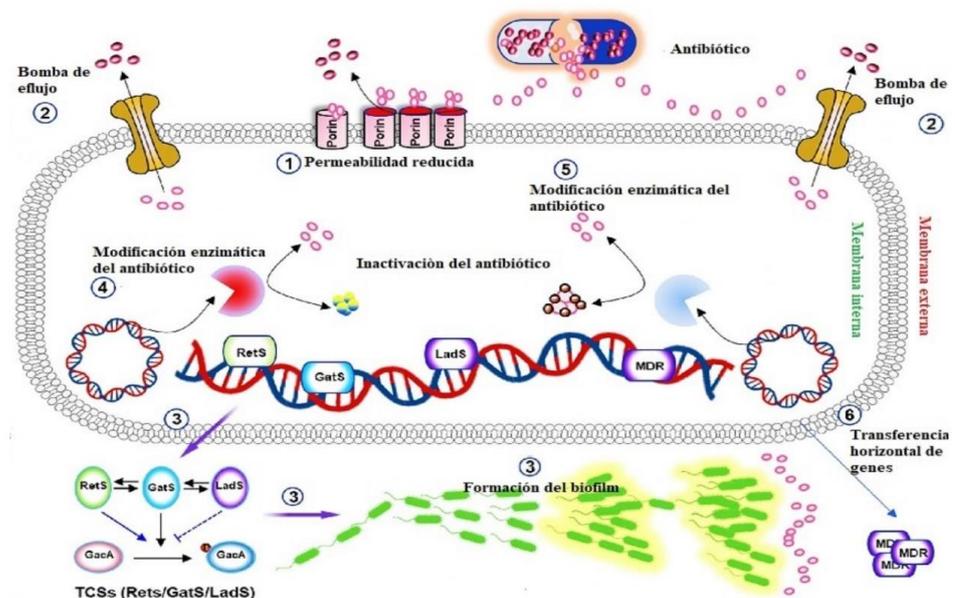
En Asia, aproximadamente el 42.8% de las neumonías nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* son multidrogoresistentes y 4.9% ultrasensibles (Ding *et al.*, 2016). En un estudio de urocultivos realizado durante ocho años en búsqueda de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital encontraron que el 32% eran multidrogoresistentes, mientras al ser considerados todos los tipos de cultivo (hemocultivo, urocultivo etc.), el 22% resultó ser multiresistente (Paz-Zarza *et al.*, 2019).

La resistencia a los antibióticos en *Pseudomonas aeruginosa* se debe principalmente a una combinación de mecanismos intrínsecos y

adquiridos, que incluyen la formación de bacterias resistentes y multirresistentes a través del biofilm. Como resultado, esta bacteria puede desarrollar resistencia rápidamente a varios tipos de antibióticos, como quinolonas, aminoglicósidos y β -lactámicos.

Figura 2

Mecanismos de resistencia antibacteriana en Pseudomonas aeruginosa



Nota: Se pueden dividir en resistencia intrínseca a los antibióticos (1) permeabilidad de la membrana externa, (2) sistemas de eflujo y (4) enzimas modificadoras de antibióticos o (5) enzimas inactivadoras de antibióticos), resistencia adquirida a los antibióticos (6) resistencia por mutaciones y adquisición de genes de resistencia) y resistencia adaptativa a los antibióticos (3) resistencia mediada por biopelículas).

Fuente: Adaptado de Qin *et al.* (2022).

a. Resistencia a betalactámicos

- Resistencia a carbapenémicos

Las mutaciones específicas en las porinas OprD, afectan sus características conformacionales, representando un desafío significativo

para las prácticas de tratamiento médico. La presencia de bombas de eflujo MexAB-OprM es crucial para el desarrollo de la resistencia (Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 1995)

- **Resistencia a cefalosporinas, aztreonam y penicilinas**

Pseudomonas aeruginosa exhibe una alta resistencia al producir β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Además, esta bacteria también muestra resistencia a la terapia de combinación cefazolina-tazobactam mediante la BLEE GES-6. Una vez más, las BLEE de *Pseudomonas aeruginosa* se consideran el mecanismo más significativo para contrarrestar los antibióticos. Las porinas de eflujo OprM, OprN y OprJ contribuyen activamente al eflujo de varios antibióticos β -lactámicos (Poirel *et al.*, 2019) .

Las mutaciones en el gen de la β -lactamasa ampC representa un punto crucial en el aumento significativo de la resistencia a las cefalosporinas. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, su resistencia está estrechamente ligada a la actividad de eflujo mediada por MexXY-OprM (Berrazeg *et al.*, 2015).

b. Resistencia a fluoroquinolonas

Las mutaciones en la girasa del ADN (GyrA) provocan resistencia a los antibióticos quinolónicos. La sobreexpresión de MexCD-OprJ está estrechamente relacionada con un aumento en la resistencia de la mayor parte de las cepas clínicas a ciprofloxacino, cefepima y cloranfenicol. Las quinolonas MexEF-OprN se sobreproducen debido a la deficiencia en el QS por la extrusión de cianurenina. Además, la resistencia de

Pseudomonas aeruginosa a aminoglicósidos, fluoroquinolonas y cefalosporinas depende de la función de las bombas de eflujo como MexXY-OprM (Llanes *et al.*, 2011).

c. Resistencia a aminoglucósidos

Desde una perspectiva enzimática, *Pseudomonas aeruginosa* tiene la capacidad de modificar los grupos amino y glicosídicos de los antibióticos aminoglucósidos para desarrollar resistencia antibiótica. Las enzimas conocidas por realizar estas modificaciones utilizan tres mecanismos comunes: fosfotransferasa de aminoglucósidos (APH), acetiltransferasa de aminoglucósidos (AAC) y nucleotidiltransferasa de aminoglucósidos (ANT). La APH puede inactivar la estreptomicina al transferir el grupo fosfato al grupo hidroxilo 3' de los aminoglucósidos. La AAC puede provocar resistencia al antibiótico gentamicina al transferir el grupo acetilo al grupo amino en las posiciones 3' y 6' del aminoglucósido. Por otro lado, la ANT confiere resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la amikacina mediante la transferencia de grupos adenosina a los grupos amino o hidroxilo de estos aminoglucósidos (Guénard *et al.*, 2014).

2.2.4.4 *Staphylococcus aureus*

A. Morfología

Staphylococcus aureus, proviene del latín “*aurum*” por el pigmento dorado. Microscópicamente esta bacteria es un coco Gram positivo con un diámetro de 0.5-1.5 μm y su disposición más característica es agrupado en racimos de uva, aunque también suele observarse en parejas, tétradas o en cadenas cortas, y no forman esporas (Pasachova *et al.*, 2019).

B. Taxonomía

La clasificación del sistema taxonómico se presenta de la siguiente manera:

Tabla 5

Clasificación taxonómica de Staphylococcus aureus

Categoría taxonómica	Descripción
Dominio	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i> (Rosenbach, 1884)

Fuente: Schoch *et al.* (2020)

C. Metabolismo

Las especies del género *Staphylococcus* son bacterias poco exigentes, catalasas positivas, capaces de crecer en una gran diversidad de condiciones ambientales. Pueden ser resistentes a los desinfectantes químicos, a la desecación y toleran alta concentraciones de cloruro de sodio hasta de 12%. *Staphylococcus aureus* crece con facilidad en los medios de cultivo sólidos no selectivos formando a las 24 horas colonias de 1–3 mm de diámetro. Generalmente, presentan una pigmentación dorada y en la mayoría de las cepas puede observarse betahemólisis en el agar sangre a las 24-36 horas de incubación. El agar manitol salado es el medio selectivo para el aislamiento de estafilococos, el cual posee agentes



inhibidores que permiten el crecimiento de diferentes especies de *Staphylococcus*; siendo las colonias de *Staphylococcus aureus* ALGO típicas por el color amarillo debido a la fermentación del manitol, mientras que las otras especies de *Staphylococcus* son colonias de color rojo (Fernández Álvarez y Potel Alvarellos, 2017).

D. Patogenia

La colonización por *Staphylococcus aureus* es inofensiva, como también es un factor de riesgo para el crecimiento de infecciones ulteriores a menudo provocadas por la misma cepa colonizadora, que pueden ser desde infecciones leves de la piel y tejidos blandos hasta infecciones invasivas graves como: bacteriemia o septicemia, osteomielitis, neumonía, artritis séptica y endocarditis. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* según las manifestaciones clínicas pueden ser: agudas, crónicas, recurrentes o persistentes (Howden *et al.*, 2023).

Staphylococcus aureus presenta ciertos factores de virulencia donde se puede destacar la presencia de polisacáridos capsulares, la formación de biopelículas, componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva entre las cuales se encuentran proteínas de unión al fibrinógeno (factor clumping), las proteínas de unión a la fibronectina y las toxinas (α y β) (Pasachova *et al.*, 2019).

E. Epidemiología

Staphylococcus aureus es un colonizador y un patógeno bacteriano oportunista frecuente de la población humana, que causa una gran



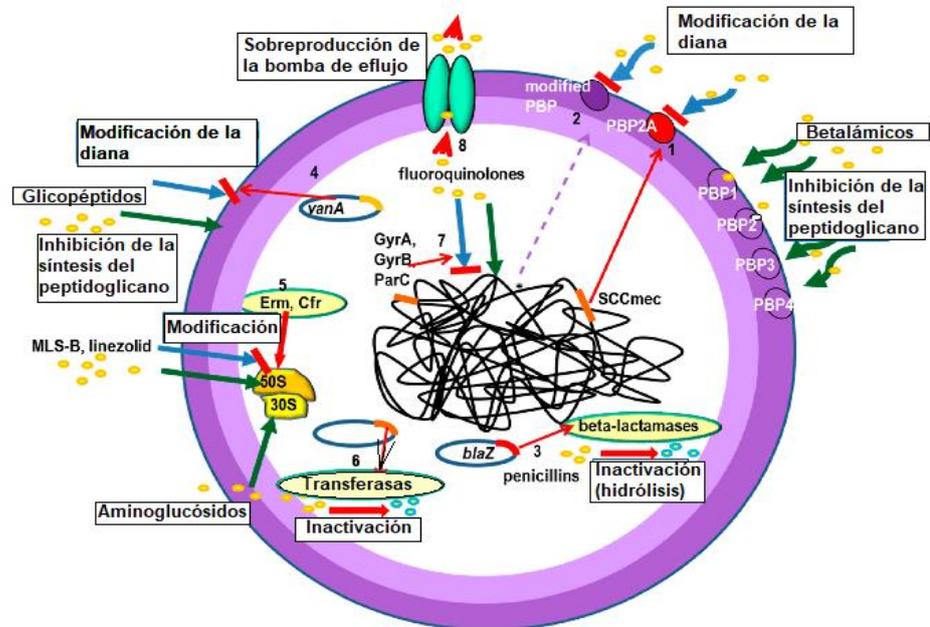
morbimortalidad a nivel mundial. La bacteria *Staphylococcus aureus* tiene una larga historia evolutiva como patógeno oportunista multihuésped, en los seres humanos de manera persistente colonizan aproximadamente el 20 al 30% de la nariz y también con frecuencia coloniza otros sitios como la piel, las axilas, la garganta, el intestino y la ingle. La interacción entre *Staphylococcus aureus* y el microbiota del huésped se está investigando con mayor profundidad y complejidad, destacando las funciones de los otros comensales para su colonización. Se ha caracterizado a *Staphylococcus aureus* como fundamental causante de bacteriemia nosocomial en Norteamérica y Latinoamérica, y en Europa como la segunda causa de bacteriemia en hospitales (Howden *et al.*, 2023).

F. Multidrogoresistencia y mecanismo de resistencia

Para considerar a *Staphylococcus aureus* como multidrogoresistente (MDR) deben cumplir uno o más de estos criterios: todo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) no es sensible a ≥ 1 antibiótico en ≥ 3 categorías antimicrobianas.

Figura 3

Principales mecanismos de resistencia antibacteriano en *Staphylococcus aureus*



Nota: antibióticos: en amarillo, mecanismos de acción: flechas verdes. **Resistencia a los betalactámicos:** 1. Producción de la proteína PBP2A fijadora de penicilina, 2. * mutaciones en los genes PBP: raras (MODSA), 3. Producción de betalactamasas, generalmente de espectro de sustrato estrecho. **Resistencia a glicopéptidos:** 4. operón VanA (modificación del sitio de unión del antibiótico), **Resistencia a linezolid:** 5. Adenilil-N-metiltransferasa Cfr-modificación 23S rRNA del ribosoma bacteriano. **Resistencia a MLS-B** (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B): 5. Erm: metilación del ribosoma de eritromicina. **Resistencia a aminoglucósidos:** 6. Inactivación de antibióticos por transferasas. **Resistencia a las fluoroquinolonas:** 7. mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* (topoisomerasa II) y *parC* (*gla*) y *parE* (topoisomerasa IV) (modificación del sitio de unión del antibiótico), 8. eliminación de la célula bacteriana mediante la bomba de eflujo.

Fuente: Adaptado de Mlynarczyk *et al.* (2022).

a. Resistencia a los antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos actúan en enzimas claves que están implicados en la síntesis del peptidoglicano, que es un elemento esencial de la pared celular bacteriana. Estos antibióticos inactivan proteínas

conocidas como PBPs (proteínas de unión a la penicilina), lo que resulta en la muerte de las bacterias. Sin embargo, se han identificado varios mecanismos de resistencia a estos antibióticos en *Staphylococcus aureus*, como la síntesis de una nueva PBP adicional llamada PBP2A, la producción de betalactamasas y mutaciones en los genes de las PBPs (Mlynarczyk-Bonikowska et al., 2022).

- **Síntesis de betalactamasas**

Las betalactamasas producidas por *Staphylococcus aureus* se clasifican como grupo 2a según Bush y clase A según Ambler, siendo sintetizadas tanto por las cepas de MRSA como de MSSA. Estas enzimas están codificadas por el gen blaZ, usualmente encontrado dentro del operón blaI-blaR1-blaZ, localizado en varios plásmidos y transposones. Se pueden diferenciar cuatro variantes de betalactamasa estafilocócica (A-D) según a su serotipo y perfil de actividad. Además, se han observado cepas únicas conocidas como BORSA, en las que la betalactamasa producida presenta un espectro extendido, con un efecto sobre la resistencia a la oxacilina en un rango de 4–8 mg/L (Bush y Jacoby, 2010;García *et al.*, 2011).

- **Síntesis de la proteína PBP2A**

Entre todas las resistencias antibióticas preocupantes alcanzadas por *Staphylococcus aureus*, están las de meticilina y vancomicina. La resistencia a la meticilina esta mediada por el gen mecA que codifican estas PBPs adicionales que están ubicados dentro de los cassettes cromosómicos SCCmec y se transmiten a través de conjugación o



transducción de una especie ancestral de *Staphylococcus* al *Staphylococcus aureus* (Moreillon, 2008).

Las cepas que portan PBP2A exhiben resistencia a la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos, con excepción de ceftobiprol y ceftarolina, siendo conocidas como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Además de eso, estas cepas producen PBP2A (PBP2a o PBP20), una proteína de 668 aminoácidos que sustituye la función transpeptidasa PBP2 y asume la función de transpeptidasa de otras PBPs inactivadas. Aunque los antibióticos beta-lactámicos inactivan el dominio de transpeptidasa de PBP2, el dominio de transglicosilasa de PBP2 permanece activo y, en el caso de las cepas MRSA, colabora con la transpeptidasa de PBP2A (Moreillon, 2008).

Además de su papel en la resistencia, PBP2A participa con aproximadamente otras 40 enzimas en la formación de puentes de pentáglicano entre L-lisina (posición 3 del pentapéptido) de una cadena y D-alanina (posición 4 del pentapéptido) de la otra cadena de peptidoglicano, permitiendo así la síntesis de la pared celular. La expresión de PBP2A puede ser inducible o constitutiva, y su síntesis suele estar asociada con la presencia de los operones *mecI-mecR1-mecA* o *mecIc-mecR1c-mecC* (expresión inducible) o *DmecR1-mecA* (expresión constitutiva), que se localizan en los cassettes cromosómicos SCCmec de *Staphylococcus aureus*, considerados como islas genómicas (GI) y son transferidos junto con los genes *mec* a cepas susceptibles (Baba *et al.*, 2008).

- **Modificación dependiente de mutaciones en las proteínas PBP**

Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas PBP2 y PBP4, responsables de la resistencia a la oxacilina, son extremadamente infrecuentes. Las cepas que presentan este tipo de mutaciones se conocen como MODSA (*Staphylococcus aureus* con proteínas de unión a la penicilina modificadas) o MRLM (resistentes a la meticilina sin el gen *mecA*). Las mutaciones más comunes ocurren en la región promotora del gen *pbp4*, así como en los genes *gdpP* (regulador de la fosfodiesterasa c-di-AMP) y *yjbH* (efector del estrés de disulfuro), lo que provoca una sobreproducción de la proteína PBP4. Estas mutaciones mencionadas provocaron la resistencia de la cepa a varios antibióticos beta-lactámicos, incluyendo ceftobiprol, ceftriaxona, cefazolina, nafcilina y ampicilina, con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) elevados (Greninger *et al.*, 2016; Angeles *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021).

b. Resistencia a glicopéptidos y lipoglicopéptidos

La resistencia a los glicopéptidos se ha estudiado principalmente en enterococos, donde puede ser condicionada por diferentes operones conocidos como VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la resistencia a altas concentraciones de glicopéptidos es poco común y generalmente está asociada al operón VanA, originalmente identificado en *Enterococcus* spp. Este operón, al igual que en *Enterococcus* spp., provoca la síntesis de un precursor alterado de la pared celular, en lugar del grupo terminal D-Ala-D-Ala presenta D-Ala-D-lactato (Courvalin, 2006).

El operón VanA, que confiere resistencia a la vancomicina (CIM 64–1024 mg/L) y a la teicoplanina (CIM 16–512 mg/L), consta de 7 genes (*vanRASAHAAXAYAZA*) (Figura 3) situados en el Tn1546, habiendo sido identificado en diversas especies de *Enterococcus* como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus mundtii* y *Enterococcus raffinosus*. El operón VanA muestra una expresión inducible, regulada por dos genes, *vanRA* (regulador) y *vanSA* (sensor), este último una quinasa de histidina señal ubicada en la membrana citoplasmática. La activación del sensor *vanSA* ocurre en respuesta tanto a la vancomicina como a la teicoplanina (Zeng *et al.*, 2016).

La resistencia a la vancomicina está a menudo mediado por el gen *vanA* que se obtuvo por la transferencia horizontal de un transposón nacido en un plásmido de *Enterococcus* resistente a la vancomicina. Existe otro tipo de resistencia a la vancomicina mediada por VISA, adquirida por mutaciones adaptativas incorporadas en los genes que codifican la regulación de mecanismos celulares en bacterias (Hiramatsu *et al.*, 2014).

c. Resistencia a oxazolidinonas

La resistencia a las oxazolidinonas puede surgir por mutaciones en el gen *rrn5*, así como por mutaciones en los genes *rplC*, *rplD* y *rplV*, los cuales estos codifican a las proteínas ribosomales L3 (con sustitución G152D), L4 (con sustitución K68Q) y L22. Estos mecanismos también están relacionados con la resistencia a otros grupos de antibióticos, como las lincosamidas, fenicoles, estreptogramina A y pleuromutilina. Además,



se ha observado una mutación en el gen *rpoB* (A1345G; resultando en la sustitución D449N en la proteína RpoB), la cual confiere resistencia en cepas de *S. aureus* a linezolid (CIM = 8mg/L) y tedizolid (CIM = 4mg/L), así como a cloranfenicol (CIM 128mg/L), aunque mantiene una sensibilidad media a quinupristina/dalfopristina (CIM 2mg/L). Las mutaciones en el gen *rrn5*, que codifica el ARNr 23S en la subunidad 50S del ribosoma, resultan en la modificación del sitio de unión para linezolid dentro del dominio V del ARNr 23S, lo que impide la acción de este antibiótico (Colca *et al.*, 2003; Meka *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2021).

d. Resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS-B)

La resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos MLS-B puede originarse por varios mecanismos. El más común involucra la modificación del sitio de acción del antibiótico, llevada a cabo por las enzimas adenilil-N-metiltransferasa Erm, las cuales metilan la adenina 2058 del ribosoma, frente a la eritromicina. Esta modificación conduce a la resistencia contra todos los MLS-B. La expresión del gen que codifica esta enzima, Erm, puede ser constitutiva, lo que resulta en resistencia generalizada a todos los MLS-B, o inducible, lo que causa resistencia solo a aquellos antibióticos que inducen la síntesis de la metilasa, como los macrólidos con anillos de 14 miembros (M14), excluyendo a los cetólidos (por ejemplo, eritromicina, claritromicina, oleandomicina) (Malhotra *et al.*, 2009; Steward *et al.*, 2005).



e. Resistencia a aminoglucósidos y espectinomicina

La resistencia a los aminoglucósidos en *Staphylococcus aureus* puede originarse por diversos mecanismos, entre los que se incluyen: una síntesis de transferasas (acetiltransferasas, fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas) que estas alteran a la estructura de la molécula de aminoglucósido. La plazomicina es el único aminoglucósido que no suele ser modificado por la mayoría de estas enzimas (excepto AAC(20)-Ia,b,c), aunque actualmente no se recomienda para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus*. Además se ha reportado ausencia de enzimas responsables del transporte activo de aminoglucósidos dentro de la célula bacteriana (como ocurre en el metabolismo anaeróbico de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, dentro del biofilm; *Staphylococcus aureus* SCV, variante de colonia pequeña; *Staphylococcus aureus* subsp. anaerobius)(Chandrakanth *et al.*, 2008; Soiza *et al.*, 2018).

f. Resistencia a las fluoroquinolonas

Se origina por cambios mutacionales en los genes *gyrA* y *gyrB* (topoisomerasa II), *parC* (*grlA*) y *parE* (topoisomerasa IV). Estas mutaciones ocasionan la síntesis de proteínas con una susceptibilidad reducida o insensibilidad a las fluoroquinolonas. Además, se ha observado que hay una sobreproducción de proteínas codificadas por el cromosoma, las cuales son causantes de la expulsión las fluoroquinolonas de la célula bacteriana (*NorA*, *NorB*, *NorC* y *SdrM*, todas pertenecientes a la superfamilia MFS), lo que también contribuye a la resistencia. En *Staphylococcus aureus*, siendo las mutaciones en los genes *gyrA* y *grlA*

las más frecuentemente reportadas (Chandrakanth *et al.*, 2008; Soiza *et al.*, 2018).

2.2.5 Técnicas de la actividad antimicrobiana

2.2.5.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se define como la menor concentración de un antimicrobiano (expresada en $\mu\text{g/mL}$) capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganism.mo tras 24 horas de incubación a 37°C . La CMI se considera el gold standard en la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana, superando a otros métodos debido a su capacidad para confirmar resistencias inusuales y proporcionar resultados definitivos en casos donde otros métodos resultan indeterminados (Andrews, 2001).

2.2.5.2 Concentración mínima bactericida (CMB)

Es la concentración mínima de un antimicrobiano necesaria para eliminar más del 99,9% de los microorganismos viables tras un período de incubación, usualmente de 24 horas (Horna *et al.*, 2012).

2.2.5.3 Método del Kirby – Bauer

Se trata de una técnica económica que proporciona información cualitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano específico, categorizando los resultados como sensible, intermedio o resistente. Esta prueba se basa en la difusión de un antimicrobiano impregnado en un disco de papel, que se coloca sobre una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo en estudio. Si el microorganismo es sensible al antimicrobiano, se observa una inhibición



del crecimiento alrededor del disco, formando un "halo de inhibición" visible y medible después de 18 horas de incubación. El diámetro de esta zona de inhibición permite determinar si el microorganismo es sensible o resistente al antimicrobiano (Margareta y Lina, 2014).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

Los especímenes de *Dysphania ambrosioides* (paico) fueron recolectados en el distrito de Pusi, ubicado en la Provincia de Huancané, a una altitud de 3822 m.s.n.m. Las muestras se recolectaron a una latitud sur de 15°26' 22" y una longitud oeste de 69°55'19". La identificación taxonómica se llevó a realizar en el "Herbarium Arequipense" de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. El aceite esencial se extrajo en el Laboratorio de Industrias Medicas y Farmacéuticas S.R.L. en Cerro Colorado, Arequipa. Posteriormente, se realizó el análisis del perfil cromatográfico del aceite esencial en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Por último, las pruebas experimentales para evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la UNA PUNO (Anexo 11).

3.2 DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

Se enmarca en un diseño de tipo experimental puro de tipo prospectivo, cuantitativo y transversal, específicamente se trata de un estudio de ensayo aleatorizado *in vitro*. En este tipo de estudio, las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes fueron asignadas aleatoriamente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*. Esto permitió realizar una comparación y un análisis riguroso de los resultados obtenidos (Hernández



et al., 2014; Supo, 2012). Este enfoque metodológico garantizó una evaluación precisa de los efectos de los tratamientos bajo condiciones controladas, lo que fortaleció la validez y fiabilidad de los hallazgos alcanzados.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1 Población

Especímenes de *Dysphania ambrosioides* (paico) del distrito de Pusi, ubicado en la Provincia de Huancané y aislamientos clínicos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistentes aisladas de secreción bronquial y de cepas de *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes aislados de esputo, correspondientes a muestras clínicas determinados tipificadas por el Sistema Vitek 2.0.

3.3.2 Muestra

8 kg de hojas y partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* (paico), 1 cepa clínica aislada de *Pseudomonas aeruginosa* con bionúmero N° 0003041103500352 multidrogoresistente a Ceftazidina, Ceftazidina/Avibactam, Cetoazolano/Tozobactan, Imipenem, Meropenem, Amicacina, Ciprofloxacino y 1 cepa clínica aislada de *Staphylococcus aureus* con bionúmero N° 010402062763231 multidrogoresistente a Bencilpenicilina, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina por el Sistema Vitek 2.0 donde para la determinación de CMI/CMB se utilizó 24 unidades experimentales y para la susceptibilidad por discos de difusión se utilizó 30 unidades experimentales por cada microorganismo.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Identificación de los constituyentes volátiles del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*.

3.4.1.1 Recolección e identificación del material vegetal

A. Identificación taxonómica

a. Técnica

Guías de identificación botánica basadas en características morfológicas en el *Herbarium Arequipense*.

b. Fundamento

Los herbarios representan una invaluable reserva de conocimiento especializado en el ámbito de la botánica. Por ejemplo, el renombrado Herbario Kew en Londres que alberga más de 7 millones de especímenes secos recolectados en diversas partes del mundo, algunos de los cuales datan de hace más de dos siglos indica que la recolección y el almacenamiento de especímenes vegetales requieren de un meticuloso trabajo llevado a cabo por individuos con amplios conocimientos en taxonomía vegetal (Zapata y Florez, 2013).

La arquitectura foliar de las hojas es una herramienta frecuentemente utilizada en la taxonomía de plantas debido a su variabilidad entre la diferencia de las flores y frutos. Sin embargo, el color no es una característica confiable para esta identificación. A pesar de que se han realizado estudios sobre la arquitectura foliar, esta falta de



especificación de estándar para sus características ha generado desconcierto al interpretar las clasificaciones resultantes. Este término se refiere a la disposición y forma de diferentes elementos que componen la estructura foliar, como la forma de las hojas, su tamaño, los márgenes, la ubicación de las glándulas y el patrón de venación (Lu *et al.*, 2012).

c. Procedimiento

La identificación taxonómica del paico se llevó a cabo mediante la entrega de un espécimen completo, con previo cumplimiento de cada detalle del proceso de recolección. Esto incluyó al prensado y secado del material vegetal en un entorno oscuro, fresco y seco. Adicionalmente, se elaboró una ficha de colección con información (Anexo 12) detallada que fue enviada al "Herbarium Arequipense" de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, donde fue analizada por el Mg. Leoncio Mariño Herrera. Como resultado de estas acciones, se confirmó que el espécimen corresponde a la especie *Dysphania ambrosioides* (Anexo 10).

B. Recolección

a. Técnica

Manual *in situ*

b. Fundamento

Los especímenes a recoger deben incluir preferiblemente flores, frutos y partes vegetativas. Sin embargo, en muchos casos esto resulta impracticable debido a que la fructificación y la floración no coinciden



temporalmente. Los ejemplares deben ser representativos, saludables y contar con al menos algunas hojas completamente desarrolladas. Es importante recolectar las plantas en su hábitat natural; por ejemplo, si una especie suele crecer en bosques de pinos, no es recomendable recolectarla en áreas cercanas a los caminos, ya que en ocasiones la forma de las hojas, el color de las flores y otras características pueden verse considerablemente alteradas debido a la exposición a una alta luminosidad solar (Sánchez-González y González Ledesma, 2007).

c. Procedimiento

Los especímenes de "paico" fueron recolectados en el distrito de Pusi, situado en la Provincia de Huancané, a una altitud de 3822 m.s.n.m en la LS de 15°26' 22" y a una LO de 69°55'19". Durante el mes de febrero (2023) se seleccionaron cuidadosamente las partes aéreas de la planta, incluyendo hojas, tallos y semillas, asegurándose de que estuvieran libres de cualquier contaminante. Posteriormente, estas partes fueron sometidas a un proceso de desecación en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente (Anexo 1).

C. Secado

a. Técnica

Desecación natural

b. Fundamento

El método de secado a la sombra y bajo abrigo se utiliza en países con climas de baja humedad relativa y para secar volúmenes pequeños de



plantas. Es una alternativa popular diferente del secado al sol, ya que se aprovecha la temperatura ambiente. El material puede colocarse en el suelo sobre papeles, lonas o telas metálicas, en bandejas o catres, o ser colgado. Aunque es económico y adecuado para regiones con baja humedad, tiene desventajas en climas húmedos, donde puede tomar varios días completar el secado y existe riesgo de desarrollo de microorganismos. Además, no es recomendable durante condiciones frías y lluviosas al momento de la cosecha, ya que permite la entrada de contaminantes y puede atraer roedores e insectos, lo que resulta en contaminación y posible deterioro enzimático (Davies, 2004).

Al efectuar esta técnica se toma en cuenta algunos requerimientos esenciales tales como un ambiente oscuro, ventilado, temperatura adecuada y baja humedad relativa, lo cual favorecerá el secado, para lo cual es ideal hacerlo en bandejas estériles, donde los especímenes vegetales estarán extendidos en capas con un grosor de 1 cm (Palomino, 2016).

c. Procedimiento

El proceso de la desecación se llevó a cabo en un mesón y en un sitio ventilado y seco, resguardado de la luz solar directa para preservar los principios activos presentes en las hojas, que son órganos especialmente sensibles a la degradación por la radiación solar. Por un período de 25 días, se secaron ~10 kg del vegetal en fresco, obteniendo al final ~2 kg de material vegetal seco mediante el uso de una balanza (marca KIMGMAX 5KG/50BTZ02). Esta técnica asegura la conservación de los principios



activos y garantiza la calidad del material vegetal para su posterior selección y uso.

3.4.1.2 Extracción del aceite esencial

a. Técnica

Hidrodestilación

b. Fundamento

La técnica de hidrodestilación se fundamenta en los mismos principios que la destilación de vapor, siendo comúnmente utilizada para extraer compuestos no solubles en agua con altos puntos de ebullición. A diferencia de la destilación de vapor tradicional, este método implica sumergir directamente el material vegetal en agua hirviendo. Esta variación ofrece una protección adicional a los aceites extraídos, ya que el agua circundante actúa como una barrera térmica, evitando un sobrecalentamiento excesivo de los compuestos volátiles (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

c. Procedimiento

Se comenzó el proceso colocando la malla de soporte dentro de la cámara de extracción de un hidrodestilador de 20 litros (modelo Inox 340) vertiendo 3 litros de agua destilada. Luego, se agregaron los especímenes secos que tras una selección cuidadosa que comprendían las hojas, tallos e inflorescencias con escasas semillas de *Dysphania ambrosioides*, totalizó un peso de 848.7 Kg, la cual se colocó sobre el soporte enmallado del hidrodestilador. A continuación, la cámara se cerró herméticamente



utilizando seis tornillos. Se comenzó a conectar los componentes restantes del equipo, como la cámara refrigerante y las mangueras de entrada, salida y recirculación de agua. Una vez completadas estas etapas, se conectó el equipo a una fuente de alimentación de 220V por 3 horas, alcanzando a una temperatura de $\sim 100^{\circ}\text{C}$ y una presión cercana a 1 atm. Después de este tiempo, la mezcla de agua y aceite esencial fue separado utilizando una pera de decantación, obteniéndose un volumen de 12 ml de aceite esencial, con una densidad de 0.86 g/ml y un rendimiento del 1.17%, el cual se almacenó en un frasco ámbar a 4°C para su posterior análisis fitoquímico y actividad antibacteriana (Anexo 3).

3.4.1.3 Caracterización de los constituyentes del aceite esencial

a. Técnica

Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)

b. Fundamento

La cromatografía de gases es un método que permite dividir mezclas complejas, pero el tiempo de retención de los picos cromatográficos no es suficiente para identificar inequívocamente los componentes individuales, especialmente en muestras con numerosos componentes. Por otro lado, la espectrometría de masas puede identificar sustancias puras, pero enfrenta dificultades al analizar mezclas sin previa separación de los componentes. La combinación de ambas técnicas, CG-



EM, permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Para enlazar la cromatografía de gases con el espectrómetro de masas, se necesitan sistemas adecuados para la conexión debido a que operan en fases gaseosas y necesitan pequeñas cantidades de muestra para el análisis. El principal desafío radica en la diferencia de presiones entre el efluente de la columna cromatográfica y el espectrofotómetro de masas, que trabaja a alto vacío. Sin embargo, con la cromatografía de gases capilar, este acoplamiento resulta más sencillo.

En resumen, la mezcla de compuestos se separa en la columna cromatográfica y los componentes individuales se introducen en el espectrofotómetro de masas para su identificación. Cada compuesto que se registra como un pico cromatográfico que se identifica mediante su espectro de masas. El espectrofotómetro de masas también actúa como detección cromatográfica que construye registrando la corriente iónica total, representada como un cromatograma de área proporcional a la cantidad del compuesto presente.

c. Procedimiento

El análisis fitoquímico del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad de San Antonio de Abad del Cusco. Se empleó un equipo de cromatografía de gases (CG) Agilent 6890N Network GC – System, acoplado a un espectrómetro de masas (EM) Agilent Technologies 5975B Inert XL GI/CI MSD. Para el análisis



cromatográfico, se utilizó una columna Agilent HP-5MS (5% fenil metil siloxano) de 30m x 0.25id x 0.5 μ m. El programa de temperatura del horno se configuró inicialmente a 60°C, incrementándose gradualmente hasta alcanzar los 230°C, con un gradiente de 5°C/minuto. La inyección se realizó en modo split (con división) con una relación de 1/80 a 200°C, utilizando gas helio a un flujo de 1 ml/min y una inyección de 0,1 μ l del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*. Los datos obtenidos se analizaron mediante un escaneo de masas en un rango de 40 a 500 u.m.a.

Para identificar los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial, se compararon los espectros de masas obtenidos con la base de datos del National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11), que proporciona el contenido relativo de cada componente en el aceite esencial en forma de porcentaje. Cada pico cromatográfico representaba la presencia de un compuesto, permitiendo obtener datos porcentuales del contenido de cada componente identificado (Anexo 2).

3.4.2 Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes.

3.4.2.1 Obtención de las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes

a. Técnica

Equipo automatizado VITEK 2.0, modelo 211 Serie 000013D4383F, según los parámetros de interpretación del M100-S28-2018 sobre resistencia natural del CLSI.

b. Fundamento

El sistema VITEK empleado en este estudio fue desarrollado por bioMérieux con el propósito de automatizar la identificación y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Posteriormente, este sistema fue mejorado y denominado VITEK 2. La versión mejorada automatiza todos los pasos necesarios para la identificación y **determinación de la** susceptibilidad antimicrobiana una vez que se ha cargado un inóculo estandarizado en el sistema. Las muestras son analizadas cada 15 minutos mediante una evaluación cinética de señales de fluorescencia, turbidez y colorimetría. Los resultados se obtienen en un plazo de 3 horas para la identificación y de 2.5 a 18 horas para las pruebas de susceptibilidad (Nimer *et al.*, 2016).

Los paneles de prueba ID-GPC comprenden 46 pruebas fluorimétricas que englobaban análisis de cambio de pH y derivados para



identificar aminopeptidasas y -osidasas. Los sustratos usados para detectar aminopeptidasas están ligados con 7-amino-metilcumarina (7AMC), mientras que los sustratos para detectar -osidasas generalmente están ligados con 4-metilumbeliferona (4MU). Los 21 sustratos de prueba incluyen, entre otros, 4MU- α -l-arabinofuranósido, 4MU- α -d-galactósido, 4MU- α -d-glucósido, 4MU- α -d-N-acetilneuramínico, 4MU- β -d-galactósido, 4MU- β -d-glucósido, 4MU- β -d-glucuronido, 4MU- β -d-manósido, 4MU-n-acetil- β -d-glucosaminida, 4MU-fosfato, alanina-7AMC, arginina-7AMC, aureasa (butiloxicarbonil-Val-Pro-Arg-AMC), histidina-7AMC, ácido α -glutámico-7AMC, treonina-7AMC, lisina-7AMC, fenilalanina-7AMC, prolina-7AMC, ácido piroglutámico-7AMC y tirosina-7AMC. Además, la tarjeta ID-GPC incluye 16 pruebas de fermentación (para d-rafinosa, amigdalina, arbutina, d-galactosa, glicerol, d-glucosa, l-arabinosa, lactosa, d-maltosa, d-manitol, N-acetilglucosamina, salicina, d-sorbitol, d-trealosa, d-melibiosa y d-xilosa), dos pruebas de descarboxilasa (para ornitina y arginina) y seis pruebas misceláneas (para ureasa, piruvato, optoquina, novobiocina, sulfato de polimixina B y NaCl al 6%) (Nonhoff *et al.*, 2005).

c. Procedimiento

- **Preparación del inóculo:** Se toma una muestra del cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* y se suspende en un medio de cultivo estéril adecuado, como caldo de cultivo o solución salina. La concentración del inóculo debe ajustarse según las normativas estándar, siguiendo la escala de McFarland 0.5 (EPA, 2016).



- **Preparación de las tarjetas de identificación y susceptibilidad:**
Se insertan las tarjetas de identificación y susceptibilidad en el sistema VITEK 2. Estas tarjetas contienen una variedad de sustratos y reactivos necesarios para la identificación de la especie bacteriana y la determinación de su susceptibilidad a los antibióticos (EPA, 2016).
- **Inoculación de las tarjetas:** Se inoculan las tarjetas con el inóculo preparado anteriormente. Esto se realiza mediante la transferencia de una cantidad específica de la suspensión bacteriana a los pocillos designados en las tarjetas. La distribución del inóculo se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema (EPA, 2016).
- **Carga del sistema y configuración del ensayo:** Se carga la bandeja de tarjetas en el sistema VITEK 2 y se configura el ensayo correspondiente para *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*. Esto implica ingresar la información del paciente y seleccionar el protocolo de identificación y susceptibilidad adecuado (EPA, 2016).
- **Incubación y lectura de los resultados:** El sistema VITEK 2 incuba las tarjetas a una temperatura y tiempo específicos y luego analiza los cambios en las condiciones de crecimiento y metabolismo de las bacterias en cada pocillo de la tarjeta. La lectura de los resultados se realiza mediante la detección de cambios en la turbidez, fluorescencia o colorimetría de los pocillos (EPA, 2016) (Anexo 8 y 9).



- **Interpretación de los resultados:** Una vez completada la incubación, el sistema VITEK 2 genera un perfil de identificación y susceptibilidad antimicrobiana para cada cepa bacteriana. Estos perfiles se comparan con bases de datos de referencia para confirmar la identificación y determinar la susceptibilidad a diferentes antibióticos como resultado se tipificó *Pseudomonas aeruginosa* con bionúmero N° 0003041103500352 multidrogoresistente a Ceftazidina, Ceftazidina/Avibactam, Cetolozano/Tozobactan, Imipenem, Meropenem, Amicacina, Ciprofloxacino y *Staphylococcus aureus* con bionúmero N° 010402062763231 multidrogoresistente a Bencilpenicilina, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina (EPA, 2016).

3.4.2.2 Concentración mínima inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

a. Técnica

Macrodilución en caldo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)

b. Fundamento

En el método de macrodilución, se utiliza una serie de tubos para cada combinación de microorganismo y antimicrobiano. Para comenzar, se preparan tubos que contienen 1 ml de caldo estéril. Existen dos métodos para preparar los tubos con diferentes concentraciones de antimicrobiano. Uno implica agregar cantidades variables de solución antimicrobiana a cada tubo, mientras que el otro implica realizar diluciones seriadas a partir



de un tubo con la concentración más alta de antimicrobiano. Se incluye un tubo de control sin antimicrobiano que solo contiene caldo (Rivas y Pérez, 2021).

Posteriormente, se agrega 1 ml de inóculo a cada tubo, asegurándose de que la concentración final esté entre 1 y 5×10^5 UFC/ml. Los tubos se incuban durante un período y a una temperatura específica para el microorganismo en cuestión. Después de la incubación, algunos tubos pueden presentar turbidez, mientras que otros pueden no mostrar ningún signo de crecimiento teniendo en cuenta que la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, es decir, aquellos tubos que no presentan turbidez. El tubo de control sin antimicrobiano debería mostrar turbidez como indicación de crecimiento bacteriano (Rivas y Pérez, 2021).

c. Procedimiento

Tanto para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se prepararon diluciones dobles en tubos de 13x100 mm (Marca Pyrex). Se partió de una solución madre que contenía 4 ml de aceite esencial y 1 ml de reactivo Tween 80 de la Marca Omnicem SAC (Lote N° 211012G010997), obteniendo un total de 5 ml de solución, representando una concentración del aceite esencial de 800 μ l/ml. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones para 200 μ l/ml, 100 μ l/ml, 50 μ l/ml, 25 μ l/ml, 12.5 μ l/ml hasta obtener 6.25 μ l/ml. Inicialmente, se colocaron 500 μ l de la solución (aceite esencial) en el primer tubo y luego



se añadieron 500 μ l del diluyente (Tween 80), totalizando 1 ml en el primer tubo de ensayo. Luego, utilizando una micropipeta automática (Marca Inn Opette TM Basic, rango de 100 – 1000 μ l), se transfirieron 500 μ l al segundo tubo, y así consecutivamente.

Simultáneamente, se realizó las preparaciones de las suspensiones bacterianas utilizando 5 ml de caldo Müeller Hinton (Marca Merk 1.10293.0500) y 3 a 5 colonias para cada bacteria hasta lograr una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de Mc Farland (Marca Emarin SDA S.A. LOT 210914). Se añadieron 500 μ l de esta suspensión a cada uno de los tubos que contenían las diluciones dobles del aceite esencial, alcanzando un volumen total de 1 ml en cada tubo de ensayo.

Para los controles, se utilizó 1000 μ l del diluyente Tween 80 para el control negativo, y 1000 μ l de la suspensión bacteriana (0.5 Mc Farland) para el control positivo. Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente se midió su turbidez a 620 nm en un espectrofotómetro (Marca Spectronic 20D de Milton Roy Company). Todos los tratamientos (diluciones) se llevaron a cabo por triplicado (Anexo 6).

3.4.2.2 Concentración mínima bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

a. Técnica

Recuento de UFC en placa



b. Fundamento

La concentración mínima bactericida (CMB) que se refiere a la cantidad más menuda del antimicrobiano necesaria para eliminar el 99.9% del inóculo original, lo que equivale a una reducción de 3 logaritmos decimales. Usualmente, este recuento se realiza mediante técnicas de cultivo. Los métodos de macro o microdilución, utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), también se emplean para calcular la CMB, donde se enfrentan bacterias y antimicrobianos en un caldo (Rivas, 2021).

c. Procedimiento

A partir de los tubos con caldos inoculados con las bacterias se extrajeron 10 µl a las placas Petri de 90x15 mm, (Marca Biodes P180219320) con agar nutritivo (Marca Merck 1.05450.0500), siendo incubadas durante 24 horas. Posteriormente, se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias, donde todos los tratamientos (diluciones) se llevaron a cabo por triplicado (Anexo 6).

Finalmente, se realizó un análisis de regresión y correlación lineal que previa verificación de los supuestos de la prueba, luego de obtener la ecuación de regresión se calculó la concentración de aceite esencial que fue capaz de dejar 1 UFCx100/ml para calcular el CMI y de no dejar ninguna UFCx100/ml para el CMB.

$$[AE] = \frac{UFC - a}{b}$$

[AE]=Concentración de aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*



UFC=Número de unidades formadoras de colonias por 100 en 1 mililitro

a= Constante que corta el eje de la ordenada (UFC) cuando la AE es cero

b= Pendiente de la ecuación que indica la relación de progreso entre la AE y la UFC

3.4.2.3 Susceptibilidad antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

a. Técnica

Difusión en disco (Kirby – Bauer modificado)

b. Fundamento

El procedimiento de difusión en disco Kirby-Bauer, estandarizado y accesible, ofrece una opción válida para laboratorios que no disponen de métodos automatizados más avanzados, como la microdilución en caldo.

Al colocar un disco de papel de filtro de 6 mm, impregnado con una concentración conocida de antimicrobiano, sobre una placa de agar Müeller-Hinton (MH), el agua del agar es absorbida rápidamente por el disco, iniciando así la difusión del antimicrobiano en el agar circundante. La velocidad de difusión en el agar, más lenta que la velocidad de extracción del antimicrobiano del disco, genera una mayor concentración de antimicrobiano cerca del disco, con una disminución logarítmica a medida que se aleja. Esta velocidad depende de las propiedades del antimicrobiano y del peso molecular, resultando en una zona de inhibición única que indica la susceptibilidad del microorganismo (Hudzicki, 2009).



Si la placa de agar se inocula previamente con una suspensión del patógeno, el crecimiento bacteriano y la difusión de los antimicrobianos ocurren simultáneamente. El crecimiento que se produce cuando las bacterias superan los efectos inhibidores del antimicrobiano, alcanzando una masa crítica. El tiempo estimado para este proceso varía según el patógeno y las condiciones de incubación. La profundidad del agar afecta el tamaño de la zona de inhibición, siendo mayor en capas superficiales (Hudzicki, 2009).

La masa crítica se alcanza cuando se observa un círculo de crecimiento bacteriano alrededor del disco. La concentración de antimicrobiano en este punto, conocida como concentración crítica, se correlaciona con la concentración mínima inhibitoria obtenida en pruebas de susceptibilidad en caldo (Hudzicki, 2009).

c. Procedimiento

Se empleó papel filtro Whatman N° 2 para la confección de discos de susceptibilidad con diámetro de 6mm, previa esterilización (Bender FD-56) a 150 °C por 60 minutos (calor seco). Seguidamente, los discos se coloraron sobre una placa Petri estéril, donde en cada uno de ellos se depositaron 10 µl de las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µl/ml del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*. Luego se dejó reposar por 15 minutos para la absorción óptima. Para los controles, se añadieron 10 µl de Tween 80 (Marca Omnicem SAC (Lote N° 211012G010997) para el control negativo, mientras que los discos de



susceptibilidad comerciales como clorhexidina y gentamicina (Marca Biodisc SAC GM23) (10 μ g) fueron utilizados como control positivo.

La preparación de las suspensiones bacterianas de interés se ajustó a la turbidez de 0.5 en la escala de McFarland (Marca Emarin SDA S.A. LOT 210914). Posteriormente, con un hisopo estéril, se inocularon en las placas de agar Müeller-Hinton (Merck 1.05437.0500) para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Tras un reposo de 5 minutos, se colocaron los discos de susceptibilidad con pinzas (Marca Termalimex 20CM), aplicando una leve presión para asegurar su fijación en el medio de cultivo. Las placas sembradas seguidamente se pasaron a poner en la incubadora (H. W. Kessel S.A.Lote N° 2000207) a 37°C por 24 horas. Finalmente, se midieron los halos de susceptibilidad utilizando un vernier (Marca Uyustools CLA006) en un fondo oscuro (Anexo 7).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La composición fitoquímica se expresó en porcentajes (%) según los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM). Para evaluar la susceptibilidad antibacteriana de las dos cepas clínicas frente al aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*, se utilizaron tres técnicas: el halo de inhibición (mediante difusión en disco) en milímetros, la concentración mínima inhibitoria (CMI) en microlitros por mililitro y la concentración mínima bactericida (CMB) en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Para comparar el CMI y la CMB entre los diferentes tratamientos, se tomó a cabo un análisis de regresión y correlación lineal de Pearson, después de verificar la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con



el test de Breusch-Pagan, además se verificó la independencia de los residuos del modelo mediante el test de Durbin-Watson.

Para la comparación de los halos de inhibición entre los tratamientos, se evaluó inicialmente la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza con el test de Levene. Si los datos cumplían con estas condiciones, se aplicaba el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En caso de encontrar diferencias significativas, se empleaba la prueba de comparaciones múltiples de T-student (Prueba de Tukey) para identificar cuáles de las medias de los tratamientos eran estadísticamente diferentes entre sí. Para los casos en que los datos no cumplían con las condiciones previas, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (prueba de Dunn-Bonferroni).

Todos los estadígrafos fueron valorados a un nivel de significancia del 5%, a partir de la matriz de tabulación de datos (Anexo 13) procesada con el R version 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) -- "Race for Your Life".

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONSTITUYENTES VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Dysphania ambrosioides.

Tabla 6

Constituyentes volátiles del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* identificados por CG-EM

Pico	TR	Compuesto Librería Nist 11	CAS	Calidad	Contenido relativo (%)
1	8.7013	β -Mirceno	000123-35-3	83	0.1523
2	9.1073	(+)-4-Careno	029050-33-7	96	0.8945
3	9.2722	Ácido acético, éster hexílico	000142-92-7	86	0.2295
4	9.4033	(+)-3-Careno	000498-15-7	96	0.1869
5	9.6316	(+)-4-Careno	029050-33-7	98	26.4689
6	9.8515	Benceno, 1-metil-3-(1-metiletil)-	000535-77-3	95	20.1616
7	9.9403	D-Limoneno	005989-27-5	99	0.0791
8	9.9911	β -Felandreno	000555-10-2	94	0.0841
9	10.7818	γ -terpineno	000099-85-4	96	1.1832
10	11.6995	α ,p-dimetilestireno	001195-32-0	94	0.1177
11	12.4056	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno, E,E-	000460-01-5	87	0.0757
12	13.5262	(-)-Alcanfor	000464-48-2	93	0.0600
13	13.7503	1-Butanona, 1-biciclo[4.1.0]hept-7-il-	054764-62-4	72	0.1538
14	14.9809	trans-Piperitol	016721-39-4	89	0.0799
15	16.5243	(+)-2-Careno	1000149-94-6	91	43.9754
16	16.8626	7 Oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona, 3-metil-6-(1-metiletil)-	005729-99-7	87	0.4226
17	17.4250	Fenol, 2,3,4,6-tetrametil-	003238-38-8	81	0.0623
18	17.9367	p-timol	003228-02-2	94	0.3401
19	18.7570	Eucarvona	000503-93-5	93	0.1298
20	19.6577	Acetato de nerilo	000141-12-8	87	0.1616

Nota: TR: Tiempo de retención (minutos), CAS: Número para identificación de la molécula, Calidad=Porcentaje de coincidencia con la Base de Datos Nist 11

Fuente: Reporte Análisis CG-EM, NIST v11

En la Tabla 6, se presenta información relevante sobre el cromatograma del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada



a espectrometría de masas (CG-EM). En ella se detallan los tiempos de retención de los constituyentes volátiles detectados, así como su pureza y el porcentaje de concentración relativa en cada uno de los picos correspondientes. Estos datos se compararon con el espectro de masas almacenado en la biblioteca de la base de datos NIST v11.

Se encontró principalmente 20 compuestos volátiles correspondientes al aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*. Los constituyentes volátiles predominantes fueron el (+)-2-careno (44%), seguido por el (+)-4-careno (26%) y el m-cimeno (20%). El resto de los compuestos en el paico presentaron una concentración muy por debajo del 1.5%. Entre ellos destacan el γ -terpineno (1.2%), 7 Oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ona, 3-metil-6-(1-metiletil)- (0.4%), p-timol (0.3%), ácido acético, éster hexílico (0.2%), acetato de nerilo (0.2%), eucarvona (0.1%) y α ,p-dimetilestireno (0.1%).

La presencia de las moléculas identificadas en el aceite esencial extraído de *Dysphania ambrosioides* fueron informadas en investigaciones anteriores, así tenemos que Kandsi *et al.* (2022) reportaron para aceites esenciales procedentes de Marruecos que los compuestos más abundantes en el tallo son (+)-4-Careno (50.50%), -Acetato de -ciclogeraniol (22.64%) y (1R,2R,3R,5S)-(-)-Isopinocanfeol (8.87% %), respectivamente, mientras que en el aceite esencial de hojas el (+)-4-Careno (46.2%) fue el principal compuesto, seguido del m-Cimeno (20.74%) y el -Acetato de terpineol (14.5%). Además, se ha demostrado que el butanoato de trans-terpinilo es el principal fitoconstituyente del aceite esencial de flores con un 31.13%, seguido del (+)-4-careno (28.05%) y (1R,2R,3R,5S)-. (-)-isopinocanfeol (18.06%). El aroma perfumado del AE de *Dysphania ambrosioides* está relacionado principalmente con el ascaridol, que es uno de sus componentes principales (Singh y Pandey, 2022). Sin embargo, en el presente estudio el ascaridol no se ha detectado.



Otros estudios también han identificado que los constituyentes de los aceites esenciales de las partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* variaron significativamente. Por ejemplo, en el estudio de Boutkhil *et al.* (2009), se encontraron principalmente el terpineno (61.04%), el 4-careno (13.55%) y el p-cimeno (12.94%). Por otro lado, el estudio de Pavela *et al.* (2018) registró cis y trans ascaridol en proporciones del 35.4% y 26.0%, respectivamente, junto con p-cimeno (29.2%) como los componentes principales. Estas variaciones en la composición se deben a diversas variables presentes en los estudios, como el tipo de suelo, los índices de pluviosidad, la intensidad del viento, la época y la temporada de recolección. Tales diferencias han sido previamente documentadas (Chu *et al.*, 2011).

En Brasil, Lacerda *et al.* (2021) para el perfil fitoquímico del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* estudiado establecida mediante cromatografía tuvo como constituyente mayoritario terpineno, con un porcentaje de 30.53%, timol y o-cimeno, 18.11% y 13.68%, respectivamente; lo cual difirió de lo presentado aquí ya que el γ -terpineno representó solo 1.18% y el β -mirceno 0.15%, concentraciones que fueron muy inferiores.

Para Nigeria, Fatokun *et al.* (2019) indican que en el análisis fitoquímico mediante cromatografía de gases acoplada a CG-EM reveló la presencia de un total de veinte compuestos en el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* entre ellos α -terpineno (48.68%), o-cimeno (21.71%) y trans-beta-terpinil butanoato (17.15%), seguido de compuestos menores como ascaridol (5.67%), gamma-terpineno (2.16%) y el D-limoneno (1.83%). Es importante destacar que los cambios en la composición pueden ocurrir incluso después de la extracción de los aceites esenciales debido a reacciones químicas, como la autooxidación del α -terpineno. Esta reacción puede aumentar la



concentración de otros componentes, como el ascaridol, mientras reduce su propia concentración al entrar en contacto con el aire (Rudbäck *et al.*, 2012)

La variación en el porcentaje y los componentes químicos puede deberse a las diversas ubicaciones geográficas existentes, el tiempo de recolección de brotes/hojas en diferentes etapas, los procedimientos de extracción y los métodos de secado (Rohloff *et al.* 2005). Otros factores que determinan la variabilidad en la composición química del AE de *Dysphania ambrosioides* pueden ser genéticos y estar basados en la evolución de las especies junto con las condiciones fisiológicas y ambientales (Figueiredo *et al.* 2008).

Asimismo, Mokni *et al.* (2019) en Túnez, empleando hidrodestilación y CG-EM y GC-FID identificaron 44 componentes en el aceite esencial extraído, entre los cuales se encontraban cis-ascaridol (60.33 %), m-cimeno (22.17 %) y α -terpineno (1.79 %).

Según Ali *et al.* (2021) de Pakistan realizando el análisis de CG-EM demostraron que el aceite esencial contiene 4-careno en un 56.59% y el segundo compuesto más abundante el o-cimeno, en un 41.46%, los cuales informaron por primera vez en esta especie, no encontrando a escaridol, lo cual en cierta medida coincide con lo hallado aquí respecto al (+)-2-careno en un 43.98%.

En Marruecos, Ali *et al.* (2021) mencionan haber determinado altos niveles de α -terpineno (53.4%), ascaridol (17.7%) y γ -cimeno (12.1%), junto con otros componentes presentes en cantidades relativamente menores, como carvacrol (7.3%) e isoascaridol (2.1%). Estas composiciones fueron notablemente similares a las encontradas por Muhayimana *et al.* (1998) quienes encontraron en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* recolectado en el norte de Taiwán que estaba compuesto principalmente por α -terpineno (30.5%), p-cimeno (17.3%), carvacrol (16.2%) y ascaridol (15.1%).



En Brasil, Degenhardt *et al.* (2016) identificaron como principales fitoquímicos presentes en el aceite esencial, el p-cimeno (42.32%) y ascaridol 2 (49.77%), lo cual difirió de lo encontrado aquí ya que no se reportaron estos compuestos en el cromatograma.

Como se puede observar hay variaciones en el porcentaje de los compuestos analizados en diferentes estudios. Por ejemplo, el m-cimeno que es un fitoquímico similar a p-cimeno, que representa el 20.0% del aceite esencial en este estudio, mostró una ligera similitud en comparación con el estudio realizado por Cavalli *et al.* (2004) en Madagascar que representó el 16.2%, Chekem *et al.* (2010) en Camerún que lo encontraron en un 23.4% y por Singh *et al.* (2008) en India que revelaron constituye un 25.77%. Sin embargo, existen otras investigaciones como las realizadas por Jardim *et al.* (2008) sobre el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* obtenido en Brasil que indican representó solo un 2.0%, o en contra parte a la de Taponjoui *et al.* (2002), quienes encontraron concentraciones superiores a 50% de p-cimeno. Estas diferencias en la composición química pueden atribuirse a factores como la variabilidad genética de la planta, las condiciones de crecimiento, el clima y los métodos de extracción utilizados en cada estudio (Owolabi *et al.*, 2009).

Brahim *et al.* (2015) informaron que, mediante el análisis realizado con CG-EM, detectaron la presencia de un total de 24 compuestos del aceite *Chenopodium ambrosioides var. ambrosioides*. Entre los principales constituyentes identificados se destacan el α -terpineno (23.77%), el ascaridol (14.48%), el p-cimeno (12.22%), el neral (8.08%), el geraniol (5.60%), el isoascaridol (2.96%) y el 2-careno (2.77%), lo cual se aproxima a los 30 compuestos diferentes encontrados aquí, de los cuales 20 de ellos resultaron importantes representando el 95.02% entre ellos el (+)-2-careno (~44%).



Además, la composición química encontrada aquí también difiere de los hallazgos reportados por Alitonou *et al.* (2012), quienes estudiaron tres aceites esenciales extraídos de *Chenopodium ambrosioides* de Benin, Brasil encontrando principalmente α -terpineno (48.8–63.7%), ascaridol (11.7–9.7%), p-cimeno (15.4–19.1%) e isoascaridol (0.7–2.5%).

Por otro lado, Almeida *et al.* (2019b) mediante cromatografía del aceite, identificaron la presencia de 16 constituyentes. Entre ellos, el monoterpeno α -terpineno destacó como el principal compuesto, representando el 54.09% de la composición total. Asimismo, el Ascaridol se destacó como el segundo terpeno más abundante en el aceite, con un 15.13%.

Asimismo, los componentes predominantes sobre el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* procedente de distintas regiones como Yemen fueron el ascaridol (54.2%), isoascaridol (27.7%) y p-cimeno (8.1%) (Al-kaf *et al.*, 2016); otro estudio como el de Madagascar también reportó ascaridol (41.8%), isoascaridol (18.1%) y p-cimeno (16.2%), (Cavalli *et al.*, 2004). En Cuba se reportó algo similar como es ascaridol (30.5-47.1%), p-cimeno (20.2-21.1%) y α -terpineno (17.0-20.7%) (Monzote *et al.*, 2011); en Brasil se halló ascaridol (61.4%) e isoascaridol (18.6%) (Potawale *et al.*, 2008), mientras que en Uttarakhand (India) se determinó ascaridol (45.0%), isoascaridol (2.9%), p-cimeno (27.1%) y α -terpineno (8.3%) (Lohani *et al.*, 2012), mientras que en China se reportó ascaridol (29.7%), isoascaridol (13.0%) y p-cimeno (12.7%) (Chu *et al.*, 2011).

Otras investigaciones como en Nigeria desarrollada por Owolabia *et al.* (2009) reportaron α -terpineno (63.1%), p-cimeno (26.4%) y ascaridol (3.9%), mientras que en *Chenopodium ambrosioides* silvestre del Himalaya India, Lohani *et al.* (2012) revelaron la presencia de α -terpineno (44.7%), p-cimeno (21.3%) y ascaridol (17.9%)], y en el sur



de la India por Gupta *et al.* (2002) hallaron α -terpineno (63.6%) y p-cimeno (19.5%). Asimismo, en Marruecos, Zefzoufi *et al.* (2020) observó que los componentes principales fueron ascaridol (34%), α -terpineno (13.3%), p-cimeno (18.2%), timol (6.4%), y carvacrol (6.1%).

En Nigeria, Owokotomo (2022) observó que el origen geográfico de la planta tiene alta influencia en *Chenopodium ambrosioides* sobre su composición química identificando ocho metabolitos principales que representaron el 99.6% del aceite como son el α -terpineno (41.36%), acetato de α -terpinenilo (31.81%), timol (8.23%), carvacrol (6.7%), p-cimeno (5.76%), fitol (2.97%), ascaridol (2.62%) y alcanfor (0.18%), difiriendo de lo reportado aquí.

En India, Prasad *et al.* (2010) han reportado que el m-cimeno es el componente principal, representando el 43.9% del aceite. En Camerún se ha descubierto que el p-cimeno constituía el 50.00% del aceite esencial (Tapondjou *et al.*, 2002). En este estudio, solo se encontró un 20% del tipo m-cimeno. En Brasil, se encontró 80% del contenido era ascaridol, en contraste con el 0% registrado en esta investigación (Jardim *et al.*, 2008). Las discrepancias observadas podrían deberse a diversos factores, como las condiciones climáticas, la edad de las plantas, las estaciones del año, aspectos geológicos o los tratamientos aplicados después de la cosecha (Owokotomo, 2022).

En otras investigaciones como el de Ouadja *et al.* (2021) el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* originario de Kara, en el norte de Togo, revelaron que los principales metabolitos fueron 2-careno (37.79%), O-cimeno (33.27%) y α -terpineno (20.94%). Por otro lado, el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* cultivado en Lomé, en el sur de Togo, que experimenta un clima tropical húmedo con suelos salinos, mostró una composición diferente, en lugar del componente 2-careno, contenía neral y

geraniol siendo además los principales metabolitos del aceite esencial de Lomé el ascaridol, p-cimeno, neral y geraniol (Koba *et al.*, 2009).

Y el contenido de δ -3-careno en el aceite esencial de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* fue notablemente alto, representando el 61.51%, seguido del p-cimeno con un 14.67% y el 1,2:3,4-diepoxi-p-mentano con un 6.19%. Por otro lado, el aceite esencial de las inflorescencias también tuvieron los mismos compuestos, aunque con cantidades variables como el δ -3-careno que representó el 44.29%, el 1,2:3,4-diepoxi-p-mentano que alcanzó el 19.46% y el p-cimeno que fue del 17.85% (Kasrati *et al.*, 2024). Al respecto, en lo reportado aquí el 3 careno solo representó el 0.19%.

Tabla 7

Clasificación de los constituyentes volátiles del aceite esencial de Dysphania ambrosioides identificados por CG-EM

Tipo de compuesto	Metabolito	Peso molecular (g/mol)	Fórmula química	Saturación	Ciclaje
Monoterpenos (65%)	β -mirreno	136.234	C ₁₀ H ₁₆	Hidrocarburo (69%)	Acíclico
	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno, E,E-	134.2182	C ₁₀ H ₁₄		
	D-limoneno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		Monocíclico
	β -felandreno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		
	γ -terpineno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		
	(+)-4-Careno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		Bicíclico
	(+)-3-Careno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		
	(+)-4-Careno	136.234	C ₁₀ H ₁₆		
	(+)-2-Careno	136.2340	C ₁₀ H ₁₆	Oxigenado (31%)	Monocíclico
	Eucarvona	150.2176	C ₁₀ H ₁₄ O		Bicíclico
	trans-piperitol	154.2493	C ₁₀ H ₁₈ O		
	(-)-Alcanfor	152.2334	C ₁₀ H ₁₆ O		
		7	168.2328	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	
	Oxabiciclo[4.1.0]heptan-2-ona, 3-metil-6-(1-metiletil)-				
Compuestos estéricos (10%)	Ácido acético, éster hexílico	144.2114	C ₈ H ₁₆ O ₂	Oxigenado	Acíclico
	Acetato de nerilo	196.286	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		
Hidrocarburos aromáticos (10%)	m-Cimeno	134.2182	C ₁₀ H ₁₄	Hidrocarburo	Monocíclico
	α ,p-dimetilestireno	132.2023	C ₁₀ H ₁₂		
Compuestos fenólicos (10%)	Fenol, 2,3,4,6-tetrametil-	150.2176	C ₁₀ H ₁₄ O	Oxigenado	Monocíclico
	p-timol	150.2176	C ₁₀ H ₁₄ O		
Compuestos cetónicos (5%)	1-Butanona, 1-biciclo[4.1.0]hept-7-il-	166.26	C ₁₁ H ₁₈ O		Bicíclico

Fuente: Elaboración propia según los datos de NIST



La Tabla 7, proporciona una clasificación detallada de los constituyentes fitoquímicos detectados en el aceite de *Dysphania ambrosioides*, organizados en cinco grupos según su estructura y composición química. Destaca el predominio de los monoterpenos pertenecientes a los terpenos, los cuales representan el 65% del total de los compuestos volátiles. Entre estos se encuentran los monoterpenos hidrocarbonados acíclicos (β -mirceno y el 2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno, E,E-), monoterpenos hidrocarbonados monocíclicos (D-limoneno, β -felandreno y el γ -terpineno), monoterpenos hidrocarbonados bicíclicos ((+)-4-Careno, el (+)-3-Careno, el (+)-4-Careno, el (+)-2-Careno); monoterpenos oxigenados monocíclicos (eucarvona y el trans-piperitol) y los monoterpenos oxigenados bicíclicos ((-)-Alcanfor y el 7-Oxabiciclo[4.1.0]heptan-2-ona, 3-metil-6-(1-metiletil)-). Específicamente, los monoterpenos hidrocarbonados constituyeron el 69%, seguido de los monoterpenos oxigenados, que representan el 31%.

En cuanto a los otros grupos de compuestos volátiles encontrados, estos representaron el 35% del total. Dentro de esta categoría, se destaca que el 10% correspondieron a compuestos estéricos (ácido acético, éster hexílico y acetato de nerilo), otro 10% correspondió a hidrocarburos aromáticos (m-cimeno y α ,p-dimetilestireno), un 10% a compuestos fenólicos (fenol, 2,3,4,6-tetrametil- y p-timol) y el restante 5% a compuestos cetónicos (1-Butanona, 1-biciclo[4.1.0]hept-7-il-) entre los cuales se encuentran aquellos de naturaleza hidrocarbonada y oxigenada.

De este modo existen investigaciones como la de Degenhardt *et al.* (2016) en Brasil que identificaron como principales fitoquímicos presentes en el aceite esencial, el p-cimeno y ascaridol. Estos dos monoterpenos, en conjunto, constituyeron el 92.09% del aceite esencial estudiado.



En Yemen, Al-kaf *et al.* (2016) identificaron un total de once compuestos, los cuales constituyeron el 94.1% del aceite analizado siendo los principales componentes del aceite esencial los monoterpenoides oxigenados, presentes en una concentración del 85.3%, y los hidrocarburos monoterpénicos, que representaron el 8.8%.

Un análisis llevado a cabo en Marruecos por Zefzoufi *et al.* (2020) sobre la composición del aceite *Dysphania ambrosioides* utilizando CG-EM reveló catorce componentes, los cuales representaron el 92.6% del aceite total. La mayoría de ellos pertenecían a dos clases principales de compuestos volátiles: los monoterpenoides oxigenados, que constituían el 59.1%, y los hidrocarburos monoterpénicos, que representaron el 32.8%.

Según el informe de Ignacchiti *et al.* (2022) en Brasil, al análisis químico del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* reveló la presencia de siete componentes, que representaban el 99.51% del aceite. Los isómeros (Z) -ascaridol y (E) -ascaridol destacaron como los principales entre los constituyentes oxigenados, con un 44.68% y un 22.44%, respectivamente. En cuanto a los monoterpenos hidrocarbonados, éstos constituyeron el 31.38% del total, siendo el α -terpineno (17.74%) y el p-cimeno (12.78%) los más predominantes, en donde éstos dos últimos compuestos representaron el 97.64% de la composición del aceite.

Otros estudios revelaron que el aceite estaba compuesto por una mezcla compleja de monoterpenos y sesquiterpenos, y una variedad de aldehídos, ácidos, alcoholes y cetonas (Koba *et al.* 2009). Como señala Kasrati *et al.* (2024) en Marruecos para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*, se halló diez compuestos en las hojas como en las flores, representando el 97.54% y el 95% de los constituyentes totales, respectivamente, destacando los monoterpenos hidrocarbonados, que oscilaron entre 63.26% y 78.01%.

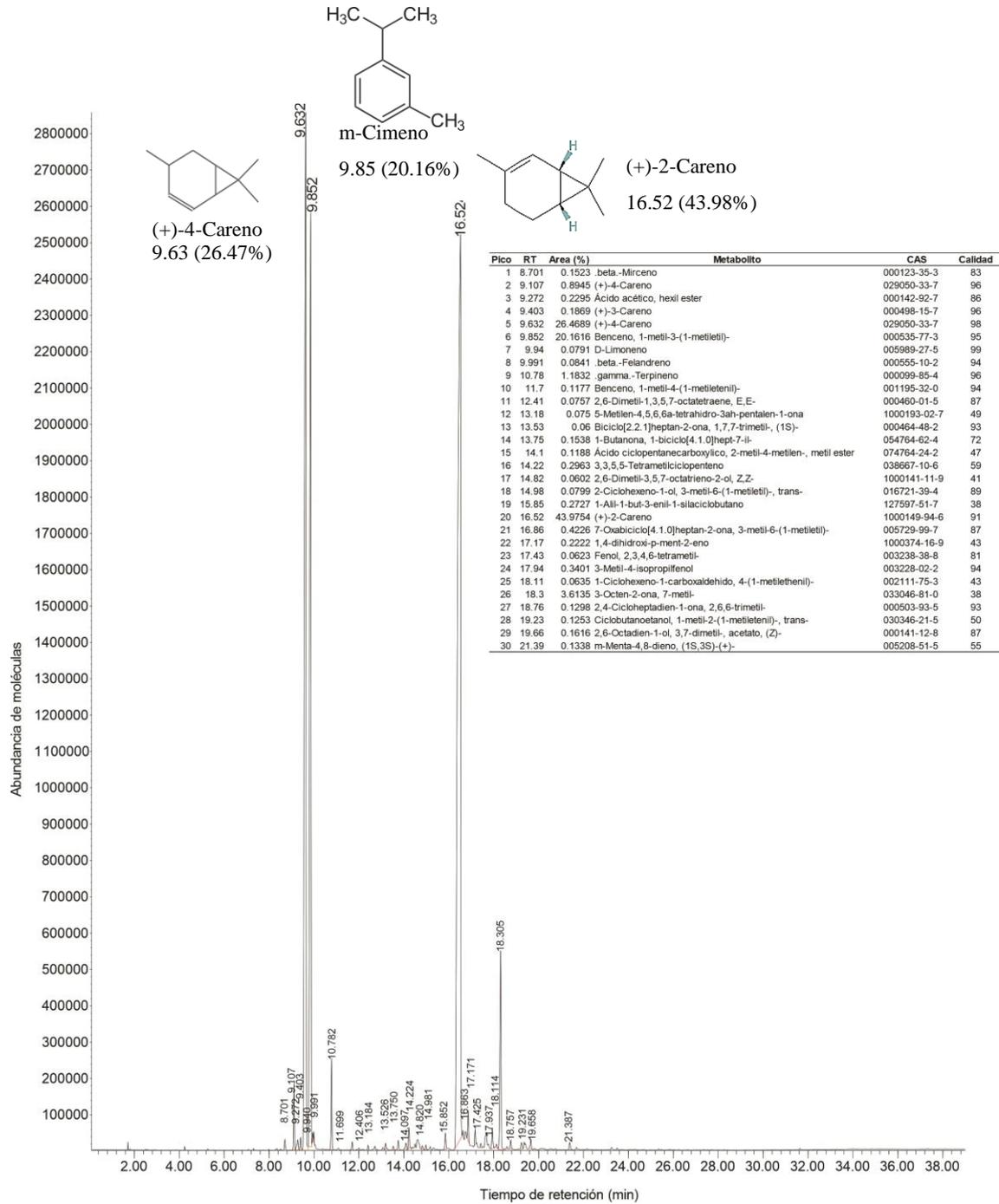


En Taiwan Hsu *et al.* (2022) encontraron que en el aceite de *Dysphania ambrosioides* se identificaron veinticinco componentes, de los cuales, el 51.0% correspondía a 6 hidrocarburos monoterpénicos, el 47.2% a 15 monoterpenos oxigenados, el 1.5% a 3 hidrocarburos sesquiterpénicos y el 0.1% a un diterpeno, siendo importante destacar que esta composición de aceite esencial carece de sesquiterpenos oxigenados, constituyendo los principales hidrocarburos monoterpénicos el α -terpineno (30.5%) y el p-cimeno (17.3%), mientras que entre los monoterpenos oxigenados sobresalieron el carvacrol (16.2%) y ascaridol (15.1%).

Varios estudios han identificado que los constituyentes de los aceites esenciales pueden variar significativamente. Por ejemplo, Boutkhil *et al.* (2009), determinaron principalmente terpenos y sesquiterpenos oxigenados. Estas variaciones en la composición química se deberían a diversas variables presentes en los estudios, como el tipo de suelo, los índices de pluviosidad, la intensidad del viento, la época y la temporada de recolección, donde tales diferencias han sido previamente documentadas (Chu *et al.*, 2011). Además, la maduración o edad de la planta también puede influir en la composición del aceite esencial (Johnson y Croteau, 1984).

Figura 4

Perfil cromatográfico de los constituyentes volátiles presentes en el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* identificados por CG-EM



Nota: Tiempo de retención=Tiempo de retención en minutos al cual son detectados los diferentes compuestos volátiles, Abundancia=Cantidad de compuestos volátiles que se llegan al detector del equipo CG-EM, %=Porcentaje del área del cromatograma

Fuente: Base de datos del NIST



Como se puede apreciar en la Figura 4, en el cromatograma se observa que a los 9.6316 minutos se detecta el primer compuesto fitoquímico con una concentración importante, seguido a los 9.8515 minutos y otro a los 16.5243 minutos, correspondientes al (+)-4-careno, m-cimeno y (+)-2-careno, respectivamente, los cuales fueron los metabolitos de mayor abundancia en el aceite esencial estando directamente relacionados con la masa y tamaño de la molécula siendo los de más bajo peso molecular (Tabla 7) entre 134 y 136 g/mol además de presentar dentro su estructura química más anillos aromáticos.

De igual modo, tras la extracción del aceite, Degenhardt *et al.* (2016) procedieron a aplicar una porción del mismo para su análisis mediante CG-FID. Este análisis reveló también la presencia de picos principales con tiempos de retención por minutos, los cuales fueron identificados comparando los espectros de masas con los estándares de la biblioteca NIST 8.0.

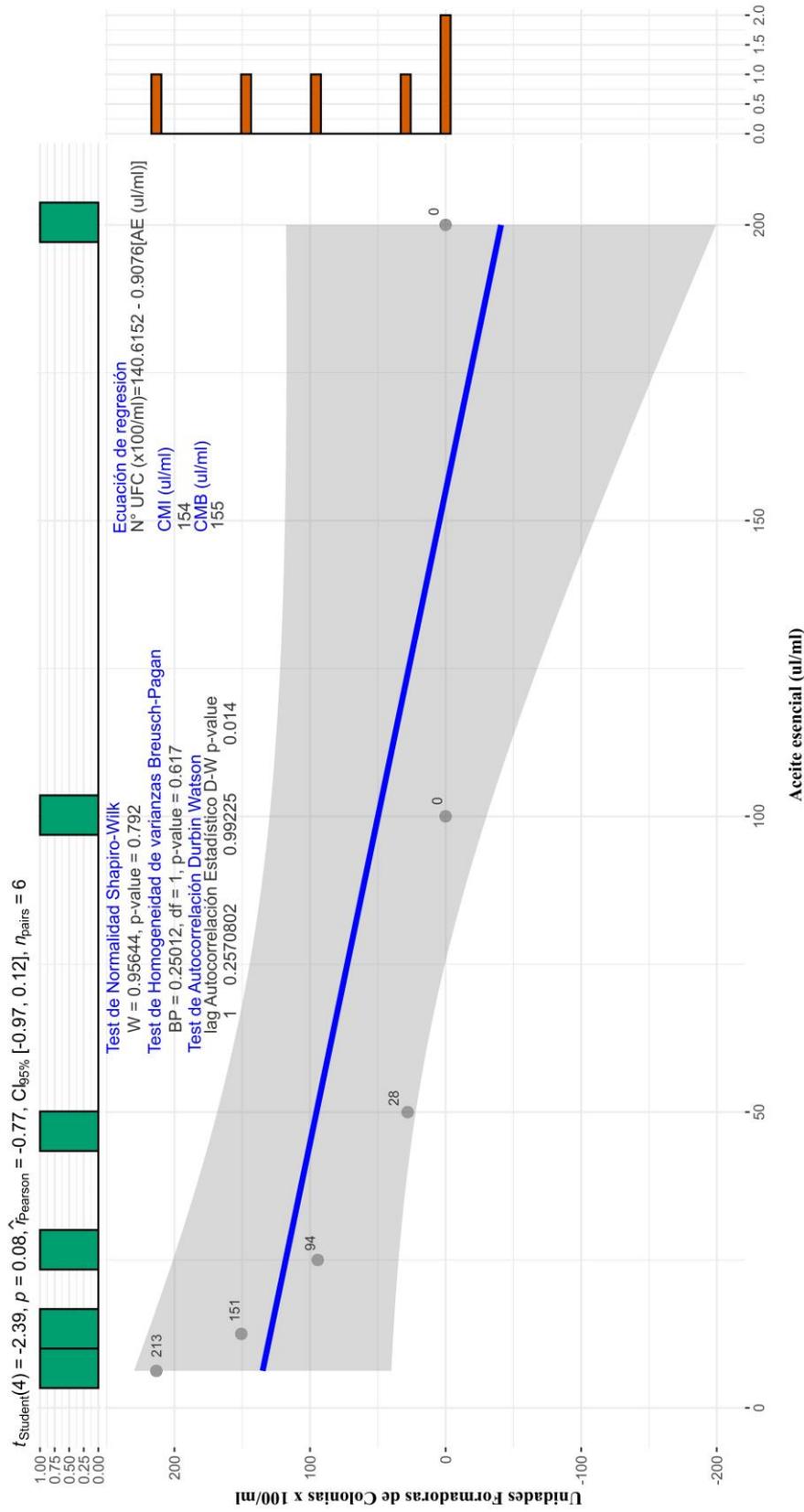
El estudio de la composición química del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* ha sido estudiado utilizando cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en diversos países de todo el mundo (Hsu *et al.*, 2022). De este modo se comprobaría que los aceites esenciales están compuestos de varios metabolitos volátiles, hidrocarbonados, resaltando en la presente investigación los terpenos con anillos aromáticos como el careno (perteneciente al grupo de los caranos), donde la hidrofobicidad del aceite esencial tendría la potencialidad de actuar en los lípidos de la membrana plasmática bacteriana o mitocondrias, deteriorando funcionalmente estas estructuras, al promover un aumento de la permeabilidad a los protones lo que explicaría su uso farmacológico en el campo de la salud (De Sousa *et al.*, 2023).



4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes

4.2.1 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes mediante la técnica de macrodilución en caldo

Figura 5
Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento bacteriano (UFC x 100/ml) de Pseudomonas aeruginosa y la concentración de aceite esencial de hojas y parte aérea de Dysphania ambrosioides



Nota: $\hat{r}_{Pearson}$ = estimador del coeficiente de correlación, n_{pairs} = número de pares de datos, p = probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera siendo el nivel de significancia igual a 0.05 (significativo), $\mu/l/ml$ = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida

Fuente: Programa R 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) -- "Race for Your Life"



En la Figura 5, se ve a través del análisis de regresión y correlación lineal, que existe una buena correlación negativa ($r=-0.77$), así como un coeficiente de la pendiente β_1 de la ecuación de regresión lineal que no fue estadísticamente significativa, sin embargo, se pudo encontrar que el CMI y CMB frente a *Pseudomonas aeruginosa* para el AE de hojas y partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* fue de 154 y 155 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) reportada por Fatokun *et al.* (2019) para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* demostró actividad antibacteriana a 10 $\mu\text{l/ml}$, inhibiendo el crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Sobre esto, algunos estudios señalan que las bacterias Gram negativas son menos sensibles que las Gram positivas, debido a su contenido rico en lipopolisacáridos en la pared celular, lo que reduce el grado de absorción de agentes antimicrobianos (Santiago *et al.*, 2016).

De otro lado, Mokni *et al.* (2019) evaluaron las actividades antimicrobianas mediante el método de microdilución, determinando un fuerte efecto inhibitorio sobre la proliferación de *Pseudomonas aeruginosa*, con un CMI de 0.019 mg/ml. Asimismo, los valores obtenidos por Alitonou *et al.* (2012) para el CMI indicaron que las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* fueron inhibidas a la concentración de 10 mg/ml, concentración muy grande comparada con la de la presente investigación.

No obstante, en otro estudio desarrollado por Almeida *et al.*, (2019) señalan que el aceite esencial no presentó actividad antibacteriana en concentraciones clínicamente relevantes para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ya que su CMI fue $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$, Mientras que para las



cepas multirresistentes, el aceite mostró una actividad antibacteriana moderada frente a *Pseudomonas aeruginosa* con una CMI de 512 µg/ml.

Los resultados obtenidos por Cabrera (2017) al evaluar el efecto del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* revelaron que *Pseudomonas aeruginosa* no fue sensible a ninguna de las concentraciones probadas, siendo mayor a 10mg/dl.

Según Bakkali *et al.* (2008) aún no se comprende completamente el mecanismo de acción de los terpenos, pero se sabe que está vinculado a la ruptura de la membrana plasmática debido a su naturaleza lipofílica. Además, Velluti *et al.* (2003) sugieren que la actividad antibacteriana de los compuestos hidroxilo en los aceites esenciales podría relacionarse con la formación de enlaces de hidrógeno que potencialmente interactúan con los sitios activos de las enzimas bacterianas.

Y concerniente al principal principio activo como es el careno, se ha registrado por ejemplo que el 3-careno produce varios efectos en *Pseudomonas fragi* reduciendo la cantidad de fosfolípidos y la fluidez de la membrana celular, lo que dificultaría su funcionamiento normal. Además, provocaría la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas altamente reactivas causando daño celular. También afecta a enzimas importantes en la cadena respiratoria, como la oxoglutarato deshidrogenasa y citrato sintasa, lo que altera el proceso de producción de energía en la bacteria (Tang *et al.*, 2022).

De otro lado, el mecanismo antibacteriano del 3-careno contra *Pseudomonas lundensis* al parecer causa daños en la morfología celular comprometiendo la permeabilidad e integridad de la membrana celular, lo que resultó en la liberación de biomacromoléculas e iones hacia el medio extracelular.



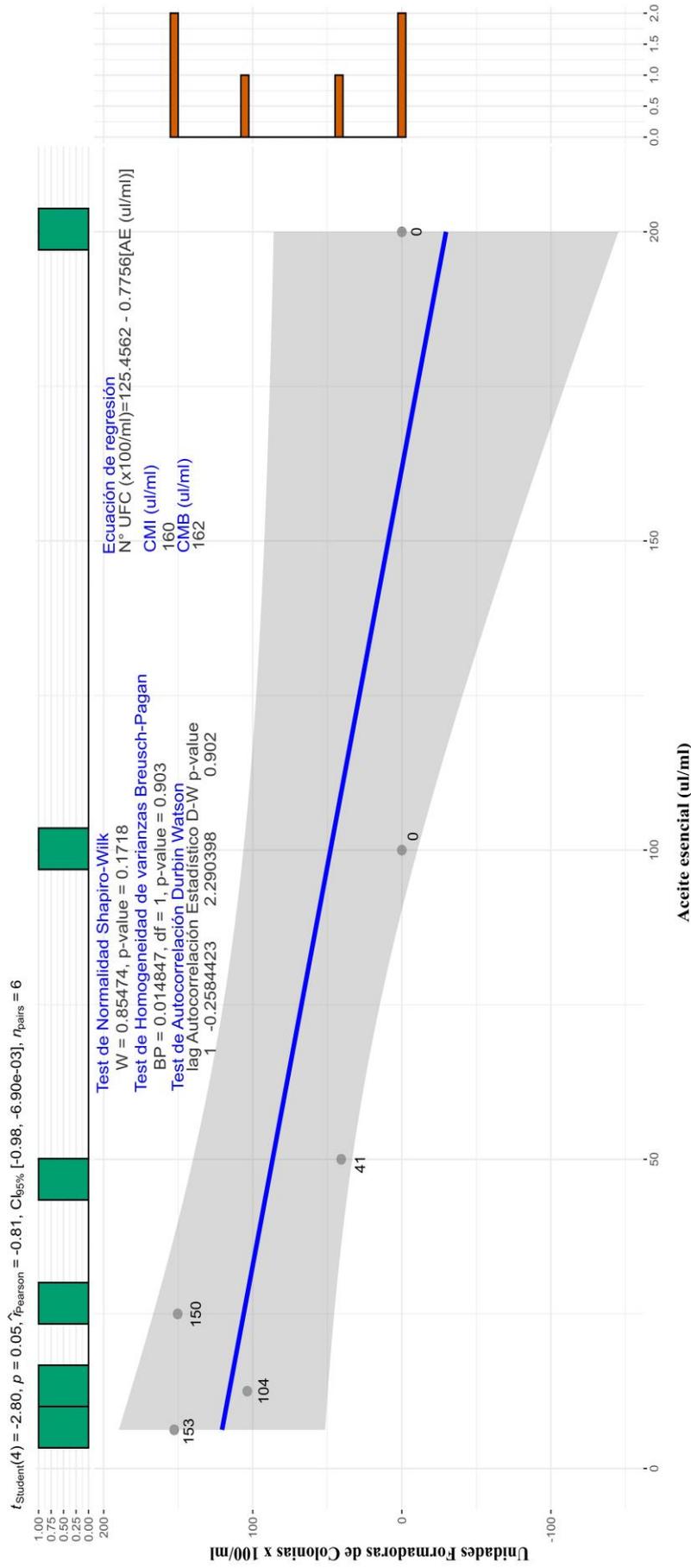
También, se puede observar un desequilibrio en la regulación de la ATPasa, lo que afecta la homeostasis iónica llevando a la inhibición del metabolismo bacteriano. Se postula que el mecanismo subyacente que afecta tanto la estructura como el metabolismo de *P. lundensis* podría estar relacionado con la interacción del 3-careno con tres posibles proteínas objetivo (MurA, OmpW y AtpD) mediante interacciones hidrofóbicas (Tang *et al.*, 2021).

También se informa que el 3-careno exhibe una notable actividad inhibitoria contra *Pseudomonas fluorescens*, al retardar su crecimiento y eventualmente causar su muerte, afectando la morfología y funciones celulares al comprometer la integridad de la pared celular y membrana, provocando la liberación de macromoléculas intracelulares como proteínas e iones potasio. Además, interfiere con el ciclo del ácido tricarboxílico y enzimas glucolíticas intracelulares, alterando la síntesis y descomposición de ATP ocasionando disfunción metabólica. También se encontró que el 3-careno se une al ADN, afectando la expresión génica (Shu *et al.*, 2019).

Estos hallazgos proporcionan una nueva visión sobre los mecanismos antimicrobianos del 3-careno en *Pseudomonas fluorescens* (Shu *et al.*, 2020).

Figura 6

Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento bacteriano (UFC x 100/ml) de Staphylococcus aureus y la concentración de aceite esencial de hojas de Dysphania ambrosioides



Nota: $\hat{r}_{Pearson}$ = estimador del coeficiente de correlación, n_{pairs} = número de pares de datos, p = probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es verdadera siendo el nivel de significancia igual a 0.05 (significativo), $\mu l/ml$ = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, df = grados de libertad, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida
Fuente: Programa R 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) -- "Race for Your Life"



En la Figura 6, se ve a través del análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación negativa ($r=-0.81$), así como un coeficiente de la pendiente β_1 de la ecuación de regresión lineal que sí fue estadísticamente significativa, además, se pudo determinar que el CMI y CMB sobre *Staphylococcus aureus* para el AE de hojas y partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* fue de 160 y 162 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente.

Kandsi *et al.* (2022) utilizando el método de microdilución reportaron una actividad inhibidora significativa para *Staphylococcus aureus*, siendo la CMI de 12.0 a 110.0 $\mu\text{g/ml}$ y la CMB de 18.0 a 110.0 $\mu\text{g/ml}$; asimismo se observó que el aceite de la flor y tallo tenían una actividad antibacteriana más alta con un CMI de 12 y 18 $\mu\text{g/ml}$ y un CMB de 18 $\mu\text{g/ml}$ (en ambas partes de la planta), mientras que el aceite de la hoja tenía el potencial antibacteriano más bajo con un CMI de 110.0 $\mu\text{g/ml}$ y un CMB de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Baumgart (2014) en su estudio microbiológico sobre el aceite esencial de hojas de *Dysphania ambrosioides* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P no halló actividad antibacteriana, tanto así que a una CMI de 1024 $\mu\text{g/ml}$ se consideró inactiva contra este microorganismo.

Fatokun *et al.* (2019) por su parte demostraron para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* que tenía actividad antibacteriana con un CMI de 10 $\mu\text{l/ml}$, inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Estos hallazgos contrastan con los de Owolabia *et al.* (2009), quienes no encontraron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, Santiago *et al.* (2016) reportaron propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* contra esta bacteria, aunque con valores CIM más elevados que los encontrados en



nuestra investigación. Entre los factores que influirían estas propiedades, según Santiago *et al.* (2016) se encuentran el isomerismo, las propiedades sinérgicas de los constituyentes y la lipofilidad de los compuestos.

Los valores obtenidos por Alitonou *et al.* (2012) para la CMI indicaron que *Staphylococcus aureus* es inhibida a moderadas concentraciones, las cuales están a 1.56-1.71mg/ml.

Para Almeida *et al.* (Almeida Bezerra et al., 2019) el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* demostró actividad antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en cepas multidrogoresistentes, el aceite no mostró actividad a bajas concentraciones tales como *Staphylococcus aureus* con una CMI $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos por Cabrera (2017) al evaluar el efecto del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* sobre *Staphylococcus aureus* no mostró actividad frente a ninguna de las concentraciones probadas, siendo mayores a 10 mg/dl.

Como menciona Santiago *et al.* (2016) la CMI del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas como al *Staphylococcus aureus* a 62.5 $\mu\text{g/dl}$.

Y siendo que el careno, fue el principal metabolito encontrado, se ha determinado que por ejemplo un compuesto similar como el 3-careno también inhibiría fuertemente la formación de biofilm en *S. aureus* (Peng *et al.*, 2018).

Sobre esto, Montanari *et al.* (2012) informaron que el 3-careno podría inhibir el crecimiento de bacterias patógenas alimentarias como *Staphylococcus*

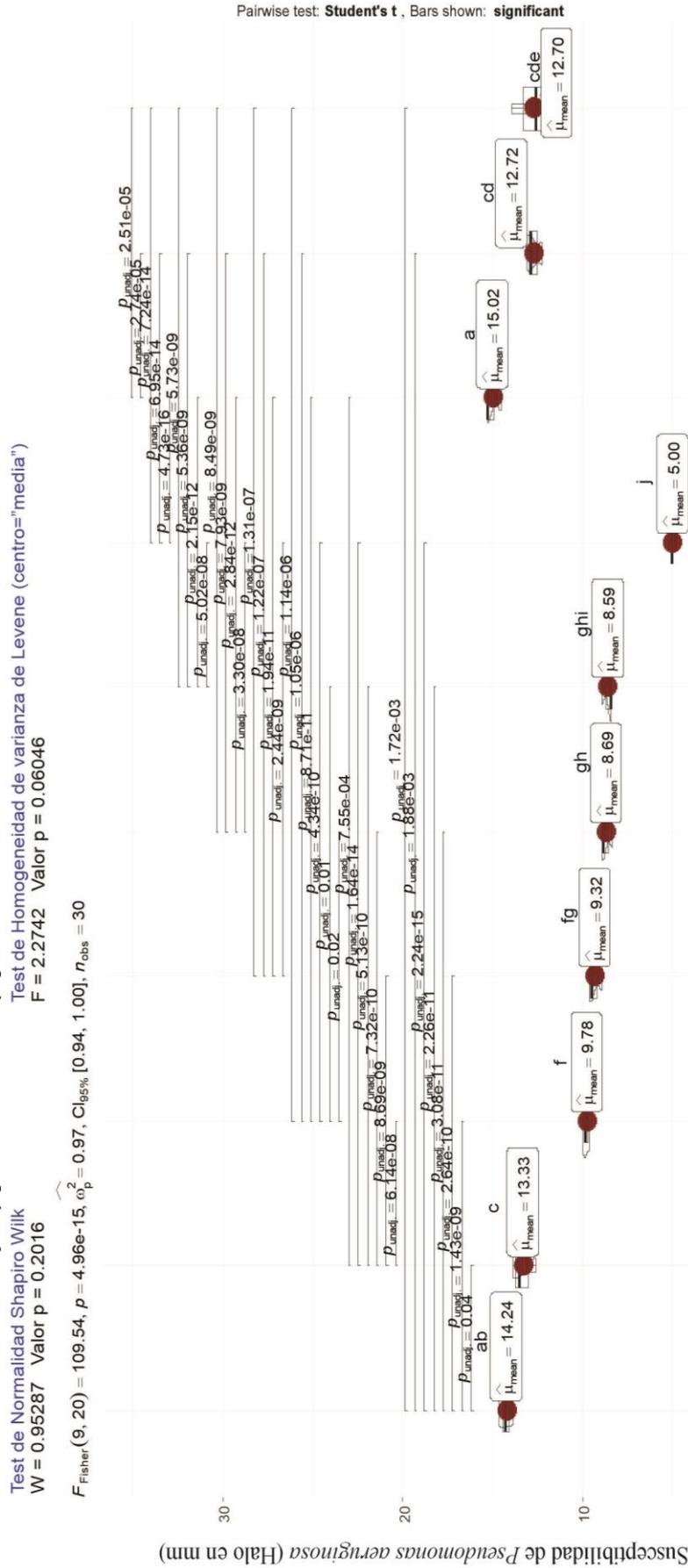


aureus, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* como lo reportado para el aceite de *M. urundeuva* que tiene un alto contenido de 3-careno (78.8 %) el cual podría inducir la peroxidación lipídica.

Asimismo, respecto a la evaluación de seguridad para la salud humana que representa el 3-careno, se considera seguro y no se espera que produzca carcinogenicidad, genotoxicidad, sensibilización cutánea y fototoxicidad (Api *et al.*, 2018).

4.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes mediante el método de Kirby-Bauer

Figura 7
Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en Pseudomonas aeruginosa por efecto del aceite esencial de hojas y parte aérea de Dysphania ambrosioides



Nota: CN=Control Negativo (Tween 80), CP_Clor=Control Positivo de Clorhexidina, CP_Eta=Control Positivo Etanol 70%, CP_Gen=Control Positivo de Gentamicina 10 µg, a...f= Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples, $\hat{\omega}_{mean}$ = estimador de la media, n = número de unidades experimentales, F_{Fisher} =estadístico F de Fisher, $\hat{\omega}_p^2$ =omega parcial al cuadrado, p=probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el nivel de significancia de 0.05 (significativo), % =porcentaje, $CI_{95\%}$ =Intervalo de Confianza al 95%

Fuente: Programa R 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) -- "Race for Your Life"



En la Figura 7, se aprecia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceite esencial de hojas de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* a través del análisis de varianza de Fisher ($F_{Fisher} = 109.54; p = 4.96 \times 10^{-15}$ n= 30), en la que el 97% ($\hat{\omega}_p^2 = 0.97$, IC₉₅ 0.94-1.00) del efecto del tratamiento explica la inhibición de crecimiento bacteriano. Asimismo, a través de la prueba de especificidad de T Student se halló que existe efecto significativo a 200 $\mu\text{l/ml}^{\text{ab}}$ de AE de hojas de *Dysphania ambrosioides* en la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (14.24 mm) comparado con la clorhexidina^a (15.02 mm), presentando mejor efecto que el etanol de 70^{ocd}, siendo incluso mucho mejor que la gentamicina de 10 μg^{cde} .

Concerniente a esto Fatokun *et al.* (2019) en Nigeria, encontraron para aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* que los diámetros de inhibición iban de 8 a 11 mm en promedio por la técnica de discos de difusión a concentraciones de 100 a 200 $\mu\text{l/ml}$, no teniendo actividad a 10 $\mu\text{l/ml}$.

Según los resultados obtenidos por Alitonou *et al.* (2012) sobre el análisis del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* var. *ambrosioides*, originario de Beni, Brasil, si reveló un efecto inhibitorio contra *Pseudomonas aeruginosa*, con un diámetro promedio de zona de inhibición de 7.17 ± 0.44 mm.

Diferentes estudios han evidenciado que los monoterpenos presentes en los aceites esenciales afectan la integridad celular bacteriana, lo que conlleva a la inhibición de la respiración y cambios en la permeabilidad (Okoh *et al.*, 2010). La acción antibacteriana del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* se atribuiría a sus compuestos monoterpénicos, como el p-cimeno, el α -terpineno y el 2-careno,



los cuales han demostrado tener poderosas propiedades antimicrobianas en investigaciones previas (Okoh *et al.*, 2010).

El aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* procedente de Nigeria, que contiene principalmente α -terpineno, no exhibió efecto antibacteriano ante la bacteria Gram-negativa como *Escherichia coli* (Owolabia *et al.*, 2009). Sin embargo, el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* de Egipto, caracterizado por su contenido de o-cimeno y α -terpineno, sí mostró una marcada actividad antibacteriana frente *Escherichia coli* (Santiago *et al.*, 2016).

De otro lado, el estudio sobre bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* realizado por Cabrera (2017) demuestra que la concentración de 20 μ l/ml, de aceite esencial exhibió una gran capacidad inhibitoria, con un diámetro de zona de inhibición de 20 mm y la concentración de 1000 μ l /ml, también demostró un efecto notable, con un diámetro de zona de inhibición de 18.6 mm y además a una concentración de 10 μ l/ ml, se registró un diámetro de zona de inhibición de 13.5 mm, e incluso la concentración más baja 5 μ l/ μ l, generó un diámetro de zona de inhibición de 9.3 mm.

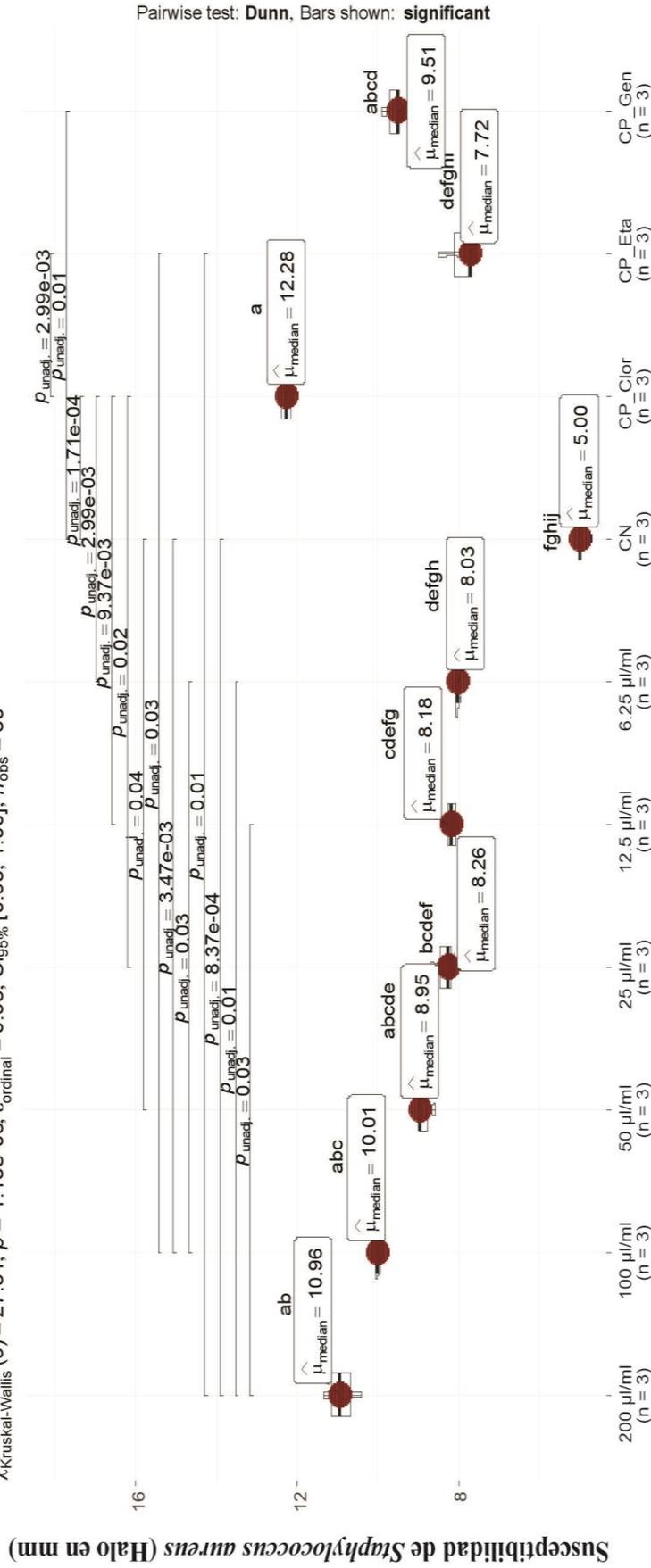
Figura 8

Análisis de variabilidad de Kruskal Wallis y prueba comparaciones múltiples de Dunn de la susceptibilidad en Staphylococcus aureus por efecto del aceite esencial de hojas y parte aérea de Dysphania ambrosioides

Test de Normalidad Shapiro Wilk
W = 0.97617 Valor p = 0.7172

Test de Homogeneidad de varianza de Levene (centro="media")
F = 3.1487 Valor p = 0.01564

$\chi^2_{Kruskal-Wallis} (9) = 27.51, p = 1.15e-03, \hat{\epsilon}^2_{ordinal} = 0.95, CI_{95\%} [0.95, 1.00], n_{obs} = 30$



Tratamiento

Nota: CN=Control Negativo (Tween 80), CP_Clor=Control Positivo de Clorhexidina, CP_Eta=Control Positivo Etanol 70%, CP_Gen=Control Positivo de Gentamicina 10 µg, $\hat{\mu}_{median}$ = estimador de la mediana, n = número de unidades experimentales, $\chi^2_{Kruskal-Wallis}$ = estadístico de Kruskal Wallis, $\hat{\epsilon}^2_{ordinal}$ = rango épsilon al cuadrado, p = probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el nivel de significancia igual a 0.05 (significativo), µ/ml = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, a, b, ... = letras de significancia que indican la importancia del tratamiento con un nivel de significancia de 5%

Fuente: Programa R 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) -- "Race for Your Life"

En la Figura 8, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceite esencial de hojas y partes aéreas de *Dysphania ambrosioides* sobre *Staphylococcus aureus* mediante la prueba de Kruskal Wallis ($\chi^2_{Kruskal Wallis} = 27.51$; $p = 1.15 \times 10^{-3}$), en la que el 95% ($\hat{e}^2_{ordinal} = 0.95$, IC₉₅ 0.95-1.00) del efecto del tratamiento explica la inhibición del crecimiento bacteriano. Asimismo, a través de la prueba de especificidad de Dunn se encontró que existe efecto significativo de 200^{ab} y 100^{abc} µl/ml del AE de *Dysphania ambrosioides* en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* comparado con el control positivo de la clorhexidina^a, teniendo un mejor efecto sobre el etanol de 70^{odefghi} y siendo levemente mejor que la Gentamicina de 10 µg^{abcd}.

Una correlación entre la actividad antibacteriana de los aceites de *Dysphania ambrosioides* en este trabajo y su valor p sugiere que la actividad de los aceites podría atribuirse a la presencia de sus componentes principales del aceite esencial (careno, cimeno y terpineno). En cuanto a las propiedades antibacterianas de los aceites de *Dysphania ambrosioides*, Kandsi *et al.* (2022) encontraron para *Staphylococcus aureus* que los diámetros de inhibición del aceite de partes aéreas van de 15 a 20 mm en promedio por la técnica de difusión por pozo a excepción del aceite proveniente de las flores que mostró una acción moderadamente sensible (10 mm).

En relación con las propiedades antibacterianas de los aceites de *Dysphania ambrosioides*, en el estudio de Fatokun *et al.* (2019) hallaron que para *Staphylococcus aureus*, los diámetros de inhibición oscilaban entre 9 y 30 mm en promedio mediante la técnica de difusión, dependiendo de las concentraciones



utilizadas, que van desde 100 hasta 200 $\mu\text{l/ml}$. Sin embargo, no se observó actividad a una concentración de 10 $\mu\text{l/ml}$.

Según los resultados obtenidos por Alitonou *et al.* (2012) sobre el análisis del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides var. ambrosioides*, originario de Beni, Brasil, reveló un efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, con un diámetro promedio de zona de inhibición de 21.50 ± 2.60 mm.

Es importante destacar que los aceites esenciales se caracterizan por su naturaleza hidrofóbica, lo que les permite penetrar en las membranas celulares bacterianas y mitocondriales, alterando su estructura y aumentando su permeabilidad a moléculas críticas, lo que finalmente conduce a la muerte de las células bacterianas (Fadli *et al.*, 2012). Por otro lado, el p-cimeno y el α -terpineno han sido identificados como agentes responsables de la ruptura de las membranas bacterianas en diversas investigaciones (Langeveld *et al.*, 2014).

de Morais *et al.* (2018) evaluaron el efecto del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* en cepas de *Staphylococcus aureus* que tenían la bomba de eflujo NorA. Su estudio reveló que el aceite solo no pudo detener el crecimiento bacteriano, este resultado sugiere que la actividad de la bomba de eflujo podría haber eliminado del interior celular los compuestos fitoquímicos que lograron penetrar la pared y la membrana celular.

El aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* procedente de Nigeria, que contiene principalmente α -terpineno, no exhibió efecto antibacteriano contra cepas Gram-positivas como el *Staphylococcus aureus* (Owolabia *et al.*, 2009). Por otro lado, el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* de Egipto,



caracterizado por tener o-cimeno y α -terpineno, mostró una marcada actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* (Harraz *et al.*, 2014).

El análisis de los aceites esenciales realizado por Aquino (2017) en Puno quien reveló que la concentración de 20 μ l produjo una zona de inhibición de 13.6 mm, con un porcentaje de inhibición del 85.42%, asimismo la concentración de 1 ml mostró un efecto intermedio, con una zona de inhibición de 12.8 mm y un porcentaje de inhibición del 80.21%. Por otro lado, las concentraciones de 10 μ l (10.8 mm) y 5 μ l (8.6 mm) resultaron en zonas de inhibición más pequeñas, con porcentajes de inhibición de 67.71% y 54.17%, respectivamente.

En general, lo encontrado aquí para el aceite esencial de paico tiene una composición similar a la encontrada por Kandsi *et al.* (2022) por lo cual podría tener afinidad por la ADN girasa topoisomerasa II la cual regula el estado topológico del ADN bacteriano, así también actuaría sobre la proteína transportadora de enoil-acilo reductasa (FabI), una enzima crítica en el proceso de síntesis de ácidos grasos, concretamente en la sintasa de ácidos grasos tipo II, en la que FabI cataliza el paso final necesario para completar el ciclo, especialmente durante la fase de elongación de la síntesis de ácidos grasos; y también tendría efecto sobre la vía biosintética de la hexosamina (HBP), al inhibir a la glucosamina-6-fosfato sintasa, conocida como glmS la cual convierte la fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) y la glutamina a glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P) siendo una enzima clave en la producción de UDP-N-acetilglucosamina, un componente importante del peptidoglucano de la pared celular bacteriana.



V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* tiene 30 compuestos volátiles de los cuales 20 son los principales representando ~95%, con predominio de (+)-2-careno (44%), (+)-4-careno (26%) y m-cimeno (20%), correspondiendo al grupo de los monoterpenos que representan el 65% de los metabolitos secundarios.
- El aceite esencial de hojas de *Dysphania ambrosioides* tuvo efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con un halo de inhibición de 14.24 mm a 200^a µl/ml ($p < 0.05$), además se observó un efecto similar en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* a 200^{ab} y 100^{abc} µl/ml (10.96 mm y 10.01 mm de halos de inhibición respectivamente) ($p < 0.05$), siendo estadísticamente superior al control positivo de la clorhexidina^a. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) frente a *Pseudomonas aeruginosa* fueron de 154 y 155 µl/ml ($r = -0.77$), respectivamente, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue de 160 y 162 µl/ml ($r = -0.81$), respectivamente.
- Los monoterpenos como él (+)-2-careno siendo el componente principal presente en el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* exhibiría actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistente aislados de secreción bronquial y esputo respectivamente, en relación a patologías comunes.



VI. RECOMENDACIONES

- Investigar los mecanismos de acción de los compuestos predominantes, como el (+)-2-careno, (+)-4-careno y m-cimeno, para comprender su actividad antibacteriana, antifúngica y otras propiedades farmacológicas relevantes del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*.
- Realizar estudios de formulación de productos farmacéuticos o cosméticos basados en el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*, aprovechando su potencial terapéutico y sus propiedades antimicrobianas.
- Evaluar la actividad del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* en modelos animales o ensayos clínicos para confirmar su eficacia y seguridad en el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- Explorar otras aplicaciones potenciales del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* en áreas como la agricultura (como biopesticida), la alimentación (como conservante natural) o la aromaterapia (para el bienestar emocional y mental).
- Investigar la posibilidad de optimizar los métodos de extracción y purificación del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* para mejorar su rendimiento y calidad, así como reducir los costos de producción.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdoul-Latif, F. M., Elmi, A., Merito, A., Nour, M., Risler, A., Ainane, A., Bignon, J., & Ainane, T. (2022). Essential Oils of *Tagetes minuta* and *Lavandula coronopifolia* from Djibouti: Chemical Composition, Antibacterial Activity and Cytotoxic Activity against Various Human Cancer Cell Lines. In *International Journal of Plant Biology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 315–329). <https://doi.org/10.3390/ijpb13030026>
- Acostupa, F. M. (2020). *Efecto gastroprotector y antisecretorio del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (L.), (paico) en ratas con inducción de lesiones gástricas por indometacina y ligado pilórico*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ait Sidi Brahim, M., Fadli, M., Hassani, L., Boulay, B., Markouk, M., Bekkouche, K., Abbad, A., Ait Ali, M., & Larhsini, M. (2015). *Chenopodium ambrosioides* var. *ambrosioides* used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 71, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.067>
- Al-kaf, A. G., Crouch, R. A., Denkert, A., Porzel, A., Al-Hawshabi, O. S., Ali, N. A. A., Setzer, W. N., & Wessjohann, L. (2016). Chemical composition and biological activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* from Yemen. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(1), 20–22.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 128(6), 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Ali, N., Nabi, M., Shoaib, M., Shah, I., Ahmed, G., Shakirullah, Ziauddin, Ali Shah, S. W., Ghias, M., Khan, S., & Ali, W. (2021). GC/MS analysis, anti-leishmanial and relaxant activity of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* (L.) from Malakand region. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(2), 577–583. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2021.34.2.REG.577-583.1>
- Alitonou, G. A., Sessou, P., Tchobo, F. P., Noudogbessi, J. P., Avlessi, F., Ou, B. Y.,



- Menut, C., Villeneuve, P., & Sohounhloue, D. C. K. (2012). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. *International Journal of Biosciences*, 2(8), 58–66.
- Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, 136, 103716. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716>
- Almeida Bezerra, J. W., Rodrigues Costa, A., de Freitas, M. A., Rodrigues, F. C., de Souza, M. A., da Silva, A. R. P., dos Santos, A. T. L., Vieiralves Linhares, K., Melo Coutinho, H. D., de Lima Silva, J. R., & Bezerra Morais-Braga, M. F. (2019). Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65(April), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.04.010>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Angeles Argudín, M., Roisin, S., Nienhaus, L., Dodémont, M., De Mendonça, R., Nonhoff, C., Deplano, A., & Denisa, O. (2018). Genetic diversity among staphylococcus aureus isolates showing oxacillin and/or cefoxitin resistance not linked to the presence of mec genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7), 1–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00091-18>
- Api, A. M., Belmonte, F., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G. A., Buschmann, J., Dagli, M. L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Fryer, A. D., Gadhia, S., Jones, L., Joshi, K., La Cava, S., Lapczynski, A., Lavelle, M., Liebler, D. C., ... Tsang, S. (2018). RIFM fragrance ingredient safety assessment, δ -3-carene, CAS Registry Number 13466-78-9. *Food and Chemical Toxicology*, 122, S771–S779. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.049>
- Aquino, E. (2017a). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* SOBRE*



BACTERIAS GRAM NEGATIVAS Staphylococcus aureus Y SU TOXICIDAD EN Artemia salina. PRESENTADO [Universidad Nacional del Altiplano]. http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/6069/Aquino_Apaza_Edwin.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Aquino, E. (2017b). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de Chenopodium ambrosioides, Artemisia absinthium, Caiophora cirsiifolia sobre bacterias gram negativas Staphylococcus aureus y su toxicidad en Artemia salina*. Universidad Nacional del Altiplano.

Ávila-Blanco, M. E., Rodríguez, M. G., Moreno Duque, J. L., Muñoz-Ortega, M., & Ventura-Juárez, J. (2014). Amoebicidal Activity of Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an Amoebic Liver Abscess Hamster Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 930208. <https://doi.org/10.1155/2014/930208>

Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F., & Hiramatsu, K. (2008). Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: Polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 300–310. <https://doi.org/10.1128/JB.01000-07>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Bay, D. C., Rommens, K. L., & Turner, R. J. (2008). Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1814–1838. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.015>

Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., & Plésiat, P. (2015). Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6248–6255. <https://doi.org/10.1128/AAC.00825-15>



- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Boutkhil, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., Chbicheb, A., Chakir, S., & El Badaoui, K. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Acta Botanica Gallica*, 156(2), 201–209. <https://doi.org/10.1080/12538078.2009.10516151>
- British Broadcasting Corporation. (2022). “*Pandemia silenciosa*”: las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos matan más personas que la malaria y el sida - *BBC News Mundo*.
- Budeguer, C. J., Ponessa, G. I., Arce, O. E., & Ruiz, A. I. (2012). Morfología y anatomía foliar de *Dysphania ambrosioides* (Chenopodiaceae) en la provincia de Tucumán. *Revta. Agron. N. O. Argent.*, 32(1–2), 9–15.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cabrejos-Hirashima, L., Vives-Kufoy, C., Inga-Salazar, Jaycia Astocondor, Lizeth Hinostroza, N., & García, C. (2021). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente adquirido en la comunidad en un hospital de tercer nivel en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 38(2), 313–317. <https://doi.org/https://scielosp.org/pdf/rpmesp/2021.v38n2/313-317/es>
- Cabrera, Y. (2017a). *Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides (Paico) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cabrera, Y. (2017b). *Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides (Paico) de la provincia de Loja*. La Universidad Católica de Loja.



- Cavalli, J. F., Tomi, F., Bernardini, A. F., & Casanova, J. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*, 15(5), 275–279. <https://doi.org/10.1002/pca.761>
- Chekem, M. S. G., Lunga, P. K., Tamokou, J. de D., Kuate, J. R., Tane, P., Vilarem, G., & Cerny, M. (2010). Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against candida species. *Pharmaceuticals*, 3(9), 2900–2909. <https://doi.org/10.3390/ph3092900>
- Chu, S. S., Feng Hu, J., & Liu, Z. L. (2011). Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, 67(6), 714–718. <https://doi.org/10.1002/ps.2112>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *M07: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
- Colca, J. R., McDonald, W. G., Waldon, D. J., Thomasco, L. M., Gadwood, R. C., Lund, E. T., Cavey, G. S., Mathews, W. R., Adams, L. D., Cecil, E. T., Pearson, J. D., Bock, J. H., Mott, J. E., Shinabarger, D. L., Xiong, L., & Mankin, A. S. (2003). Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21972–21979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302109200>
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(SUPPL. 1), 25–34. <https://doi.org/10.1086/491711>
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Cubides, J., & Sarmiento, F. (2022). *Evaluación de formulaciones a base de Chenopodium ambrosioides o sus metabolitos secundarios en el modelo experimental de leishmaniasis cutánea*. Universidad Industrial de Santander.
- D'Aquila, P., Papparazzo, E., Crudo, M., Bonacci, S., Procopio, A., Passarino, G., &



- Bellizzi, D. (2022). Antibacterial Activity and Epigenetic Remodeling of Essential Oils from Calabrian Aromatic Plants. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/nu14020391>
- Da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., & Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, *176*, 108463. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>
- Damasceno, R. (2013). *Estudo farmacognóstico de Chenopodium ambrosioides L. (Chenopodiaceae)* (Vol. 1). Universidad Federal de Pernambuco.
- Davies, P. (2004). La conservación mediante el secado. *Estudios En Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas*, *1*, 201–204.
- De Moraes Oliveira-Tintino, C. D., Tintino, S. R., Limaverde, P. W., Figueredo, F. G., Campina, F. F., da Cunha, F. A. B., da Costa, R. H. S., Pereira, P. S., Lima, L. F., de Matos, Y. M. L. S., Coutinho, H. D. M., Siqueira-Júnior, J. P., Balbino, V. Q., & da Silva, T. G. (2018). Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and α -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. *Food Chemistry*, *262*(April), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.040>
- De Sousa, D. P., Damasceno, R. O. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*, *13*(7), 1144. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>
- Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, *70*(15–16), 1621–1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Degenhardt, R. T., Farias, I. V., Grassi, L. T., Franchi, G. C., Nowill, A. E., Bittencourt, C. M. d. S., Wagner, T. M., de Souza, M. M., Cruz, A. B., & Malheiros, A. (2016). Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.012>



- Ding, C., Yang, Z., Wang, J., Liu, X., Cao, Y., Pan, Y., Han, L., & Zhan, S. (2016). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 49, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.06.014>
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351–368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- Džidić, S., Šušković, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 11–21.
- EPA. (2016). *Standard Operating Procedure for VITEK 2 Compact: Use, Maintenance and Quality Control Procedures*.
- Eslahi, H., Fahimi, N., & Sardarian, A. R. (2018). Chemical Composition of Essential Oils: Chemistry, Safety and Applications. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*, 119–171.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pags, J. M., & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 19(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>
- Faleiro M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. In *In Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (pp. 1143–1156).
- Fatokun, O. T., Diyaolu, A. H., Esiebo, K. B., Adamu, A., Aboh, M. O., & Okhale, S. E. (2019). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants from North Central Nigeria. *Journal of Phytomedicine and Therapeutics*, 18(2), 304–313.
- Fernández Álvarez, M., & Potel Alvarellos, C. (2017). *Factores asociados a la selección clonal de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina y quinolonas*. Universida



de Vigo.

- Fernandez, R., & Serrano, C. (2018). *Guía terapéutica antimicrobiana del Area Aljarafe* (3rd ed., Vol. 1999, Issue December). Distrito Sanitario Aljarafe.
- Fretes, F. (2010). Plantas Medicinales Y Aromáticas: una alternativa de producción comercial. *Agencia Del Gobierno de Los Estados Unidos Para El Desarrollo Internacional (USAID)*, 60.
- Gadano, A., Gurni, A., López, P., Ferraro, G., & Carballo, M. (2002). In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00418-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00418-4)
- García-Álvarez, L., Holden, M. T. G., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F. J., Curran, M. D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D. J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S. D., Edwards, G. F., Girvan, E. K., Kearns, A. M., Pichon, B., Hill, R. L. R., Larsen, A. R., Skov, R. L., ... Holmes, M. A. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
- Giedraitiene, A., Vitkauskiene, A., Naginiene, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*, 47(3), 137–146. <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>
- Greninger, A. L., Chatterjee, S. S., Chan, L. C., Hamilton, S. M., Chambers, H. F., & Chiu, C. Y. (2016). Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to fifth-generation cephalosporins reveals potential non-*mecA* mechanisms of resistance. *PLoS ONE*, 11(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149541>
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 221–228. <https://doi.org/10.1128/AAC.01252-13>
- Gupta, D., Charles, R., Mehta, V. K., Garg, S. N., & Kumar, S. (2002). Chemical



- examination of the essential oil of chenopodium ambrosioides L. From the southern hills of India. *Journal of Essential Oil Research*, 14(2), 93–94. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699780>
- Gutierrez, C. (2017). *Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de paico (Chenopodium ambrosioides), khoa (Clinopodium bolivianum) y ruda (Ruta graveolens) frente a Moniliophthora spp aislada a partir de muestras de cacao con moniliasis, La paz-Bolivia 201*. Universidad Mayor de San Andrés.
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, 122, 35–41.
- Guzmán, E., & Rodríguez, E. (2021). *Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de Chenopodium ambrosioides L “Paico” y Schinus molle “Molle” frente a cepas de “Staphylococcus aureus” 2021*. Universidad Privada de Huancayo “Franklin.”
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Harraz, F. M., Hammoda, H. M., El Ghazouly, M. G., Farag, M. A., El-Aswad, A. F., & Bassam, S. M. (2014). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of Conyza linifolia and Chenopodium ambrosioides. *Natural Product Research*, 29(9), 879–882. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.988714>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. P. (2014). *Metodología de la investigación (6°)*. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.001>
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Infections. *Clinical*



- Microbiology Reviews*, 32(4), e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., & Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>
- Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>
- Hsu, K.-P., Yang, M.-L., Wei, L. Y., Ho, H.-T., & Ho, C.-L. (2022). Chemical Composition and In Vitro Anti-Wood-Decay Fungal Activities of Dysphania ambrosioides Leaf Essential Oil From Taiwan. *Natural Product Communications*, 17(5), 1–7. <https://doi.org/10.1177/1934578X221099971>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society For Microbiology*, 1–23.
- Hüsni, K., Başer, C., & Demirci, F. (2007). Chemistry of essential oils. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, 43–86. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_4
- Ignacchiti, M. D. C., de Queiroz, V. T., Martins, I. V. F., Crico, K. B., Gonçalves, L. V., Fazolo, M. B., Frank, H. O., & Costa, A. V. (2022). Chemical composition and effect of Dysphania ambrosioides (L.) mosyakin & clemants essential oil on Biomphalaria tenagophila (D'Orbigny, 1835). *Natural Product Research*, 36(10), 2595–2598. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1910261>
- Jardim, C. M., Jham, G. N., Dhingra, O. D., & Freire, M. M. (2008). Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian Chenopodium ambrosioides L. *Journal of Chemical Ecology*, 34(9), 1213–1218. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9526-z>
- Johnson, M. A., & Croteau, R. (1984). Biosynthesis of ascaridole: Iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of Chenopodium ambrosioides fruit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,



235(1), 254–266. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90274-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90274-1)

- Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G. (2021). Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. In *Antibiotics (Basel, Switzerland)* (Vol. 10, Issue 4, p. 415). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040415>
- Kandsi, F., Elbouzidi, A., Lafdil, F. Z., Meskali, N., Azghar, A., Addi, M., Hano, C., Maleb, A., & Gseyra, N. (2022). Antibacterial and Antioxidant Activity of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin and Clemants Essential Oils: Experimental and Computational Approaches. *Antibiotics*, *11*(4), 21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040482>
- Kapoor G, Saigal S, E. A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300–305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>
- Kasrati, A., Sakar, E. H., Aljaiyash, A., Hirri, A., Tamegart, L., Abbad, I., & Alaoui Jamali, C. (2024). Chemical Profiling, Insecticidal, and Phytotoxic Effect of Essential Oils from Leaves and Inflorescence of Moroccan *Chenopodium ambrosioides* (L.). *Plants*, *13*(4), 483. <https://doi.org/10.3390/plants13040483>
- Kazi Madina Maraz, & Ruhul Amin Khan. (2021). An overview on impact and application of microorganisms on human health, medicine and environment. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *16*(1), 089–104. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.16.1.0200>
- Kelmani Chandrakanth, R., Raju, S., & Patil, S. A. (2008). Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Current Microbiology*, *56*(6), 558–562. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9123-y>
- Koba, K., Catherine, G., Raynaud, C., Chaumont, J.-P., Sanda, K., & Laurence, N. (2009). Chemical Composition and Cytotoxic Activity of *Chenopodium ambrosioides* L. Essential. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, *44*(4), 435–440. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v44i4.4594>
- Kourtesi, C., Ball, A. R., Huang, Y.-Y., Jachak, S. M., Vera, D. M. A., Khondkar, P.,



- Gibbons, S., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2013). Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. *The Open Microbiology Journal*, 7(1), 34–52. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010034>
- Kulitz, A., Ferreira, D., da Silva, L., Fontes, P., Tebaldi, V., & Vidal, A. (2017). Prospecção fitoquímica das partes aéreas aa erva-de-santa-Maria (*Chenopodium ambrosoides* L.). *XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação*, 1(1), 1–5.
- Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 763–768. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.012>
- Lacerda, L., Barbosa, A., Rodrigues, R., Pereira, L., Silva, F., Sousa, R., Rodrigues, L., Martins, J., Melo, H., Kowalska, G., Hawlena, J., Kowalski, R., Barbosa, R., & Bezerra, F. A. (2021). Myorelaxant effect of the *Dysphania ambrosioides* essential oil on *Sus scrofa domestica* coronary artery and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. *Molecules*, 26(7Martins). <https://doi.org/10.3390/molecules26072041>
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76–94. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>
- Lezama, M. (2019). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de Chenopodium ambrosioides (L.) (PAICO) sobre Staphylococcus aureus*. Universidad Católica Los Angeles de Chimbote.
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001>
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995). Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9), 1948–1953. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.1948>



- Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., Du, Y., Zhao, Y., Qin, X., Zhang, W., & Kong, D. (2023). Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 6, 100210. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100210>
- Liu, W. T., Chen, E. Z., Yang, L., Peng, C., Wang, Q., Xu, Z., & Chen, D. Q. (2021). Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *Microbial Pathogenesis*, 156(April), 104915. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104915>
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C., & Plésiat, P. (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5676–5684. <https://doi.org/10.1128/AAC.00101-11>
- Lohani, H., Chauhan, N. K., Haider, K. K. S. Z., & Andola, H. C. (2012). Comparative aroma profile of wild and cultivated *Chenopodium ambrosioides* L. from Uttarakhand. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(4), 657–661. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644101>
- Lu, H., Jiang, W., Ghiassi, M., Lee, S., & Nitin, M. (2012). Classification of *Camellia* (theaceae) species using leaf architecture variations and pattern recognition techniques. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029704>
- Lubelski, J., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (2007). Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463–476. <https://doi.org/10.1128/mubr.00001-07>
- Malhotra-Kumar, S., Mazzariol, A., Van Heirstraeten, L., Lammens, C., De Rijk, P., Cornaglia, G., & Goossens, H. (2009). Unusual resistance patterns in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* harbouring *erm* (A). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(1), 42–46. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn432>
- Margareta, P., & Lina, J. (2014). Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 569–579.



[https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)

- Martínez Hernández, J. V. (2010). *Estudio de metiltransferasas involucradas en la resistencia a antibióticos en cepas de bacilos gram negativos no fermentadores de origen clínico*. Instituto Politecnico Nacional.
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Mayta-Barrios, M. M., Ramirez-Illescas, J. J., Pampa-Espinoza, L., & Yagui-Moscoso, M. J. A. (2021). Caracterización molecular de carbapenemasas en el Perú durante el 2019. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(1), 113–118. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.5882>
- Meka, V. G., Pillai, S. K., Sakoulas, G., Wennersten, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P. C., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., & Gold, H. S. (2004). Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *Journal of Infectious Diseases*, 190(2), 311–317. <https://doi.org/10.1086/421471>
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Mokni, R. El, Youssef, F. S., Jmii, H., Khmiri, A., Bouazzi, S., Jlassi, I., Jaidane, H., Dhaouadi, H., Ashour, M. L., & Hammami, S. (2019). The Essential Oil of Tunisian *Dysphania ambrosioides* and its Antimicrobial and Antiviral Properties. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22, 14. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1588171>
- Montanari, R. M., Barbosa, L. C. A., Demuner, A. J., Silva, C. J., Andrade, N. J., Ismail, F. M. D., & Barbosa, M. C. A. (2012). Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. *Molecules*, 17(8), 9728–9740. <https://doi.org/10.3390/molecules17089728>
- Montaño Arias, N. M., Sandoval Pérez, A. L., Camargo Ricalde, S. L., & Sánchez Yáñez,



- J. M. L. (2010). Los microorganismos : pequeños gigantes. *Elementos*, 15–23.
- Monzote, L., Nance, M. R., García, M., Scull, R., & Setzer, W. N. (2011). Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Communications*, 6(2), 281–286. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600232>
- Moreillon, P. (2008). New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 3), 32–41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01961.x>
- Mosyakin, S. L., & Clemants, S. E. (2002). New nomenclatural combinations in *Dysphania* R. Br. (Chenopodiaceae): taxa occurring in North America. *Ukrain. Bot. Journ.*, 59(4), 380–385.
- Muhayimana, A., Chalchat, J. C., & Garry, R. P. (1998). Chemical composition of essential oils of *chenopodium ambrosioides* L. From Rwanda. *Journal of Essential Oil Research*, 10(6), 690–692. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9701011>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.*, 4(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Nimer, N. A., Al-Saa'da, R. J., & Abuelaish, O. (2016). Accuracy of the VITEK® 2 system for a rapid and direct identification and susceptibility testing of Gram-negative rods and Gram-positive cocci in blood samples. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 22(3), 193–200. <https://doi.org/10.26719/2016.22.3.193>
- Nonhoff, C., Rottiers, S., & Struelens, M. J. (2005). Evaluation of the Vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(2), 150–153. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01047.x>
- Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., & Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120(1), 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.084>



- Oliveros, M. (2016). *Determinación del rendimiento y caracterización fisicoquímica del aceite esencial de apazote (Chenopodium ambrosioides L.) obtenido de plantas cosechadas en diferentes etapas de desarrollo a nivel laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*.
- Ouadja, B., Katawa, G., Toudji, G. A., Layland, L., Gbekley, E. H., Ritter, M., Anani, K., Ameyapoh, Y., & D. Karou, S. (2021). Anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activities of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) extracts. *Journal of Applied Biosciences*, 162, 16764–16794. <https://doi.org/10.35759/JABs.162.7>
- Owokotomo, I. A. (2022). Chemical Analysis and Antioxidant Studies of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* (L .) Growing Wild in South-West Nigeria. *Nigerian Research Journal of Chemical Sciences*, 10(2), 9–17.
- Owolabi, M. S., Lajide, L., Oladimeji, M. O., Setzer, W. N., Palazzo, M. C., Olowu, R. A., & Ogundajo, A. (2009). Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. *Natural Product Communications*, 4(7), 989–992.
- Owolabia, M. S., Lajideb, L., Oladimejic, M. O., Setzerd, W. N., Palazzod, M. C., Olowua, R. A., & Ogundajo, A. (2009a). Natural Product Communications Volatile Constituents and Antibacterial Screening of the. *Natural Product Communications*, 4(7), 989–992.
- Owolabia, M. S., Lajideb, L., Oladimejic, M. O., Setzerd, W. N., Palazzod, M. C., Olowua, R. A., & Ogundajo, A. (2009b). Volatile Constituents and Antibacterial Screening of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. *Natural Product Communications*, 4(7), 989–992.
- Palomino, J. (2016). *Estudio de las condiciones de secado sobre la cinética de deshidratación de las hojas de Romero (rosmarinus officinalis L.)*. Universidad Privada de Tacna.
- Pasachova, J., Martinez, S., & Munoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus : generalidades*



- , mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–38.
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Mbuntcha, H., Woguem, V., Womeni, H. M., Barboni, L., Tapondjou, L. A., & Benelli, G. (2018). *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10493–10503. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0267-9>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132–1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Peng, L., Xiong, Y., Wang, M., Han, M., Cai, W., & Li, Z. (2018). Chemical composition of essential oil in *Mosla chinensis* Maxim cv. Jiangxiangru and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Open Life Sciences*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0001>
- Pereira, L. P. L. A., Ribeiro, E. C. G., Brito, M. C. A., Araruna, F. O. S., Araruna, F. B., Leite, J. A. C., Silveira, D. P. B., de Oliveira, T. M., Cantanhede, S. P. D., Firmo, W. da C. A., Monteiro, O. dos S., Maia, J. G. S., da Franca Rodrigues, K. A., & Coutinho, D. F. (2022). Molluscicidal and cercaricidal activities of the essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants: Implications for the control of schistosomiasis. *Acta Tropica*, 230, 106393. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106393>
- Pereira, N., Aquino, P., Silva, M., Nascimento, E., Grangeiro, A., Oliveira, C., Tintino, S., Figueiredo, F., Veras, H., & Menezes, I. R. A. (2015). Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista Fitos*, 9(2), 101–112. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150009>
- Poirel, L., De La Rosa, J. M. O., Kieffer, N., Dubois, V., Jayol, A., & Nordmanna, P.



- (2019). Acquisition of extended-spectrum β -lactamase ges-6 leading to resistance to ceftolozane-tazobactam combination in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.01809-18>
- Potawale, S., Luniya, K., Mentri, R., Mehta, U., Md. Waseem Md. Sadiq, Vetal, Y., & Deshmukh, R. (2008). *Chenopodium Ambrosioides*: an Ethnopharmacological Review. *Pharmacologyonline*, 2, 272–286.
- Puma, R. (2019). Extracción y caracterización de aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*) mediante arrastre de vapor. In *Tesis*. Universidad Nacional de Altiplano.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Ribeiro, M., & Simões, M. (2019). Antimicrobial Activity of Essential Oils. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_28-1
- Rivas, A. (2021). *Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural*.
- Rivas Soler, A., & Pérez Esteve, É. (2021). Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos. In *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Rudbäck, J., Bergström, M. A., Börje, A., Nilsson, U., & Karlberg, A. T. (2012). α -Terpinene, an Antioxidant in Tea Tree Oil, Autoxidizes Rapidly To Skin Allergens on Air Exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 25(3), 713–721.



<https://doi.org/10.1021/tx200486f>

- Sánchez-González, A., & González Ledesma, M. (2007). Técnicas de Recolección de Plantas y Herborización. In *La Sistemática, Base del Conocimiento de la Biodiversidad* (pp. 123–133).
- Santiago, J. A., Cardoso, M. D. G., Batista, L. R., Castro, E. M. de, Teixeira, M. L., & Pires, M. F. (2016). **Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *38*(2), 139. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.28303>
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, *2020*. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Shen, T., Penewit, K., Waalkes, A., Xu, L., Salipante, S. J., Nath, A., & Werth, B. J. (2021). Identification of a novel tedizolid resistance mutation in rpoB of MRSA after in vitro serial passage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *76*(2), 292–296. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa422>
- Shu, H., Chen, H., Wang, X., Hu, Y., Yun, Y., Zhong, Q., Chen, W., & Chen, W. (2019). Antimicrobial Activity and Proposed Action Mechanism of 3-Carene against *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens*. *Molecules*, *24*(18). <https://doi.org/10.3390/molecules24183246>
- Shu, H., Zhang, W., Yun, Y., Chen, W., Zhong, Q., Hu, Y., Chen, H., & Chen, W. (2020). Metabolomics study on revealing the inhibition and metabolic dysregulation in *Pseudomonas fluorescens* induced by 3-carene. *Food Chemistry*, *329*, 127220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127220>
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., Mittal, S., & Yadav, S. (2008). Chemical composition of essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India. *Chemistry of Natural Compounds*, *44*(3), 378–379. <https://doi.org/10.1007/s10600-008-9070-7>



- Singh, P., & Pandey, A. K. (2022). Dysphania ambrosioides essential oils: from pharmacological agents to uses in modern crop protection—a review. *Phytochemistry Reviews*, 21(1), 141–159. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09752-6>
- Soiza, R. L., Donaldson, A. I. C., & Myint, P. K. (2018). Vaccine against arteriosclerosis: an update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), 259–261. <https://doi.org/10.1177/https>
- Steward, C. D., Raney, P. M., Morrell, A. K., Williams, P. P., McDougal, L. K., Jevitt, L., McGowan, J. E., & Tenover, F. C. (2005). Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1716–1721. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005>
- Suaña, Y. (2022). *Estudio etnobotánico de plantas medicinales en la península de Chucuito (Puno, Perú)*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Supo, J. (2012). *Seminarios de investigación científica*. Bioestadistico.com.
- Tang, Z., Chen, H., Chen, W., Zhong, Q., Zhang, M., Chen, W., & Yun, Y.-H. (2022). Unraveling the antibacterial mechanism of 3-carene against *Pseudomonas fragi* by integrated proteomics and metabolomics analyses and its application in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109846. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109846>
- Tang, Z., Chen, H., Zhang, M., Fan, Z., Zhong, Q., Chen, W., Yun, Y.-H., & Chen, W. (2021). Antibacterial Mechanism of 3-Carene against the Meat Spoilage Bacterium *Pseudomonas lundensis* and Its Application in Pork during Refrigerated Storage. *Foods*, 11(1), 92. <https://doi.org/10.3390/foods11010092>
- Tapondjou, L. A., Adler, C., Bouda, H., & Fontem, D. A. (2002). Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of Stored Products Research*, 38(4), 395–402. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00044-3)
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and



- antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American Journal of Medicine*, 119(6 SUPPL. 1), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Egado, J., & Marín, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00116-8)
- Zapata, J. E., & Florez, C. andres. (2013). Sistema De Identificaciòn Automàtica De Especies Vegetales De Amaranthaceae Mediante Morfometria Geometrica De La Arquitectura Foliar. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Zefzoufi, M., Smaili, A., Fdil, R., Rifai, L. A., Faize, L., Koussa, T., Makroum, K., Ben Ali, A., Tabyaoui, M., Mouzdahir, A., Sraidi, K., & Faize, M. (2020). Composition of essential oil of Moroccan *Dysphania ambrosioides* and its antimicrobial activity against bacterial and fungal phytopathogens. *Journal of Plant Pathology*, 102(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00371-x>
- Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., & Pace, J. L. (2016). Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism



of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(12), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026989>

Zheng, X., & Bossier, P. (2023). Toxicity assessment and anti-Vibrio activity of essential oils: Potential for application in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–20. <https://doi.org/10.1111/raq.12795>

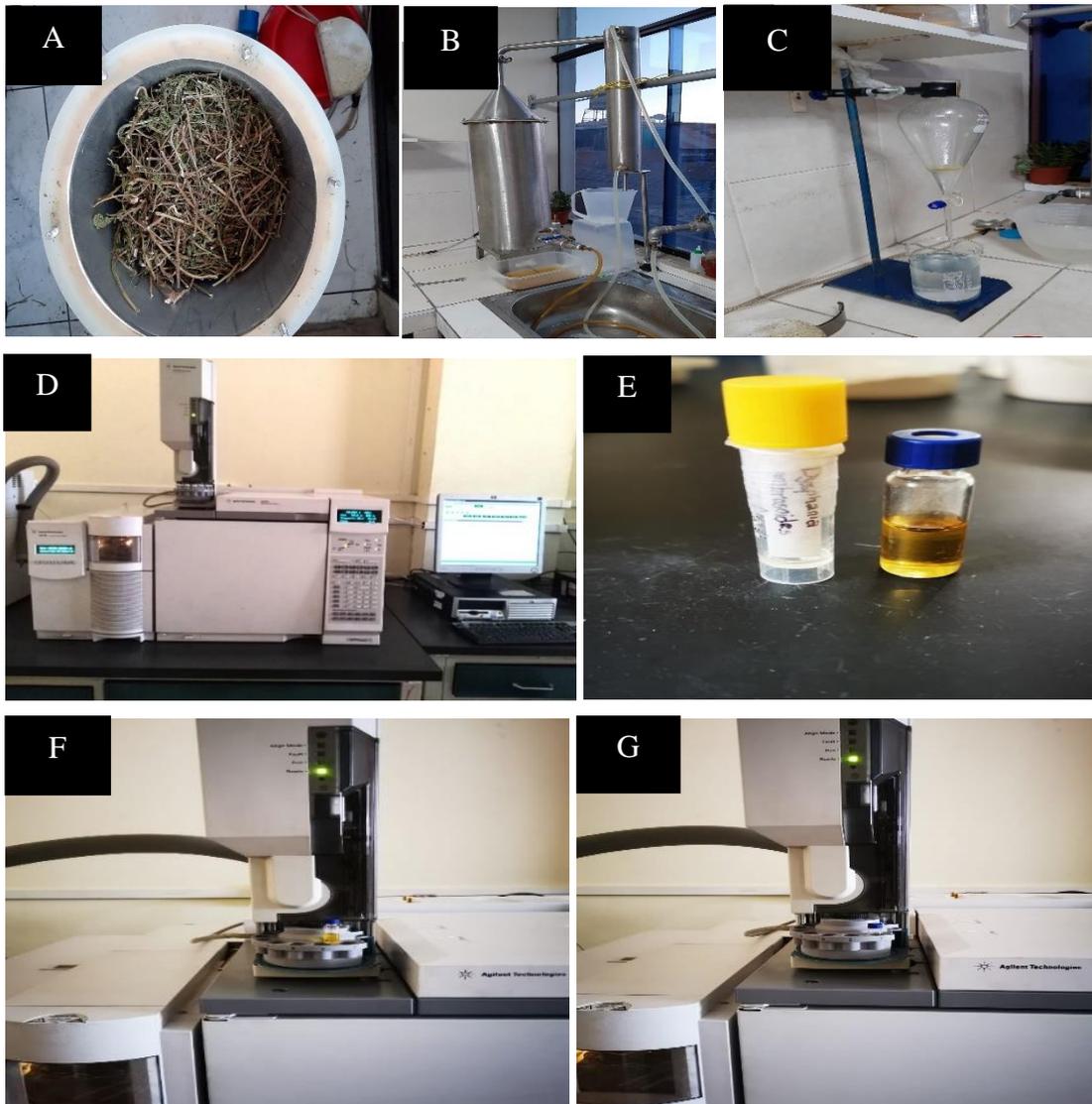
ANEXOS

ANEXO 1. Lugar de estudio y secado de la especie *Dysphania ambrosioides*



A. Lugar de recolección del espécimen *Dysphania ambrosioides* correspondiente al distrito de Pusi, Provincia de Huancané, **B.** Plantas de *Dysphania ambrosioides* (paico) en etapa fenológica de inflorescencia, **C.** Especímenes frescos, incluyendo hojas, tallos e inflorescencias de *Dysphania ambrosioides*, **D.** Secado natural de especímenes de *Dysphania ambrosioides* en ambiente oscuro, ventilado y seco.

ANEXO 2. Extracción y análisis físico del aceite esencial *Dysphania ambrosioides*



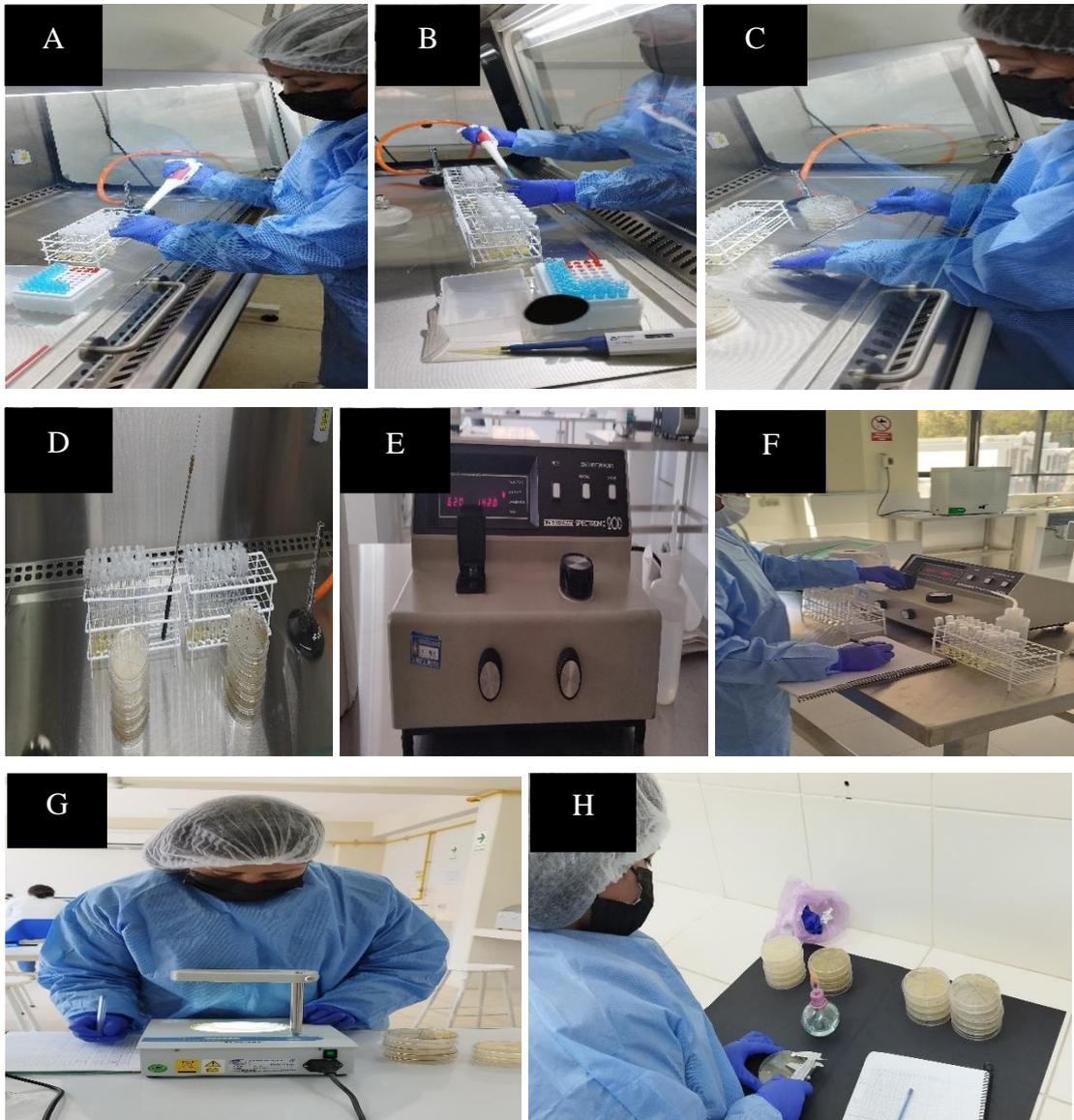
A. Colocación del material vegetal seco de hojas, tallos e inflorescencias de *Dysphania ambrosioides* en la cámara de extracción del hidroddestilador (Inox 340), **B.** Equipo de hidroddestilación **C.** Separación del agua y aceite en la pera de decantación, **D.** El análisis fitoquímico del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de la Universidad de San Antonio de Abad del Cusco, **E.** La muestra del aceite esencial fue transferida a un frasco vial transparente para el análisis, **F.** Se colocó la muestra del aceite esencial para la corrida en el equipo CG-EM, **G.** Inicio del proceso de corrida del aceite esencial en el equipo CG-EM.

ANEXO 3. Elaboración de los medios de cultivo, macrodilución en caldo, y la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer.



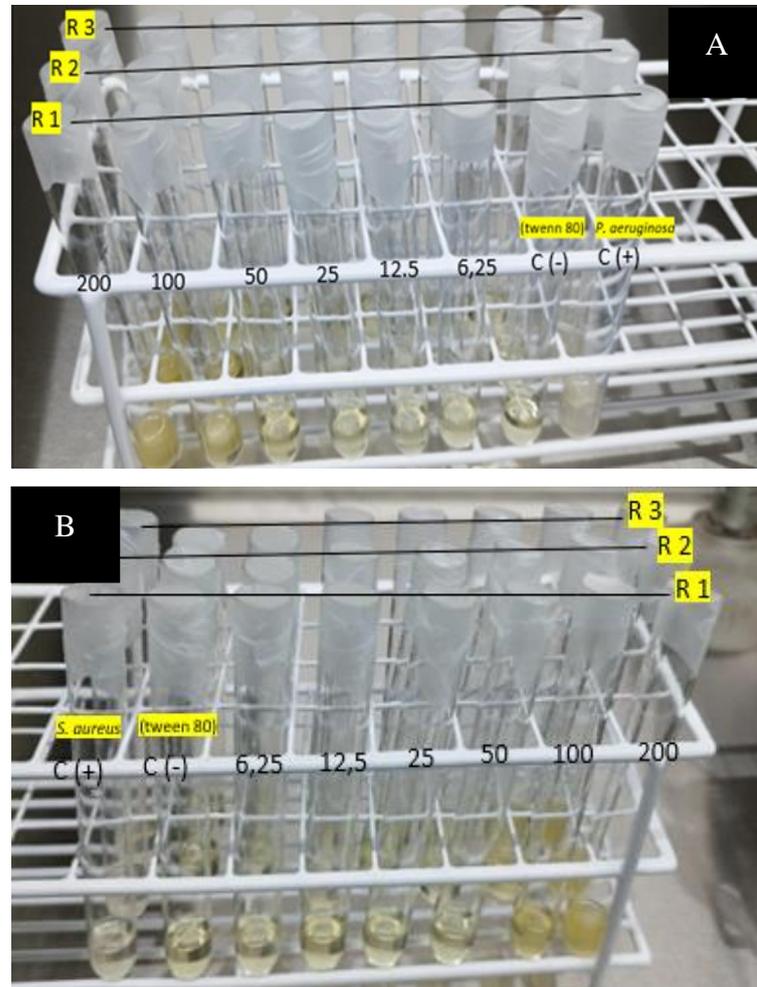
A. Caldo de cultivo de Müller-Hinton, **B.** Agar Mueller-Hinton, **C.** Agar nutritivo, **D.** Pesado de los medios de cultivo, **E.** Preparación con agua destilada para los medios de cultivo, **F.** Preparación de medios de cultivo para el autoclavado, **G.** Plaqueado de los medios de cultivo, **H.** Lectura de estándar de la suspensión de microorganismos al estándar 0.5 de la Escala de Mc Farland, con las cepas de microorganismo MDR *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* obtenidos mediante el sistema Vitek 2.0.

ANEXO 4. Desarrollo experimental para el análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*.



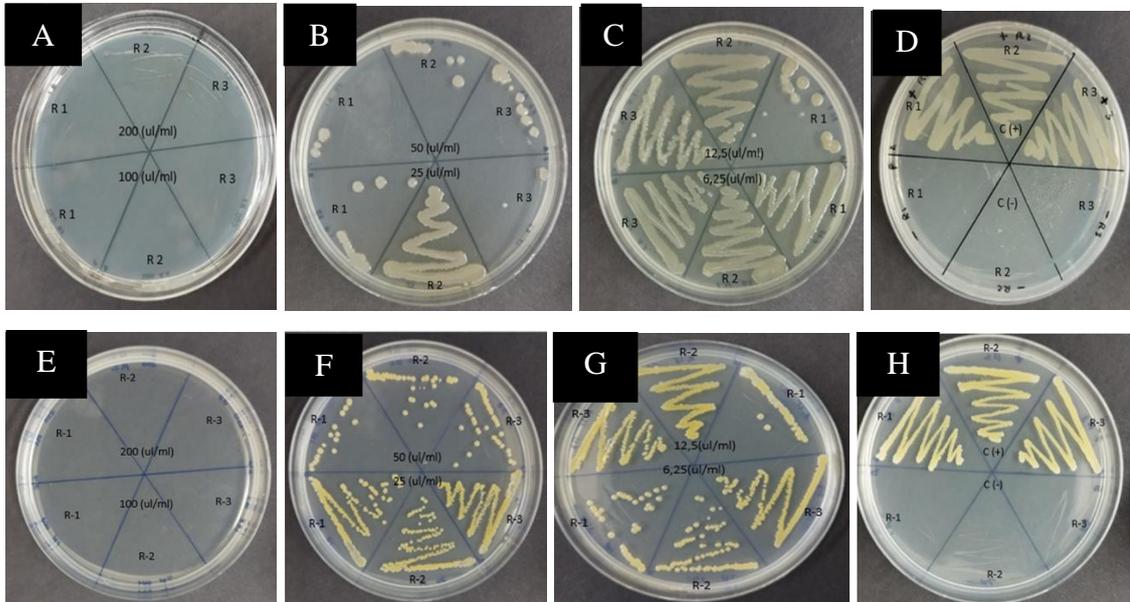
A. Preparación de la primera dilución en tubos mediante la técnica de macrodilución doble en caldo para analizar el CMI, **B.** Elaboración de la segunda dilución en tubos mediante la técnica de macrodilución doble en caldo para analizar el CMI, **C-D.** Siembra en Agar Nutritivo para la evaluación del CMI, CMB, **E.** Espectrofotómetro de la Marca Spectronic 20D de Milton Roy Company a 620nm, **F.** Medición de absorbancias a 620nm en el espectrofotómetro para el crecimiento microbiano en el Laboratorio de Bioquímica de FCCBB-UNA Puno, **G.** Conteo de las colonias para CMI, CMB, **H.** Medición de los halos de inhibición del crecimiento antimicrobiano.

ANEXO 5. Concentración mínima inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*.



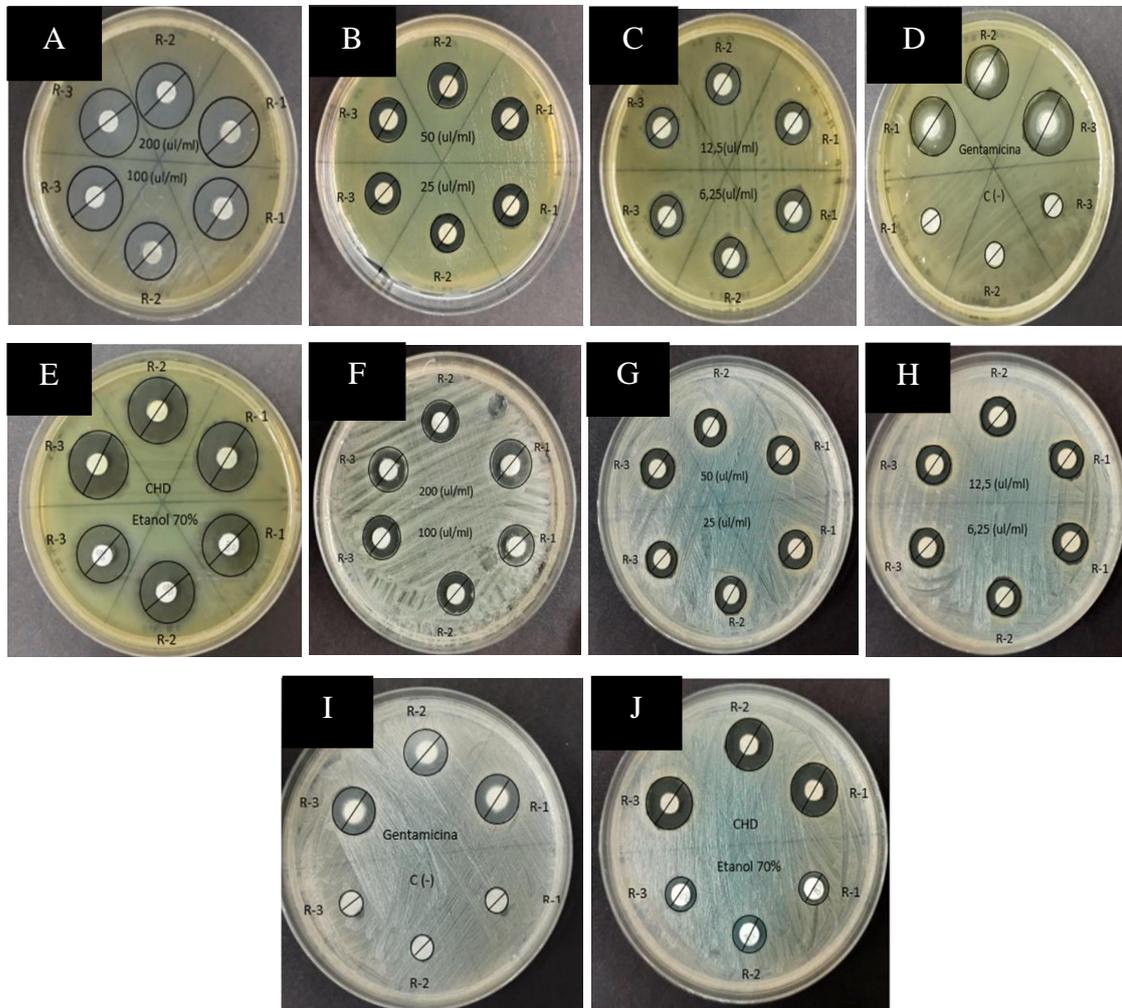
A. Batería de diluciones por triplicado del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa*. **B.** Batería de diluciones por triplicado del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus*.

ANEXO 6. Concentración mínima bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*



A-D. Recuento bacteriano para las macrodiluciones en caldo frente a *Pseudomonas aeruginosa* por triplicado, **E-H.** Recuento bacteriano para las macrodiluciones en caldo frente a *Staphylococcus aureus* por triplicado.

ANEXO 7. Susceptibilidad antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* multidrogoresistentes para el aceite esencial de *Dysphania ambrosioides*.



A-E. Halos de susceptibilidad antibiótica por triplicado realizados para distintas concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a sus controles en *Pseudomonas aeruginosa*, **F-J.** Halos de susceptibilidad antibiótica por triplicado realizados para distintas concentraciones del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* frente a sus controles en *Staphylococcus aureus*.



ANEXO 8. Ficha de informe clínico de *Pseudomonas aeruginosa* conforme con el sistema Vitek 2.0.

Cliente de bioMérieux: Hospital Regional Honorio Delgado
Informe clínico septiembre de 2022 18:37:22
COT

Nombre del paciente: N° paciente:
Localización: UCI
N° de examen: 12306T070922 Médico:
N° de aislamiento: 1

Cantidad de organismo: **Origen: SECRECION BRONQUIAL** **Recogida:**

Comentarios:	

Información de identificación	Tiempo de análisis: 7,80 horas	Estado: Final
Organismo seleccionado	Pseudomonas aeruginosa	
Mensajes de análisis de ID	Bionúmero: 0003041103500352	

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis: 12,20 horas	Estado: Final
------------------------------------	--	----------------------

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Ceftazidima	>= 64	R	Imipenem	>= 16	R
Ceftazidima/Avibactam	>= 16	R	Meropenem	>= 16	R
Ceftolozano/Tazobactam	>= 32	R	Amicacina	>= 64	R
Cefepima	>= 32	R	Ciprofloxacino	>= 4	R

Conclusiones de AES	
Nivel de confianza:	Coherente



ANEXO 9. Ficha de informe clínico de *Staphylococcus aureus* conforme con el sistema

Vitek 2.0.

Cliente de bioMérieux: Hospital Regional Honorio Delgado
Informe clínico junio de 2022 19:12:02 COT

Nombre del paciente: N° paciente:

Localización: Médico:
N° de examen: 8939230622 N° de aislamiento: 1

Cantidad de organismo:
Organismo seleccionado: *Staphylococcus aureus*
Origen: ESPUTO **Recogida:**

Comentarios:	

Información de identificación	Tiempo de análisis: 4,40 horas	Estado: Final
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Staphylococcus aureus	
Mensajes de análisis de ID	Bionúmero: 010402062763231	

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis: 18,08 horas	Estado: Final
------------------------------------	--	----------------------

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	NEG	-	Eritromicina	≥ 8	R
Bencilpenicilina	$\geq 0,5$	R	Clindamicina	≥ 4	R
Oxacilina	$\leq 0,25$	S	Linezolid	1	S
Ceftarolina	0,25	S	Vancomicina	1	S
Ciprofloxacino	$\leq 0,5$	S	Tetraciclina	≥ 16	R
Levofloxacino	$\leq 0,12$	S	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-	Trimetoprima/Sulfametoxazol	≤ 10	S

Conclusiones de AES	
Nivel de confianza:	Coherente



ANEXO 10. Constancia de la determinación taxonómica de paico realizado en el
Herbarium Arequipense de la Universidad Nacional de San Agustín.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N°27-2022-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica presentada por Yeny Angelica Yanqui Calsin, egresada del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico, Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional del Altiplano-Puno, para la realización del Proyecto de investigación: "CONSTITUYENTES VOLATILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* MULTIDROGORESISTENTES". La muestra fue enviada al laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente especie.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Genero	Dysphania
Especie	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L) Mosyakin & Clemants

Se le expide la presente a solicitud del interesado

Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercano-Teléfono: (054) 237755 / 993659045

Arequipa, 12 de setiembre del 2022



ANEXO 11. Constancia de ejecución del proyecto de tesis en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la UNA PUNO



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, ENCARGADO DEL LABORATORIO DE HISTOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA – UNA PUNO

HACE CONSTAR:

Que, la bachiller **YENY ANGELICA YANQUI CALSIN**, identificado con DNI N° 74725384, código de matrícula 150708, egresada de la escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ha ejecutado su proyecto de tesis titulado **“CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y *Staphylococcus aureus* MULTIDROGORESISTENTES”**, en el laboratorio de microbiología y parasitología de la escuela profesional de Medicina Humana, en los meses de abril, mayo y junio del año 2023.

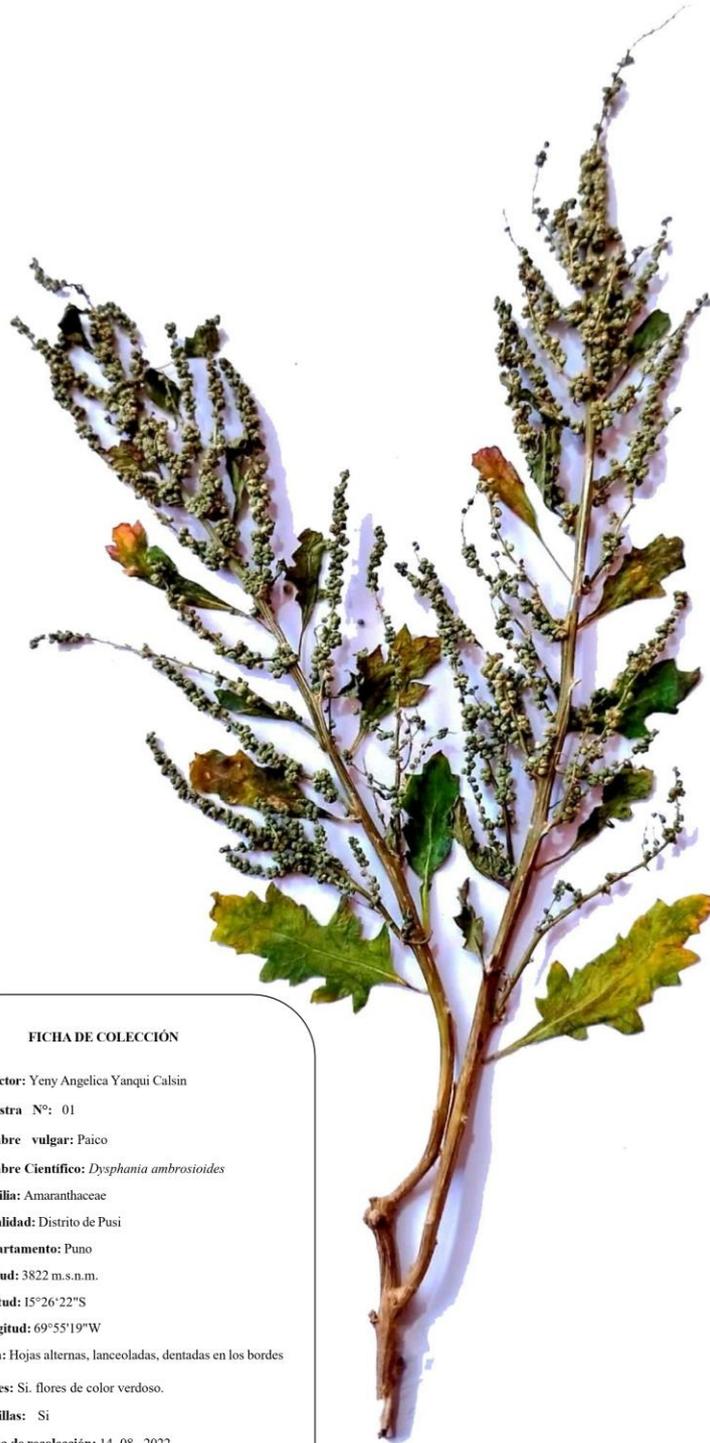
Se emite la presente constancia a solicitud del interesado para fines que considere conveniente.

Puno, miércoles 05 de julio del 2023.




Lic. Benigno Lorgio Palacios Frisancho
DNI: 01225964
ESPECIALISTA ADMINISTRATIVO FMH-UNA PUNO

ANEXO 12. Ficha de colección de un espécimen de *Dysphania ambrosioides* (Paico)



FICHA DE COLECCIÓN

Colector: Yeny Angelica Yanqui Calsin
Muestra N°: 01
Nombre vulgar: Paico
Nombre Científico: *Dysphania ambrosioides*
Familia: Amaranthaceae
Localidad: Distrito de Pusi
Departamento: Puno
Altitud: 3822 m.s.n.m.
Latitud: 15°26'22"S
Longitud: 69°55'19"W
Hoja: Hojas alternas, lanceoladas, dentadas en los bordes
Flores: Si. flores de color verdoso.
Semillas: Si
Fecha de recolección: 14-08-2022
Usos: remedio contra infecciones gastrointestinales, antiparasitario

ANEXO 13. Matriz de tabulación de datos

Tratamiento	Concentración Mínima Inhibitoria				Suceptibilidad antimicrobiana	
	Abs _{620nm} _Pa	RC_Pa	Abs _{620nm} _Sa	RC_Sa	S_Pa	S_Sa
200 µl/ml	-	0	-	0	14.607	11.330
200 µl/ml	-	0	-	0	13.864	10.407
200 µl/ml	-	0	-	0	14.257	10.960
100 µl/ml	-	0	-	0	13.533	10.010
100 µl/ml	-	0	-	0	12.560	10.066
100 µl/ml	-	0	-	0	13.897	9.932
50 µl/ml	+	12	+	24	9.588	8.946
50 µl/ml	+	35	+	50	9.959	8.577
50 µl/ml	+	37	+	48	9.797	8.983
25 µl/ml	+	47	+	148	9.480	8.675
25 µl/ml	+	228	+	140	8.897	8.258
25 µl/ml	+	8	+	163	9.593	8.133
12,5 µl/ml	+	51	+	45	8.928	8.181
12,5 µl/ml	+	202	+	98	8.822	8.364
12,5 µl/ml	+	199	+	168	8.322	7.990
6,25 µl/ml	+	206	+	86	8.941	8.029
6,25 µl/ml	+	224	+	182	8.404	7.935
6,25 µl/ml	+	210	+	190	8.438	8.058
CP	+	214	+	178	12.623	9.918
CP	+	212	+	198	11.581	9.399
CP	+	205	+	208	13.905	9.507
CN	-	0	-	0	5.000	5.000
CN	-	0	-	0	5.000	5.000
CN	-	0	-	0	5.000	5.000
Etanol 70 %					13.091	7.629
Etanol 70 %					12.843	8.505
Etanol 70 %					12.225	7.721
Clorhexidina					15.278	12.475
Clorhexidina					14.531	12.283
Clorhexidina					15.251	12.076

Nota: Abs_{620nm}_Pa=Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *P. aeruginosa*, Abs_{620nm}_Sa= Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *S. aureus*, Abs_{620nm}_Sa= Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *S. aureus*, RC_Pa= Recuento de colonias de *P. aeruginosa* (UFC x 100/ml), RC_Sa= Recuento de colonias de *S. aureus* (UFC x 100/ml), RC_Sa= Recuento de colonias de *S. aureus* (UFC x 100/ml), S_Pa= Halo de susceptibilidad en mm frente a *P. aeruginosa* ejercido por el AE de hojas de *T. vulgare* L, S_Sa= Halo de susceptibilidad en mm frente a *S. aureus* ejercido por el AE de hojas de *D. ambrosioides*, CP=Control positivo (Gentamicina 10µg), CN=Control negativo (Tween 80), - = Sin turbidez, += Con turbidez

Fuente: Elaboración propia



ANEXO 14. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio Institucional



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo YENY ANGELICA YANQUI CALSIN
identificado con DNI 74725384 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
de Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y
Staphylococcus aureus MULTIDROGORESISTENTES”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 20 de Agosto del 2024





ANEXO 15. Declaración jurada de autenticidad de tesis



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo YENY ANGELICA YANQUI CALSIN
identificado con DNI 74725384 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
de Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“CONSTITUYENTES VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania ambrosioides* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* Y
Staphylococcus aureus MULTIDROGORESISTENTES”

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 20 de Agosto del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella