

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

**CARRERA DE LICENCIATURA EN
FARMACIA**

**“ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTISÉPTICAS
Y ANTIBACTERIALES IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE *CYMBOPOGON CITRATUS* (ZACATE
LIMÓN) EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA EN FARMACIA**

RONALD ROJAS SOLANO

Tutora:

Dra. Melissa Martínez Domínguez

Lector:

Dr. Marco Mejía Soto

San José, Costa Rica 2017

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
Planteamiento del problema	1
Hipótesis	2
Objetivo General	3
Objetivos específicos	3
Justificación	3
Antecedentes	7
Internacionales	8
Nacionales	12
Proyecciones	15
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	16
Generalidades sobre la piel	16
Anatomía	16
Fisiología de la piel	17
Lesiones dermatológicas	18
Lesiones primarias	18
Flora bacteriana de la piel	19
Estafilococos	20
Fuentes, prevalencia y factores de virulencia	20
Características del <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	22
Pruebas de laboratorio para diagnóstico de infecciones bacteriana por <i>S.aureus</i>	22
Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y concentración mínima inhibitoria (CMI)	23
Plantas Medicinales	25
Fitofármacos	26
Generalidades del <i>Cymbopogon citratus</i> o zacate limón	26
Etnofarmacología de la planta	27
Clasificación taxonómica	28
Nombres comunes	28
Sinónimos	29
Descripción botánica y partes de la planta	29
Fitoquímica de la planta	30
Terpenos volátiles	30
Terpenoides no volátiles	32
Alcaloides	33
Flavonoides	33
Taninos	34
Farmacología	35

Extracción y aislamiento de aceites esenciales	36
Destilación por arrastre con vapor	37
Extracción empleando aparato Dean-Stark	38
Técnicas espectroscópicas para identificación y cuantificación de aceites esenciales	40
Espectroscopía infrarroja	40
Espectrometría de masas	43
Formas Farmacéuticas	43
Geles	43
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	45
Enfoque	45
Diseño	45
Variables	46
Instrumentos y técnicas de recolección	47
Proceso de recolección de la muestra de zacate limón	47
Materiales y equipo para la obtención del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (zacate limón) por arrastre con vapor y Dean-Stark:	48
Método de extracción aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> (Zacate limón) por arrastre con vapor	49
Método de extracción aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> (Zacate limón) mediante aparato Dean-stark	51
Proceso de purificación del esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (zacate limón)	52
Identificación de los componentes del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	53
Análisis cualitativo por cromatografía de gases acoplado a un detector e masas (CG/MS) del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	55
Análisis cualitativo aplicando pruebas de laboratorio o tamizaje fitoquímico en el aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	56
Identificación de alcaloides mediante el ensayo con reactivo Dragendorff	57
Identificación de terpenos-terpenoides: ensayo o prueba de Libermann-Burchard	58
Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda	58
Pruebas microbiológicas para evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (zacate limón)	59
Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial en <i>Sthaphylococcus aureus</i>	59
Materiales y equipos para el desarrollo del ensayo microbiológico	60
Reactivos y otros.	61
Método para evaluación de la actividad antibacteriana del <i>S.aureus</i>	63
Método para el desarrollo de la prueba de la catalasa en la identificación del <i>S.aureus</i>	64
Elaboración de la forma farmacéutica uso tópico Gel	65
Materiales y equipo utilizados en la elaboración del Gel	65
Reactivos	65
Proceso de manufactura empleado para la elaboración del gel uso tópico	66
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	68
Variable 1: Proceso de extracción y purificación del aceite esencial a partir del zacate limón (<i>Cymbopogon citratus</i>) empleando el m	68

étodo de arrastre con vapor-Aparato Dean-Stark	68
Variable 2: Identificación de los metabolitos activos presentes en el aceite esencial de zacate limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	75
Identificación o tamizaje fitoquímico	75
Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	78
Análisis del cromatograma y espectro de masas obtenido del aceite esencial de <i>C. citratus</i> mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas	83
Variable 3: Evaluación de actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (zacate limón) en el crecimiento in vitro de <i>Staphylococcus aureus</i>, mediante la medición de halos de inhibición	88
Evaluación de la actividad antibacteriana de la forma farmacéutica gel	92
Variable 4: Formulación de un Gel antibacterial uso tópico a partir del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	94
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	98
REFERENCIAS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la piel.....	17
Figura 2. Halos de inhibición para determinar actividad antibacteriana, CMB, CMI.....	25
Figura 3. Partes de zacate limón <i>Cymbopogon citratus</i>	30
Figura 4. Estructura química de los principales constituyentes del <i>C. citratus</i>	32
Figura 5. Estructura química de triterpenos no volátiles: cymbopogone y cymbopogonol presente en <i>C. citratus</i> (zacate limón).....	33
Figura 6. Estructuras químicas de algunos flavonoides presentes en <i>C. citratus</i>	34
Figura 7. Equipo empleado para la extracción de aceites esenciales por destilación por arrastre con vapor.	38
Figura 8. Equipo empleado para la extracción de aceites esenciales por aparato Dean-Stark.	39
Figura 9. Espectro infrarrojo IR con ciertos grupos funcionales presentes en compuestos orgánicos.	41
Figura 10. Método de extracción del aceite esencial de <i>C. citratus</i> por arrastre con vapor.	50
Figura 11. Equipo Dean-Stark empleado para la extracción de aceite esencial de <i>C. citratus</i>	51
Figura 12. Proceso de purificación del aceite esencial <i>C. citratus</i>	53
Figura 13 Espectrofotómetro Infrarrojo IR usado para la identificación de grupos funcionales de compuestos orgánicos en el aceite esencial de <i>C. citratus</i>	55
Figura 14. Muestra de aceite esencial de <i>C. citratus</i> para análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS).....	56
Figura 15 Reactivos utilizados durante la caracterización fitoquímica del aceite esencial de <i>C.citratus</i> suministrados por el Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas (UIA).	57
Figura 16. Materiales, reactivos empleados para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C.citratus</i> en <i>S.aureus</i> realizado en las Instalaciones de Microlabs, Guadalupe, San José.	61
Figura 17. Equipo de laboratorio empleado en el desarrollo de los ensayos microbiológicos realizados en las instalaciones de Microlabs, Guadalupe San José.	62
Figura 18. Cepa de <i>S.aureus</i> , ATCC 25923 cultivada en agar sangre empleado en el estudio para evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C.citratus</i> realizado en las Instalaciones de Microlabs.....	62
Figura 19. Insumos y materiales de laboratorio empleados en la identificación de la bacteria en estudio <i>S.aureus</i> realizado en las instalaciones de Microlabs, Guadalupe, San José.	64
Figura 20. Materias primas e insumos usados para.....	67
Figura 21. Separación del material que fue sometido al proceso de extracción por el método de arrastre con vapor y aparato Dean-Stark.....	68
Figura 22. Muestra de los extractos acuosos obtenidos luego de realizar la extracción del <i>C. citratus</i> mediante el métodos de arrastre con vapor y el aparato Dean-Stark, realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.	70

Figura 23 Proceso de purificación de los extractos acuosos obtenidos del <i>C. citratus</i> mediante extracción líquido-líquido empleando hexano como solvente orgánico, realizado en las instalaciones Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas.	72
Figura 24. Aceite esencial de <i>C. citratus</i> , realizado en las instalaciones de laboratorio de química Universidad Internacional de las Américas.	74
Figura 25. Ensayo de identificación alcaloides: reactivo Dragendorff con el aceite esencial de <i>C. citratus</i> , realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química Universidad Internacional de las Américas.	76
Figura 26. Ensayo de identificación terpenos: prueba Libermann-Buchard con el aceite esencial de <i>C. citratus</i> , realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química, Universidad Internacional de las Américas.	77
Figura 27. Ensayo de identificación para flavonoides, prueba de Shinoda en el aceite esencial de <i>C. citratus</i> , prueba realizada en las Instalaciones de Laboratorio de Química Universidad Internacional de las Américas.	78
Figura 28. Espectro infrarrojo obtenido del aceite esencial <i>C. citratus</i> purificado usando un Espectrómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo: Cary 630 FTIR, realizado en las Instalaciones de Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.	79
Figura 29. Espectro infrarrojo del α,β -citral, disponible en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en inglés).	80
Figura 30 Comparación de espectro infrarrojo obtenido del aceite esencial de <i>C.citratus</i> versus espectro infrarrojo del SDBS para el compuesto citral.	81
Figura 31. Cromatograma obtenido mediante el análisis por Cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), realizado por el CIPRONA Universidad de Costa Rica.	85
Figura 32. Espectro de masas del β -Myrceno, β -Citral α -Citral y respectivamente obtenidos mediante el análisis por Cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), realizado por el CIPRONA Universidad de Costa Rica.	86
Figura 33. Espectro masas del citral, disponible en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en ingles).	87
Figura 34. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria <i>S.aureus</i> , a diferentes diluciones del aceite esencial de <i>C. citratus</i> y su respectivo control positivo-negativo, ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs.	89
Figura 35. Prueba de identificación de catalasa para <i>S.aureus</i> , ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs, Guadalupe, San José.	92
Figura 36. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria <i>S.aureus</i> , para la forma farmacéutica Gel propuesta a tres concentraciones: 0% (sin preservantes), 3% y 4% de aceite esencial de <i>C. citratus</i> y su respectivo control positivo-negativo, ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs, Guadalupe, San José. .	93
Figura 37 Proceso de elaboración del gel antibacteriano y producto terminado debidamente etiquetado, realizado en las instalaciones de Laboratorio Química, Universidad Internacional de las Américas.	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	31
Tabla 2. Información farmacológica descrita para <i>Cymbopogon citratus</i>	35
Tabla 3. Frecuencia de vibración general para grupos funcionales en el espectro infrarrojo IR usados para la identificación de compuestos orgánicos.....	42
Tabla 4. Variables de la investigación.	46
Tabla 5. Diluciones de aceite esencial de <i>C. citratus</i> que se emplearon para evaluar la actividad antibacteriana sobre una cepa de <i>S.aureus</i> empleando como solvente hexano.	60
Tabla 6. Resultados obtenidos durante el proceso de extracción de aceite esencial de <i>C. citratus</i> mediante el método de arrastre con vapor y Dean-Stark, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.	71
Tabla 7. Rendimientos obtenidos durante el proceso de extracción de aceite esencial de <i>C. citratus</i> mediante el método de arrastre con vapor y Dean-Stark, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.	73
Tabla 8. Características organolépticas del aceite esencial <i>C.citratus</i> obtenido por el método arrastre con vapor, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.	74
Tabla 9. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del aceite esencial <i>C.citratus</i> , realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.	75
Tabla 10. Descripción y asignación de las bandas de absorción obtenidas del aceite esencial de <i>C.citratus</i> purificado.	82
Tabla 11. Resultados de la formación de los halos de inhibición formados con distintas muestras evaluadas.....	89
Tabla 12. Resultados de la formación de los halos de inhibición frente a la bacteria <i>S. aureus</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>C.citratus</i> para la forma farmacéutica propuesta, realizado en las instalaciones del Laboratorio Microbiológico Microlabs.	94
Tabla 13. Descripción y composición del gel antibacteriano de zacate limón (<i>C. citratus</i>), elaborado en las Instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas UIA.....	95
Tabla 14. Características organolépticas y físico-químicas del formulado gel antibacteriano al 4% aceite esencial de <i>C. citratus</i> , elaborado en las Instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas UIA.	97

RESUMEN

La medicina natural se ha aplicado haciendo uso de la actividad curativa descrita al denotar gran aceptación y conferírsele características de *referente* e *inspiración* en la búsqueda de nuevas sustancias o entes químicos que posean propiedades farmacológicas en el tratamiento de enfermedades en nuestros días.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del zacate limón (*Cymbopogon citratus*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* y establecer como una alternativa en el tratamiento de enfermedades dermatológicas que pueden ser provocadas por dicho patógeno en el ser humano.

Para el desarrollo de cada objetivo planteado en la ejecución de procedimientos experimentales y observacionales, se realizaron en las Instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas con el soporte de ensayos microbiológicos desarrollados en el Laboratorio Microbiológico Microlabs y otras pruebas en el Centro de Investigación en Productos Naturales CIPRONA de la Universidad de Costa Rica.

Para la obtención del aceite esencial del zacate limón, se aplicaron dos métodos extractivos: arrastre con vapor y extracción con el aparato Dean-Stark, obteniéndose un rendimiento de 1.5% y 2.6%, respectivamente. Luego, se procedió a la separación y purificación del aceite esencial, así como la identificación de los metabolitos principales presentes, se aplicó técnica de cromatografía de gases acoplado a Masas (GC-MS), espectroscopía infrarrojo (IR), y pruebas de caracterización química para los grupos funcionales terpenos, flavonoides, alcaloides. Los resultados fueron satisfactorios y dentro de los principales componentes son: α -Citral con un 54.07%, β -Citral con un 33.76% y Myrceno con 4.92%.

La evaluación de la actividad antibacteriana se efectuó aplicando el método Kirby-Bauer, obteniéndose que la muestra diluida al 4% describe sensibilidad moderada con un halo de inhibición de 16mm comparado a un halo de inhibición de 22mm para la muestra de control positivo.

Como fase final se procedió a la elaboración de una forma farmacéutica de uso tópico, para ello, se elaboró un gel antibacteriano que presentó características organolépticas adecuadas y corroborando su actividad antibacteriana.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno importante en el ser humano, pertenece a la microflora normal, se establece que la gran mayoría de personas a través de su vida puede presentar algún tipo de infección que pueden producir desde condiciones leves hasta graves, llegando incluso a comprometer la vida. Las infecciones que causa pueden ser desde cutáneas como el impétigo, hasta sistémicas dependiendo en gran medida del estado del sistema inmunológico de la persona y las circunstancias de cómo ingresa a los tejidos ya sea por un traumatismo o contaminación directa de una herida (Jawets, Melnick y Adelberg, 2010, pp186-189).

Uno de los principales problemas que enfrenta la terapéutica actual es la resistencia bacteriana. Como indica Alós (2014), la resistencia se ha dado de forma creciente a los antibióticos y se debe a su uso generalizado, muchas veces sin una prescripción médica. Este hecho como expresa el autor, hace urgente que se tengan que emplear otras alternativas a futuro. Jiménez y Del Corral (2017) mencionan que:

“De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a antibióticos se considera una de las amenazas más graves para la salud global. Los antibióticos son parte esencial de la medicina moderna, su importancia se extiende desde combatir infecciones graves, hasta prevenir infecciones en pacientes que requieren procedimientos médicos de gran importancia como trasplante de órganos, médula ósea, terapia contra el cáncer y tratamiento de enfermedades crónicas”.

(p.2)

El *S. aureus* como patógeno no es la excepción, se ha descrito resistencia por la producción de betalactamasas haciéndolo resistente a muchas penicilinas, entre ellas a la penicilina G, ampicilina, piperacilina, ticarcilina y fármacos afines (Godman y Gilman, 2012, p1486). También, se han descrito resistencia a la nafcilina, meticilina y oxacilina; se han aislado cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina, tetraciclinas, eritromicina,

aminoglucósidos, entre otros (Jawets, Melnick y Adelberg, 2010, p190). Se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes (OMS, 2016).

Para el control y prevención de enfermedades por bacterias que denotan patogenicidad, es de gran importancia lograr disminuir la carga bacteriana a nivel tópico para la prevención de complicaciones; para ello, el empleo de coadyuvantes a los métodos mecánicos como el uso de jabones en el baño diario, son importantes para la disminución de la carga bacteriana local de manera profiláctica.

El empleo de plantas medicinales como alternativa médica se mantiene vigente, dado que son fuente de potencial acción farmacológica, así mismo, al ser productos procesados o derivados naturales esto le confiere una aceptación y confianza por parte de los pacientes, con ello se permite una mayor adherencia a posibles tratamientos en comparación con tratamientos convencionales disponibles los cuales, en muchos casos, no son de gran aceptación.

Una gran cantidad de plantas o extractos disponen de estudios con evidencia o respaldo científico y que se han descrito su empleo dentro de la etnofarmacología. El aceite esencial extraído de las hojas de *Cymbopogon citratus* (zacate limón) se han descrito propiedades, tales como: anti-inflamatorias, antieméticas, antidiarreicas, antifúngicas, antifilariasis, antiamebiano, antibacteriales y antioxidantes entre otros (Shah, Shri, Panchal, Singh, Mann, A, 2011, p.5-6).

Por lo expresado anteriormente, la presente investigación presenta como principal interrogante: ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *cymbopogon citratus* (zacate limón) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*?

Hipótesis

El aceite esencial de *cymbopogon citratus* (zacate limón) posee efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento en cepas de *Staphylococcus aureus*.

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *cymbopogon citratus* (zacate limón) en cepas de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos

- Realizar la extracción del aceite esencial de zacate limón mediante el método arrastre con vapor y el método de extracción con el aparato Dean Stark.
- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *cymbopogon citratus* (zacate limón) en el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, mediante el método Kirby-bauer por medición de halos de inhibición.
- Identificar la presencia de los metabolitos activos en el aceite esencial de zacate limón.
- Elaborar una forma farmacéutica de aplicación tópica con acción antibacteriana a partir del aceite esencial de zacate limón.

Justificación

La medicina natural desde tiempos ancestrales se ha aplicado haciendo uso de la actividad curativa descrita para un sinnúmero de plantas. Estas denotan gran aceptación en la población por lo que se le han conferido características de *referente* e *inspiración* en la búsqueda de nuevas sustancias o entes químicos que posean propiedades farmacológicas en el tratamiento de enfermedades en nuestros días.

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que los remedios herbales y algunos derivados de las plantas son el tipo de terapia más frecuente en todo el mundo. Se estima que más de un 80% de la población mundial usa preparaciones herbales para el

mantenimiento primario de la salud, dado que estos son *tratamientos de bajo coste* y de *amplio acceso para la población de bajos recursos* (Informe OMS Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, 2013, p.16).

Los productos extraídos de plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Akerlele, 1993, parr. 3-4).

La farmacoterapia, actualmente, disponible para tratar infecciones bacterianas describen un creciente desarrollo de resistencia antibacteriana, esto producto de una práctica inadecuada y uso desmedido por parte del personal en salud y de los pacientes (OMS, 2016). Así mismo, los efectos secundarios en su aplicación que son descritos en la literatura han hecho que se vuelva conveniente el observar a los productos de origen natural como una opción.

La *relevancia social* del presente trabajo empieza porque como indican Jiménez y del Corral (2017, p.22), existen en este momento una creciente resistencia de las bacterias, a los tratamientos sobre todo los antibióticos. Además de esto el precio de los medicamentos de referencia farmacológica en su gran mayoría como dice Jiménez (2011), son elevados a nivel de los consumidores que acuden a las farmacias privadas esto significa una carga económica considerable.

Así se puede establecer que un medicamento basado en producto natural de este tipo es *funcional* porque tendría dos beneficios: por un lado, disminuir la creciente resistencia bacteriana que se origina producto del uso desmesurado de otros medicamentos, y por otro, posibilita un acceso para los consumidores. Los autores Oliveira, Velázquez y Bermúdez (2005) manifiestan que:

“Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha

estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993; Sheldon et al., 1997; Shrestha y Dhillion, 2003; Katewa et al., 2004). De acuerdo a la OMS, 1979, una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos “(p.18)

Costa Rica por su ubicación geográfica, riqueza hídrica y biodiversidad dispone de una gama de posibilidades para la investigación de plantas como lo es la fitoquímica y sus actividades potenciales en las ciencias médicas, *las implicaciones prácticas y valor teórico* de la presente investigación es la de proveer de información científica relevante que pueda establecer con evidencia experimental de una posible *indicación* para extractos de aceite esencial de una planta como *Cymbopogon citratus* (zacate limón), así mismo, respaldar o confirmar uno de los usos de un remedio descrito por la etnofarmacología como lo es su actividad antibacteriana.

El *Cymbopogon citratus* es una planta muy utilizada en la medicina tradicional ya que se le confieren propiedades medicinales actuando en el sistema digestivo como antiespasmódico, carminativo, sobre el sistema respiratorio como antiasmático, en piel y mucosas como antibacterial, analgésico y antimicótico (Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, p7445). Así mismo, Shah, Shri, Panchal, Singh y Mann (2011, p.5-6), describen propiedades adicionales como anti-inflamatorias, antieméticas, antidiarreicas, amebicidas y antioxidantes que indica que los extractos de esta planta poseen muchos usos con implicaciones prácticas para el desarrollo de un sinnúmero de posibles tratamientos farmacológicos en las áreas descritas. La *conveniencia* del presente trabajo es la de determinar si los extractos de la planta medicinal de zacate limón denotan actividad antimicrobiana específica en el crecimiento del *S.aureus*.

Aunado a ello, el clima de Costa Rica denota condiciones apropiadas para el desarrollo de cultivos extensivos como lo es el zacate limón, facilitando de esta manera el *potencial del desarrollo y diversificación en la industria agropecuaria*, creando valor

agregado y haciendo uso del capital humano costarricense con formación especializada en ciencias de la salud y ciencias naturales para la producción de productos con actividad farmacológica como lo son los derivados de plantas medicinales.

Berger y Stephen (2017), establecen que el impétigo contagioso, impétigo vulgar o impétigo ampollar se encuentra catalogado dentro de los principales cuadros de enfermedades dérmicas, es una infección de la piel, benigna, contagiosa. Se caracteriza por la presencia progresiva de ampollas que son reemplazadas por pústulas que se desecan con mucha rapidez formando “costras” que recubren la erosión puramente epidérmica. Es causada por bacterias del género *Streptococcus* y *Staphylococcus* siendo de esta última el *S. aureus* el que más a menudo que puede ser encontrado en niños con impétigo de todas las edades, así como en población adulta.

Se describe que una de las principales complicaciones de esta infección es la glomerulonefritis, conllevando a un estado patológico que puede comprometer seriamente la función renal del paciente. La *relevancia* del presente estudio permite establecer una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones que pueden ser provocadas por esta bacteria en caso de demostrarse su actividad antibacteriana y antiséptica.

A *nivel metodológico* el presente trabajo de investigación permitirá establecer posibles alternativas de procedimientos extractivos adecuados para la obtención de aceite esencial de zacate limón. De esta forma se realiza un estudio *in vitro* para determinar el efecto inhibitorio que poseen los extractos obtenidos de las hojas de zacate limón (*Cymbopogon citratus*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

Antecedentes

Tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo como es el caso de Costa Rica ha ido en aumento el uso de plantas medicinales o sus derivados (García, 2001, párrafo 1). La terapia con plantas medicinales representan cerca del 25% del arsenal de prescripciones médicas de los países industrializados y el 80% de arsenal en los países en desarrollo por lo que, en la actualidad, se ha visto el interés científico y en la comprobación científica de las propiedades atribuidas a las plantas medicinales (Informe OMS, 2016).

En 1978, la OMS establece la integración de los remedios tradicionales de eficacia comprobada en las políticas farmacéuticas y de reglamentación para los países, siendo los Ministerios de Salud de cada país los que deben realizar la aprobación de los remedios derivados de vegetales, así mismo la prohibición del empleo de productos que denoten toxicidad o van en perjuicio o detrimento del paciente (García, 2001, párrafo 4).

Para 1989, se reconoce la importancia de los medicamentos herbarios en la salud de los individuos y de las comunidades y de esta forma se establece que los países necesitan de información actualizada y autorizada sobre las propiedades beneficiosas y posibles efectos de medicamentos herbarios.

Siguiendo esta línea, el Ministerio de Salud de Costa Rica, en 1997, conformó una comisión interinstitucional e interdisciplinaria para la elaboración de un documento que permitiera cumplir con las pautas que ha dictado la OMS en torno al tema y de esta forma brindar seguridad y protección a la población, así en el diario oficial La Gaceta N 72-98 del miércoles 15 abril 1998 se publica un primer decreto N 26782-5 denominado “Reglamento para la industrialización, inscripción, comercialización y publicidad de preparaciones con base en recursos naturales con forma farmacéutica y tisanas”, éste describe los requisitos para la comercialización de los productos de origen natural. Con esto se inicia una nueva etapa en el país para el empleo de productos naturales con actividad farmacológica, de forma tal que se tenga acceso a un sinnúmero de indicaciones que han sido descritas en la literatura científica para plantas medicinales (García, 2001, párrafo 5).

Otro hecho de relevancia histórica sobre las plantas medicinales es que la Universidad de Costa Rica mediante su Vicerrectoría de Investigación, crea el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIRONA) en el año 1979; dicho centro investigativo e interdisciplinario trabaja en colaboración con otros centros de investigación e Instituciones Públicas, tales como: Escuela Ingeniera Química, Instituto de Desarrollo Agrario (IDA), Departamento Química Universidad Nacional y el Centro de Promoción de exportaciones (CENPRO), varios centros de investigación internacionales entre otros. Desde entonces es partícipe activo en la creación de información científica sobre plantas con usos medicinales, sus metabolitos y otros; así mismo, ampliaron las áreas investigativas para cubrir estudios sobre productos de fermentación, síntesis (Sitio web CIPRONA, 2017).

El Instituto de Biodiversidad INBIO fue fundado en el año 1989, con el objetivo que fuese prioritaria la búsqueda de conocimiento de la diversidad biológica, así como la vinculación con el desarrollo sostenible dado que, Costa Rica como país ejemplo en desarrollo sostenible, no disponía hasta ese momento de una Institución que vinculara la necesidad de crear información y potencial de la biodiversidad costarricense (INBIO, 2017). La función del INBIO en el campo de la conservación complementada con mecanismos innovadores se promueve el conocimiento y uso racional de la biodiversidad costarricense. Dicha Institución entre muchas de sus líneas investigativas desde su creación trabaja en la selección, identificación de metabolitos presente en la biodiversidad de Costa Rica.

Internacionales

En la elaboración del presente apartado, se procedió a realizar investigación en bases de datos disponibles: OPAC, EBSCO, SCIELO, COCHRANE, MEDLINE, PUBMED, PUBCHEM encontrándose un total de diez trabajos internacionales que, a continuación, se describen:

Morillo (2017), realiza un estudio en Ecuador sobre el “Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en diferentes concentraciones sobre la cepa de *porphyromona gingivalis*, se indica que la población rural y urbana ha utilizado esta planta para aliviar una serie de enfermedades en América Latina; expresa que el propósito de este estudio *in vitro* es determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Cymbopogon Citratus* (zacate limón o hierba luisa) en diferentes concentraciones sobre la cepa de *Porphyromona gingivalis* mediante el Método de Kirby-Bauer (método de difusión en agar).

La obtención de los aceites se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) como solvente, los extractos se concentraron al 50%, 75% y 100%. Los resultados obtenidos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y U Mann Whitney con las que se puede concluir que existieron discrepancias de acuerdo con el grupo de estudio, el aceite de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 100% presenta valores de inhibición altos comparados con las otras concentraciones, y los valores más altos de inhibición son para Clorhexidina al 0,12%.

Valdés (2017), realizó un trabajo en Argentina en donde estudia el uso del *Cymbopogon citratus* para combatir el pulmón verde del durazno *Myzus persicae*, por su dificultad para ser controlado cuando se trata cultivos hortícolas bajo cubierta, generalmente, se realiza por plaguicidas sintéticos convencionales que causan residuos tóxicos. Sus efectos se comprobaron junto con los de los aceites esenciales de laurel (*Laurus nobilis*), teniendo en cuenta sus costos de uso. Se indica que para el objetivo específico de esta tesis, se condujo un ensayo en un cultivo ya implantado de *Lactuca sativa* (lechuga) bajo cubierta, y se realizaron aplicaciones, tanto de aceites esenciales como del plaguicida de síntesis utilizado por el productor en el marco del manejo convencional que él mismo realizaba. Al final concluye que los dos tipos de aceites son útiles para combatir la plaga, pero económicamente incrementan en 50% el costo en comparación con los insecticidas sintéticos, aunque existe el beneficio para el ambiente.

Zulfa, Chia, Rukayadi (2016), realizan un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *Cymbopogon citratus* contra patógenos que pueden ser transmitidos en alimentos; para ello establecen el empleo de productos naturales

con acción preservante para lo cual usan extractos metanólicos de zacate limón los cuales son testificados contra los patógenos: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*.

Los ensayos de susceptibilidad usados son: concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) o mínima concentración fungicida (MFC); para su evaluación se usan las técnicas de microdilución descritas por el Instituto para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI). Entre los principales resultados se obtuvo que los extractos de *C.citratus* mostraron actividad antimicrobiana contra: *B. cereus*, *E.coli* O157:H7, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *C. albicans* con una zona de inhibición de 12mm, 7,5mm, 11mm, 10mm y 9mm respectivamente. Con los resultados obtenidos se demuestra que los extractos de *C. citratus* pueden ser usados como agentes antimicrobianos.

En esta misma línea, se tiene las publicaciones realizadas por Almeida, Akisue, Cardoso y Junqueira (2013), en la que se efectúa un estudio sobre la actividad antibacteriana y antimicótica del *C. citratus* del cual se obtienen resultados concluyentes y afirmativos sobre su actividad antibacteriana-antimicótica. Otro estudio publicado con similar enfoque llevado a cabo por Balachandar, Sadayan y Abimanan, 2014 donde realiza una evaluación del extracto de *C. citratus* obtenidos con distintos solventes para evaluar la actividad antioxidante y antibacteriana contra agentes patógenos en humanos.

Así mismo, se tiene una publicación por Mohd, Bashir, Ebenezar y Javid (2010), en el cual se evalúa la actividad antibacterial del extracto de *C.citratus* contra una grupo de agentes patógenos en humanos: *B. cereus*, *B. subtilis*, *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* usando el método de difusión en agar y de dilución, así mismo, se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MBC) por el método de dilución, paralelamente se evalúa la susceptibilidad antibiótica usando el métodos de difusión de discos. Del estudio se concluye que para todos los patógenos exceptuando *P.aeruginosa* mostraron sensibilidad al extracto de aceite esencial, siendo de esta manera efectivo contra microorganismos que denotan resistencia antibacteriana.

Zambrano (2015), realiza la investigación “Estudio farmacognóstico y composición proximal de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Melissa officinalis* (Toronjil) y *Lippia*

citriodora (Cedrón) proveniente de las Provincias El Oro y Azuay, Ecuador”, en dicho estudio se indica que se utilizaron aproximadamente 500g de droga de cada especie que se encuentran en las Provincias de El Oro y Azuay, como parte de la investigación se realiza un estudio fitoquímico de los extractos acuosos de cada especie. Los resultados obtenidos de algunos de los parámetros determinados (humedad, cenizas, proteínas, lípidos o grasas) fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA, y las características organolépticas (color, textura, olor) del polvo fino de las hojas fueron casi similares entre sí.

Un estudio realizado por Avoseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh, Chungag y Oyedejo, (2015) se hace una revisión bibliográfica sobre la etnofarmacología del *Cymbopogon citratus*. La evidencia etnofarmacología muestra las propiedades que justifica su empleo en control de plagas, potencial de drogas con actividad antitumoral-quimioterapéutico, así como usos en cosméticos y actividad antiinflamatoria. En dicho estudio se emplea la composición química como biomarcador para su identificación y clasificación, se describe un sinnúmero de usos farmacológicos. El trabajo publicado permite establecer que las distintas especies de *Cymbopogon* denotan un potencial económico.

Nadjud, Amine, Kameli, Saidi, Tchoketch (2014), realizan un estudio sobre los efectos antifúngicos y anti-inflamatorios del extracto de *C.citratus* sobre cepas de *C. albicans*, *C.tropicalis*, *Aspergillus niger* mediante la medición de los halos de inhibición a distintas concentraciones de extractos los cuales fueron identificados mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los dos principales componentes del extracto fueron: geranial un 42,2% y neral 31.5%. Para la actividad inhibitoria, emplearon discos de difusión impregnados de la esencia y métodos de difusión por vapor, se encontró un mayor efecto al aumentar la cantidad de extracto aplicado en los discos, en el estudio se determinó que la mayor actividad antifúngica contra el género *Cándida* fue observado en la fase de vapor.

Para la evaluación de la actividad anti-inflamatoria se administraron vía oral dosis de 10mg/kg del extracto a ratones de que presentaban edema inducido por carragenina comparado con dosis de diclofenaco 50mg/kg, usado como control positivo en el ensayo, los resultados mostraron actividad anti-inflamatoria dosis-dependiente, paralelamente se evalúa el efecto anti-inflamatorio tópico del extracto en cantidades de 5 a 10 μ L en edema

de oreja inducido por aceite de crotón aplicado, se determinó que entre un 62,5% y 75% de los ratones se redujo significativamente la inflamación con lo cual se establece su actividad anti-inflamatoria.

Un trabajo realizado por Soares, Alves, Pires, Beatriz, Oliveira, Vinha (2013), se evaluó los efectos de los solventes: agua, metanol y etanol en el proceso de extracción de componentes con actividad anti-oxidante presentes en las hojas de *C. citratus*. Así mismo, se evalúa la composición fitoquímica, el estudio reveló la presencia de flavonoides, taninos y terpenoides en todos los extractos, los extractos metanólicos denotaron la presencia adicional de alcaloides y esteroides. Para evaluar la actividad antioxidante, se hacen ensayos de barrido de DPPH, NO, H₂O₂ con potencia reductiva. Los extractos acuosos denotaron una actividad antioxidante superior a los etanólicos y metanólicos.

Un trabajo realizado por Matasyoh, Wagara, Nakavuma,,Kiburai (2011), se evalúa la actividad antimicótica del extracto de zacate limón en cinco especies diferentes del genero *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* los resultados fueron satisfactorios y concluyentes para las cinco especies de hongos, teniéndose una concentración mínima inhibitoria en el rango de 15 a 118 mg/mL.

Nacionales

En la elaboración del presente trabajo de investigación, se procedió a realizar búsqueda de información en bases de datos disponibles, así como en los portales virtuales de las Universidades Estatales: Universidad de Costa Rica (SIBDI), Universidad Nacional (SIDUNA), Instituto Tecnológico de Costa Rica (SIBITEC), Universidades Privadas: Universidad de Iberoamérica UNIBE, Universidad Latina de Costa Rica ULATINA, Universidad de Ciencias Médicas UCIMED y en la Universidad Internacional de las Américas UIA para un total de cinco trabajos nacionales, que a continuación, se describen.

En la Universidad Iberoamericana (UNIBE) se encontraron tres trabajos de investigación relacionados con el aceite esencial del *C.citratus* que, a continuación, se realiza la descripción.

Un estudio hecho por Aguilar y Gutiérrez (2009), realizan un trabajo de investigación sobre la acción larvicida de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* (Albahaca) y del *Cymbopogon citratus* (zacate limón) para combatir el *Aedes aegypti* o dengue, en dicho trabajo se realiza la extracción del aceite esencial de ambas plantas por la técnica de maceración con solventes isopropanol-agua en el caso del aceite esencial de zacate limón e isopropanol en albahaca, estableciéndose como propósito la identificación de los componentes principales de ambos aceites esenciales mediante la técnica de espectroscopía infrarrojo para grupos funcionales y cromatografía de gases-espectroscopía de masas para los principales compuestos de cada planta. Posteriormente, se realiza ensayos de laboratorio con la colocación de trampas en condiciones apropiadas para la supervivencia de las larvas del insecto y se aplica en forma directa el aceite esencial de ambas plantas con el objetivo de medir la acción larvicida de los aceites esenciales, obteniéndose resultados satisfactorios y concluyentes.

Campos y Wing (2009), realizan un trabajo en el que se establece el uso de *Cymbopogon citratus* para la obtención de α -iononas los cuales son precursores de productos farmacéuticos y perfumes. Para ello, se extrae el principal componente del aceite esencial: citral principal precursor de iononas y éstas son muy usadas en la industria farmacéutica para producción de vitamina A, así mismo, en la producción de fragancias.

La extracción del aceite esencial se empleó el método de arrastre con vapor con posterior purificación usando cromatografía de capa fina y de columna, obteniéndose el precursor para las reacciones de síntesis, paralelamente realiza la identificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Las iononas se obtuvieron en dos pasos de síntesis: hidrogenación de ácidos insaturados y así obtener aldehídos, en segundo paso de síntesis la reacción de condensación que produce la protonación, dando así un hidroxialdehído que en condiciones de calor se deshidrata perdiendo un grupo hidroxilo y un hidrógeno de carbonos adyacentes logrando obtener la molécula α -iononas.

Rodríguez (2008), realiza una investigación para obtención de un insecticida natural a partir de *Cymbopogon citratus*, en dicho estudio se evalúa la actividad insecticida contra el zancudo *Aedes aegypti*, para ello extrae el aceite esencial mediante el método de arrastre con vapor con posterior identificación del aceite, usando espectroscopía infrarroja y cromatografía de gases-espectrometría de masas los cuales fueron comparados con una base de datos de 62320 estructuras que ofrece el equipo usado para tales efectos. Se realizan trabajos de campo donde se crearon trampas bajo condiciones ambientales y hábitat que facilitaron la reproducción del insecto y se efectúa la aplicación del producto de modo directo al vector con el objetivo de medir la efectividad insecticida del aceite esencial. Los resultados fueron satisfactorios y concluyentes.

Adicionalmente, se mencionan dos trabajos que pueden tener relación en el enfoque de estudio: Vargas (2016), realiza un trabajo final de graduación en el cual evalúa las propiedades antibacterianas de dos preparados farmacéuticos tópicos a partir del extracto de propóleo de abeja; en este trabajo de investigación la metodología empleada consistió en la elaboración y observación de procedimientos experimentales de laboratorio donde se aplicó métodos químicos de extracción, identificación de componentes activos presentes en el propóleo y la elaboración de dos preparados o formas farmacéuticas de uso tópico.

Así mismo, se evalúa la acción antibacteriana mediante ensayos microbiológicos que demostraron la capacidad antibacteriana de las formulaciones creadas. Las técnicas de identificación de los componentes más relevantes se usó la técnica espectroscópica infrarroja (IR), se realizó las pruebas de fitoquímica o química líquida la reacción de Shinoda, Molish, Cloruro Férrico y medio ácido las cuales dieron positivas. Para la elaboración de las dos formas farmacéuticas se estableció hacer un gel y un enjuague bucal. Para la demostración de actividad antibacteriana, se realizó pruebas antibiogramas para verificar la sensibilidad del extracto de propóleo frente a *Staphylococcus aureus*, donde los resultados fueron positivos con la presencia de halos de inhibición que reflejaron el poder bacteriostático del extracto de propóleo incorporado en los productos tópicos.

En la Universidad de Costa Rica, se encontró en sus bases de datos un trabajo de investigación relacionado con extracción e identificación de aceites esenciales. Ciccio (1996), elabora la investigación “Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de

Drimys granadensis (Winteraceae)”, como resultados se obtuvieron los aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis*, mediante el procedimiento de hidrodestilación, con rendimientos de 0.5 y 0.2% (volumen por peso de material fresco) respectivamente. La composición de los aceites se estudió utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los principales compuestos identificados fueron los monoterpenoides 4-terpineol (21.9%), sabineno (6.6%), γ -terpineno (8.3%) y α -herpineno (5.5%), además del sesquiterpeno germacreno D (10.2%). En el análisis del aceite de los frutos inmaduros los principales compuestos identificados fueron los sesquiterpenoides germacreno D (23.4%) y drimenol (10.0%). Cuantitativamente, la composición resultó muy diferente a la de las hojas. La mayor parte de los compuestos no identificados (ca. 25 %) (p.1). El estudio revela que los aceites tienen múltiples componentes que interactúan, y algo muy importante, la etapa de crecimiento influyen de forma significativa, así como si se trata de las hojas y el tallo.

En la Universidad Ciencias Médicas (UCIMED), Universidad Latina de Costa Rica y en la Universidad Internacional de las Américas (UIA), no se encontraron ningún tipo de trabajo investigativo relacionado con la actividad antibacteriana del *C. citratus*.

Proyecciones

Dentro de las consideraciones de proyección del presente trabajo de investigación se puede mencionar:

Una publicación en revista científica de circulación nacional en el área de la fitoquímica, o bien, etnofarmacológica o médica.

Estudios de factibilidad económica para la implementación de un proceso industrializado para la producción de productos naturales con actividad antibacteriana-antiséptica derivado de la planta zacate limón, brindando así un valor agregado a la industria agropecuaria costarricense.

Aportar información de carácter científico que sirvan de apoyo a futuras investigaciones que se logren realizar con esta planta medicinal.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se describen y definen algunos conceptos importantes que son el fundamento teórico de las variables establecidas en los objetivos, así mismo, la posición teórica elegida para el análisis de los resultados. Su desarrollo se basa en una revisión de fuentes de información relacionadas con el tema de estudio.

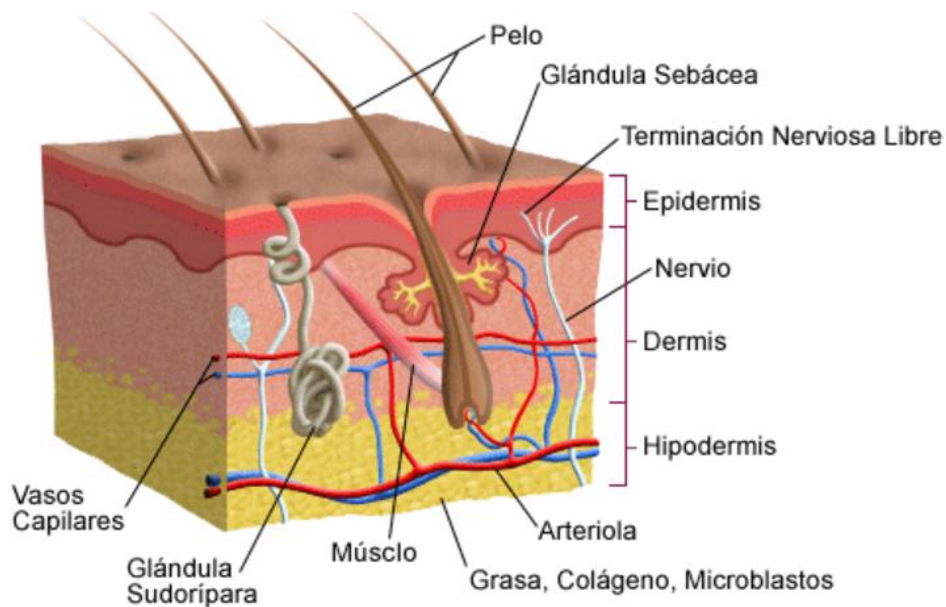
Generalidades sobre la piel

Anatomía

La piel es un órgano único en el cual un sinnúmero de enfermedades o lesiones son observables fácilmente, funciona como una interfase entre los órganos internos del cuerpo y el ambiente exterior. El sistema tegumentario como también es llamado consta de una capa de tejido con un grosor que oscila entre 0,5mm ubicado en los párpados hasta 5mm en el talón, cubre todas las superficies expuestas del cuerpo. Posee tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La piel es descrita como el órgano más grande del ser humano ocupando aproximadamente 2 metros cuadrados (Mcphee, 2014, p183). En la figura 1, se logra apreciar las distintas partes de la piel.

La capa más externa llamada epidermis protege a la piel contra la pérdida de agua y sirve de escudo protector contra la invasión de microorganismos que pueden causar enfermedades. La piel posee estructuras de anexos como las unidades ecrinas, que exudan sudor, unidades folículo sebáceas que producen pelo y aceites que lubrican la superficie de la piel evitando la resequead o daño alguno, éstas están ubicadas en la dermis que corresponde a la segunda capa. Dentro de la dermis los vasos sanguíneos nutren la piel de sangre con células sanguíneas y agentes que protegen contra la invasión de microorganismo como lo son los leucocitos, la piel posee, además terminales nerviosas y capa de células adiposas las cuales se agrupan y forman la hipodermis. Para fines terapéuticos, dermatológicos y cosmetológicos son de principal interés la epidermis y la dermis.

Figura 1. Partes de la piel.



Fuente: Tomado de <http://es.uhealthsystem.com/enciclopedia-medica/derm/anatomy>, Julio 2017

Fisiología de la piel

Como lo describe Mcphee, (2011) y mencionado por Campos y Wing (2009, p52), la piel como cubierta externa del cuerpo humano efectúa una gran variedad de funciones entre las cuales se encuentran:

- **Termorregulación:** Regula la temperatura del cuerpo el cual se lleva mediante alteraciones en la provisión sanguínea a nivel de la piel por la evaporación del sudor, disipando el calor hacia el área externa que lo rodea.
- **Protección:** Protege los tejidos más profundos contra la invasión de agentes microorganismos patógenos, de lesiones mecánicas, pérdida excesiva de agua, lesiones químicas, cambios súbitos de la temperatura y humedad ambiental externa, así como de la exposición prolongada ante las radiaciones solares ultravioletas.
- **Excreción:** La piel posee una función excretora complementaria a los pulmones. El

sudor posee una diversidad de sustancias: sales inorgánicas, ureas, ácido úrico, amoniaco y creatinina, que los hacen semejantes a la orina, el 99% del sudor está compuesto de líquido.

- **Capacidad sensitiva:** Establece conexión con el ambiente por medio de sus terminaciones nerviosas. Esta función logra llevarla a cabo por el gran número de terminaciones nerviosas o receptores que posee.
- **Función secretora:** Las glándulas sebáceas de la piel secretan grasa, la cual previene resequedad y agrietamiento de la piel, protege contra excesiva radiación ultravioleta y ayuda a mantener un cabello saludable. La producción de leche mediante las glándulas mamarias son derivados específicos de la piel.
- **Función nutricional:** En la piel se tiene el esteroide 7-dihidrocolesterol, el cual es transformado en vitamina D cuando se expone la piel ante la luz ultravioleta, esta vitamina participa en el proceso de absorción de calcio en el sistema digestivo.

Lesiones dermatológicas

El patrón de distribución y naturaleza de las lesiones en la piel ayudan a establecer la lista de diagnósticos diferenciales por considerar ayudando así lograr un diagnóstico asertivo y manejo clínico adecuado. Según Mcphee, (2011) el conocimiento de la patogenia y las posibles causas de las lesiones dermatológicas ayudan a simplificar la dermatología. Las lesiones dermatológicas se clasifican en primarias y secundarias.

Lesiones primarias

Son aquellas que se desarrollan como resultado directo del proceso de la enfermedad y se consideran entre ellas:

- **Mácula:** Área plana, circunscrita donde la piel con cambio de color, posee un diámetro de hasta 1 cm, cuando el diámetro es mayor a 1 cm se denomina mancha. Las máculas hiperpigmentadas pueden estar asociadas a problemas endocrinos como

hipotiroidismo e hiperadrenocorticismo. El cambio de color puede ser resultado de un exceso de pigmento, eritema o hemorragia.

- **Pápula:** Elevación pequeña y sólida de la piel, posee un diámetro menor a 1cm. Son inflamatorias y pueden apreciarse o sentirse con la yema de los dedos. Son el resultado de la acumulación local de células inflamatorias y es el estado inicial de una pústula.

- **Nódulo:** Elevación de la piel, es sólida con un diámetro mayor a 1cm, involucra capas más profundas de la piel. La superficie puede estar ulcerada, ser el resultado de procesos neoplásicos, procesos granulomatosos crónicos, acumulación de minerales o displasia.

- **Tumor:** Masa de gran tamaño que afecta todas las estructuras de la piel hasta el tejido subcutáneo, es una masa de tipo neoplásico, voluminoso el cual puede confundirse con abscesos o quistes, para ello se deberá realizar una punción.

- **Punción:** Elevación pequeña circunscrita de la epidermis que contiene pus, pueden ser superficiales o profundas, de aspecto amarillento o hemorrágico.

- **Roncha:** Elevación circunscrita consistente en edema dérmico. No posee límites definidos. Posee un tamaño mayor o igual a 1 cm con coloración rosada. Las causas más comunes incluyen picaduras de insectos, reacciones adversas a medicamentos y reacciones alérgicas.

Flora bacteriana de la piel

Como lo menciona Pelczar, Reid y Chan (2011) citado por Vargas (2016), la flora normal de la piel consiste de una variedad de microorganismos que coexisten en un individuo sano de forma equilibrada y pacífica, la cual es adquirida tiempo después del nacimiento y ésta se modifica constantemente durante su desarrollo; factores como la nutrición, estado inmunológico, edad, higiene personal, clima y medio ambiente juegan un papel en mantener este equilibrio, siendo predominante la presencia de bacterias, siendo

gram positivas en su mayoría. En personas adultas mayores y niños estos microorganismos pueden causar enfermedades.

Dentro de la flora microbiana gram-positiva normal se tiene del género *Staphylococcus spp*: *S. epidermidis*, y en menor grado *S. aureus*, *S. pyogenes*, así mismo: *Corynebacterium spp*, *Propionibacterium acnés*, *Micrococcus spp* y *Micobacterium*. El *estafilococos aureus* se encuentra principalmente en regiones como las axilas, comisuras, ingle, perineo y se relaciona principalmente con infección de heridas (p.441).

Estafilococos

Los autores Jawetz, Melnick y Adelberg (2011), mencionan que los estafilococos son un género de bacterias gram positivas con morfología esféricas los cuales se disponen en forma de “racimos” irregulares parecidos a un ramo de uvas, estos describen un desarrollo rápido gracias a su gran actividad metabólica dado que son capaces de provocar fermentación. Las especies patógenas suelen producir hemólisis, es decir, destrucción de hematocitos, coagulan el plasma y principalmente producir toxinas que son dañinas. Dentro del género existen 40 especies de las cuales el *S. aureus* es un patógeno importante en el ser humano (p199).

Se menciona que estos crecen rápidamente en medio de cultivo bajo condiciones aerobias y se desarrollan con mayor rapidez a una temperatura de 37°C. Son capaces de producir catalasa, ácido láctico, pero no así gas, son termoresistentes, y sobreviven en condiciones como baja humedad, soluciones isotónicas de cloruro de sodio al 9% entre otras (p.199).

Fuentes, prevalencia y factores de virulencia

Según Jawetz, Melnick y Adelberg (2011), el *S. aureus* produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano, casi todas las cepas de *S.aureus* producen una grupo de enzimas y citotoxinas dentro de éstas hay cuatro hemolisinas: alfa, beta, gamma y delta, nucleasas, proteasas,

lipasas, hialuronidasas y colagenasas, la función principal de estas proteínas es la de degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes de las bacterias (p.203).

Características del *Staphylococcus aureus*

Jawetz, Melnick y Adelberg (2011) mencionan que el *S. aureus* posee dos componentes en la pared celular: del ácido lipoproteico el cual juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas. La mayoría de los estafilococos produce catalasa (enzima capaz de desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativo.

S. aureus crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro, corazón, infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo, donde se recupera fácilmente. Se debe usar un medio selectivo en muestras clínicas donde hay bacterias Gram negativas junto con *S. aureus*. El *Staphylococcus aureus* produce infecciones, tanto en la comunidad como a nivel intrahospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus*, por lo general, son agudas, piogénicas y superficiales, de igual manera, se pueden producir cuadros más complicados como meningitis, peritonitis, osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial, *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, y de prótesis.

Jawetz, Melnick y Adelberg (2011) mencionan que el principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, detectándose en los pacientes sanos, muy comúnmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentarse sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda.

Además, posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa,

estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico), acaba produciendo infección.

Infecciones producidas por *S. aureus*

Según lo menciona Castañón (2012, pp79-80), el *Staphylococcus aureus* es una de las principales causas de infecciones adquiridas en la comunidad y a nivel hospitalario los cuales pueden dar lugar a graves consecuencias. Las infecciones nosocomiales por *S. aureus* pueden provocar bacteremias y afectar la piel (impétigo) , los tejidos blandos y el tracto respiratorio inferior, se le ha descrito como el responsable de bacteremias asociadas a catéteres venoso, así como a neumonías. También, puede provocar graves infecciones como endocarditis y osteomielitis.

Además de las infecciones mencionadas anteriormente, esta bacteria es a menudo responsable de enfermedades mediadas por toxinas, tales como síndrome de choque tóxico, síndrome de la piel escaldada y enfermedades transmitidas por alimentos. Los pacientes hospitalizados están particularmente expuestos a infecciones por *S. aureus* debido a que su sistema inmune se encuentra comprometido

Como lo menciona Porth (2014), cuando las bacterias patógenas invaden la piel se puede desarrollar infecciones superficiales o sistémicas, las infecciones cutáneas bacterianas se clasifican con frecuencia como primarias o secundarias, las primarias son superficiales como el impétigo o el ectima, las infecciones secundarias corresponden a infecciones cutáneas más profundas como las úlceras infectadas o celulitis (p.1546).

Pruebas de laboratorio para diagnóstico de infecciones bacteriana por *S.aureus*

Muestras: Jawetz, Melnick y Adelberg (2011), describen que en muestras de líquidos corporales, tales como: líquido cefalorraquídeo, pus, sangre, aspirado de la tráquea se pueden usar para realizar las pruebas de laboratorio en la identificación del agente patógeno (p.203).

Frotis: Los estafilococos se observan como cocos en racimos al microscopio, aplicando la tinción de gram se clasifican como gram-positivos (p.203).

Cultivo: Los autores describen que las muestras se siembran en placas de agar sangre que al término de 18 horas y con una temperatura de incubación de 37°C se originan colonias. El *S.aureus* se caracteriza por fermentar el manitol por lo que es posible el uso de otro tipo de medio de cultivo a base de sal-manitol y se puede usar la identificación del microorganismo en cuestión (p.204).

Prueba de catalasa: Los autores mencionan que se coloca una gota de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos y se le aplica una muestra de la colonia de las bacterias, se empiezan a formar pequeñas burbujas en la muestra observada indicando de esta manera que el resultado es positivo (p.204).

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y concentración mínima inhibitoria (CMI)

Según lo descrito por Clinical Laboratory Standards Institute CLSI (2017), una bacteria es sensible cuando ha generado un halo de inhibición de entre 30mm y 35mm de diámetro, de la misma forma se describe como regla general que una cepa es resistente cuando genera halos de inhibición menores a 15mm. Debido a la creciente resistencia bacteriana, esta prueba de sensibilidad a los antibióticos es la que establece a cuál o cuáles sustancias con actividad antibacteriana presenta sensibilidad una bacteria determinada y en qué proporción lo hace. Mediante la aplicación de este ensayo es posible establecer cuáles sustancias antibacterianas son efectivas y permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Con ello se puede establecer que la CMI es la mínima concentración de una sustancia que logra inhibir el crecimiento y desarrollo de una bacteria específica.

La CLSI (2017) describe que suele emplearse dos técnicas para determinar la CMI: el método de difusión en agar y la dilución en caldo o agar. La técnica de dilución en caldo o agar consiste en someter a crecimiento la bacteria en estudio en un tubo de ensayo que contiene el medio de cultivo en la cual puede desarrollarse el microorganismo (p53).

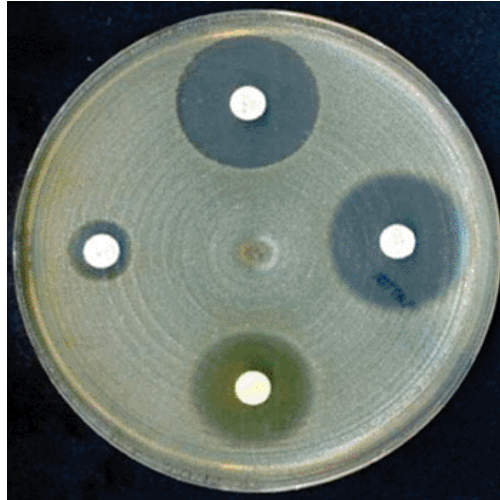
Dentro de cada tubo se adicionan de manera ascendente distintas concentraciones de la sustancia en estudio con actividad antibacteriana, la concentración a la cual no se genere crecimiento bacteriano se toma como la concentración mínima inhibitoria (CMI). De la misma forma es posible obtener la concentración mínima bactericida o CMB la cual es la concentración a la cual se tendrá muerte de las bacterias en estudio (p53).

El método de difusión en agar es ampliamente usado por su facilidad, seguridad de manejo, bajo costo y preparación. Esta consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada, discos de papel de diámetro específico impregnados de cantidades conocidas de la sustancia con actividad antibacteriana en estudio. Al colocar los discos la sustancia impregnada difunde al medio de cultivo donde a partir de 24 horas posteriores se puede observar que puede o no aparecer alrededor de los discos lo que se conoce como “halos de inhibición” (p56).

Se menciona que la medición del halo de inhibición que se ha generado es otra técnica para determinar la CMI. La interpretación que se le debe dar al halo de inhibición es a tres niveles distintos: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Para realizar este ensayo, se recomienda el uso del medio de cultivo Mueller-Hinton para pruebas de sensibilidad o antibiograma. El halo de inhibición que se genera tiende a ser circular alrededor del disco impregnado con la sustancia, el cual posee una simetría que es fácilmente medible (p.56). La figura 2 muestra cómo se observa los halos de inhibición descritos con anterioridad en la realización del ensayo para determinar actividad antibacteriana, CMI y CMB. Pueden realizarse con distintas sustancias que se impregnan en el disco de papel y se colocan de forma tal que afecta el antibiograma.

Según Malbran (2011) citado por Vargas (2016) el halo de inhibición que se forma no solo dependerá de la sensibilidad bacteriana o la cantidad de sustancia con actividad bacteriana, sino que existen factores adicionales, tales como el medio de cultivo usado, pH, composición, capacidad de difusión de la sustancia en el medio, la temperatura, velocidad de duplicación bacteriana, tamaño y fase de crecimiento del inóculo (p.205)

Figura 2. Halos de inhibición para determinar actividad antibacteriana, CMB, CMI.



Tomado de: <http://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/blank-ch2nw>, Julio 2017.

Plantas Medicinales

Según Mendoza (2008), las plantas medicinales son aquellas que disponen de principios activos o metabolitos que pueden utilizarse en el tratamiento y curación de enfermedades, es bien sabido que el hombre desde la antigüedad ha experimentado con distintos tipos de hierbas para el desarrollo y tratamientos de ciertas patologías. Entre sus principales objetivos se tiene que: busca sintetizar compuestos de estructuras conocidas para producir entidades que sean patentables con mayor eficacia y menos toxicidad, emplearlas como herramientas farmacológicas, o bien, el uso de la planta o partes de ella como remedio medicinal, o bien, como un fitofármaco.

Fitofármacos

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) define a los fitofármacos como: “*productos obtenidos por procesos tecnológicos adecuados en el cual se emplean materias primas de origen vegetal, con una finalidad profiláctica, curativa, paliativa o bien para fines de tipo diagnóstico la cual se caracteriza por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos de su uso así como la reproducibilidad y la constancia de su calidad.*” (Tomado de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18840es/s18840es.pdf>, Octubre 2017)

Los fitofármacos se utilizan, tanto para el cuidado de la salud así como en la mejora, en algunos casos será suficiente su uso para curar una enfermedad, o bien, ser un coadyuvante de otros medicamentos en la disminución o alivio de síntomas. Se establece que su principal campo de acción son las afecciones leves y moderadas, así como en algunas enfermedades crónicas, corresponden a una terapéutica suave, poco agresiva y con un bajo porcentaje de efectos secundarios (Madrigal, F. 2017, pp 34).

Generalidades del *Cymbopogon citratus* o zacate limón

Según lo descrito por Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann (2017) realizan un estudio exhaustivo de la especie *C.citratus*, el cual es una planta que pertenece al género de donde se tienen 55 especies distintas las cuales están presentes en las áreas tropicales de Asia, Centroamérica, Sudamérica, África y otras zonas tropicales del mundo. Se caracteriza por pertenecer al grupo botánico de plantas tipo C₄ las cuales poseen tallos rígidos, cortos con rizomas, describe un sabor y aroma cítrico, las cuales pueden ser usadas sus hojas secas o bien verdes. Su nombre deriva de las palabras griegas “kymbe” (barco) y “pogon” (barba), refiriéndose a la disposición en forma de espiga de la planta. Esta planta es usada comúnmente en preparados te, sopas, como especias en la preparación culinaria de pescados, mariscos y aves.

Etnofarmacología de la planta

La planta dependiendo del país así son los usos que se describen, a continuación, se hace una descripción de estos mismos basado en lo reportado por Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann (2017):

- Argentina: La decocción de las hojas se toman de forma oral con la bebida “mate” o té para el dolor de garganta, como antiemético y contra el “empacho”.
- Brasil: El té de hojas es popularmente usado como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, diurético y sedativo.
- Cuba: La decocción de las hojas secas es tomado de forma oral como agente hipotensivo, catarro y para el reumatismo.
- Egipto: El extracto de hojas secas en agua caliente es tomado en forma oral como agente antiespasmódico y diurético.
- India: Las partes frescas de la planta es usado para repeler culebra. De dos a tres gotas del aceite esencial en agua caliente es tomado oralmente con agua caliente para trastornos gástricos. Para tratamiento del cólera, se emplean gotas del aceite combinado con jugo de limón. Los extractos secos de las hojas en agua caliente es usado para dolores severos de cabeza y fiebre. El té es usado también como sedativo del sistema nervioso central.
- Indonesia: Los extractos en agua caliente de la planta completa se emplea como emenagogo.
- Malasia: Los extractos calientes de la planta completa es tomado en forma oral como emenagogo.
- Tailandia: Los extractos frescos de la planta se emplean como fragancia y son digeridos como condimento. Los extractos en agua caliente de las raíces secas son tomados oralmente para la diabetes.
- Estados Unidos: Los extractos en agua caliente de la planta entera son usados en forma tópica para curar heridas y fracturas óseas.

- Costa Rica: Se emplea popularmente para tratar la tos, como carminativo agente expectorante y depurativo.

Clasificación taxonómica

La base de datos de plantas o Plants Database del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (2017), brinda la siguiente clasificación sistemática de la planta:

- Reino: Plantae
- Division: Magnoliophyta
- Clase: Liliopsida
- Orden: Poales
- Familia: Poaceae
- Género: *Cymbopogon* Spreng
- Especie: *citratus*

Nombres comunes

Según lo reportado por Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann (2017), a continuación, se describe el nombre de uso común usado por la población en diversos países para referirse a la *C. citratus*:

- Brasil: Capim-cidrao, caprim-santo
- Egipto: Zacate limón
- Países anglosajones: lemongrass, citronella, squinant
- Etiopia: Tej-sar

- India: Sera, verveine
- Indonesia: Sereh
- Italia: Cimbopogone
- Malasia: Sakumau
- México: Zacate limón
- Suecia: Citrongrass
- Tailandia: Ta-khrai
- Turquía: limón out
- Estados Unidos: Citronella

Sinónimos

Según lo reportado por Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann (2017), existen otros términos usados como sinónimos para referirse al *C. citratus*, tales como:

- Tallos de hierba limón.
- *Andropogon citratus*.

Descripción botánica y partes de la planta

Aviseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji (2015), establecen que, dentro de las partes que se emplean se tienen las hojas y la planta entera que incluye tallo y raíces. El zacate limón es una planta del trópico que crece en aglomeraciones o racimos densos los cuales pueden llegar a medir hasta 1,8 metros de altura y 1,2 de ancho, presenta rizomas cortos. Las hojas tienen un ancho entre 1,3-2,5 cm y 90 cm de largo, las hojas son de color verde brillante con tonalidades azuladas al reflejo de la luz solar, expele un aroma cítrico

cuando se frota sus hojas, posee hojas simples, bordes lisos, forma lineal, venación paralela. La planta rara vez produce floración, sin embargo, cuando lo hace es en forma de panículos. Describe inflorescencias con una longitud que va desde 30-60 cm, en forma de racimos y espigas extendidas.

Figura 3. Partes de zacate limón *Cymbopogon citratus*.



Fuente: Tomado de <https://www.lasemillaria.com/Comprar/Semillas-de-Zacate-lim%C3%B3n-Agroecol%C3%B3gicas>, Julio 2017.

Fitoquímica de la planta

Terpenos volátiles

Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann (2017) y Aviseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji (2015), describen que la composición química de los aceites esenciales del *Cymbopogon citratus* varía de acuerdo en el origen geográfico. Dentro de sus principales componentes se tiene: terpenos, alcoholes, cetonas, ésteres y aldehídos. La composición de la especie cultivada en el oeste de la India se establece que varía entre un

0,2% y un 0,5% siendo su principal componente *citral* el cual es una mezcla estereoisomérica de dos monoterpenos aldehídos: el isómero *trans*-geranial (40%-62%) y el isómero *cis*-neral (25-38%). En la siguiente tabla, se resumen las proporciones de los distintos componentes del *C.citratus* (p.4).

Tabla 1. Composición porcentual del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*.

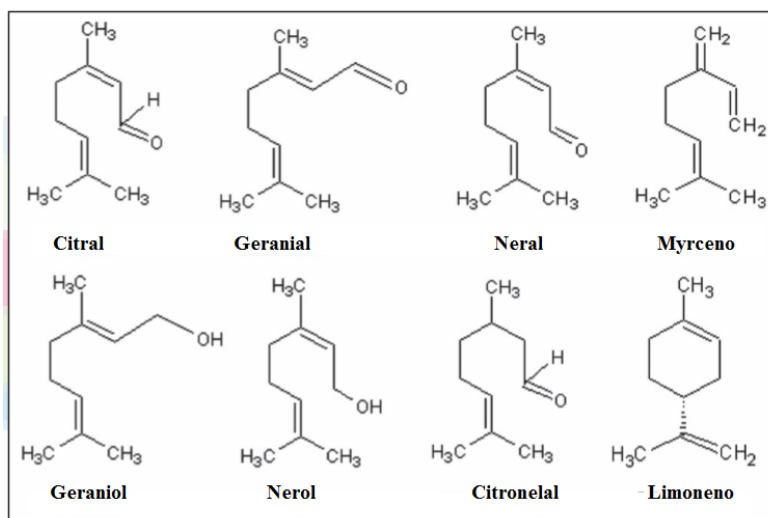
Nombre del compuesto	Porcentaje del componente
α -Citral	40,8
β -Citral	32
Nerol	4,18
Geraniol	3,04
Citronelal	2,10
Terpinoleno	1,23
Acetato geranil	0,83
Mirceno	0,72
Terpinol	0,45
Metilheptanona	0,2
Borneol	0,1-0,4
Linalil acetato	0,1
α -Pino	0,07
β -Pino	0,04
Limoneno	Trazas

Linalol	Trazas
β -Cariofileno	Trazas

Fuente: Tomado de Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann, (2017, p4).

La figura 4 resume las estructuras químicas de los principales constituyentes que se encuentran presentes en el aceite esencial, los monoterpenos son los que predominan dentro de los cuales se tienen: citral, citronelal, limoneno, Myrceno, geranial, neral, geraniol. Algunos sesquiterpenos tales como: α -oxobisabolona, β -Cadineno y Humuleno.

Figura 4. Estructura química de los principales constituyentes del *C. citratus*.

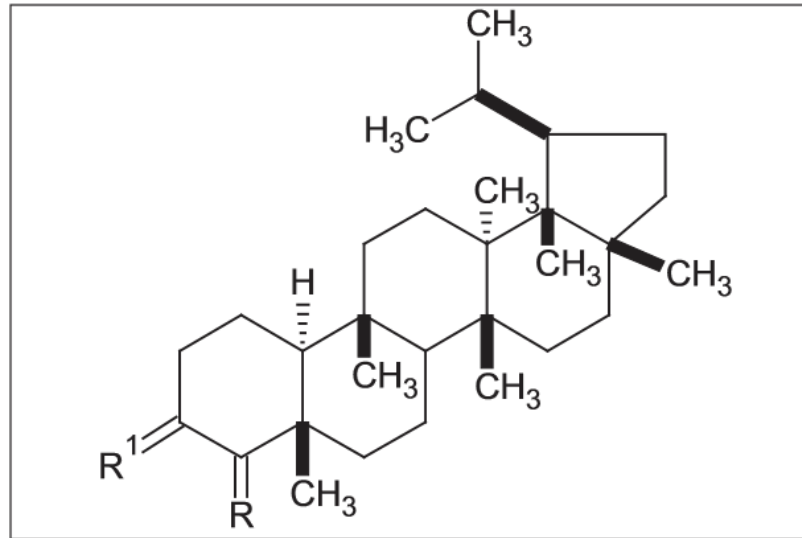


Fuente: Tomado de Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann, (2017, p4).

Terpenoides no volátiles

Aviseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, (2015) describen que el género de *Cymbopogon* contiene una cantidad de terpenos no volátiles. Se ha descrito la identificación y presencia del *cymbodiacetal* en la especie *C.martinii*, *triterpenoides* como el *cymbopogone* y *cymbopogol* que son obtenidos de las hojas en la especie *C.citratus*.

Figura 5. Estructura química de triterpenos no volátiles: cymbopogone y cymbopogonol presente en *C. citratus* (zacate limón).



Fuente: Tomado de Shah, Shri, Panchal, Sharma, Singh y Mann, (2017, p4).

Alcaloides

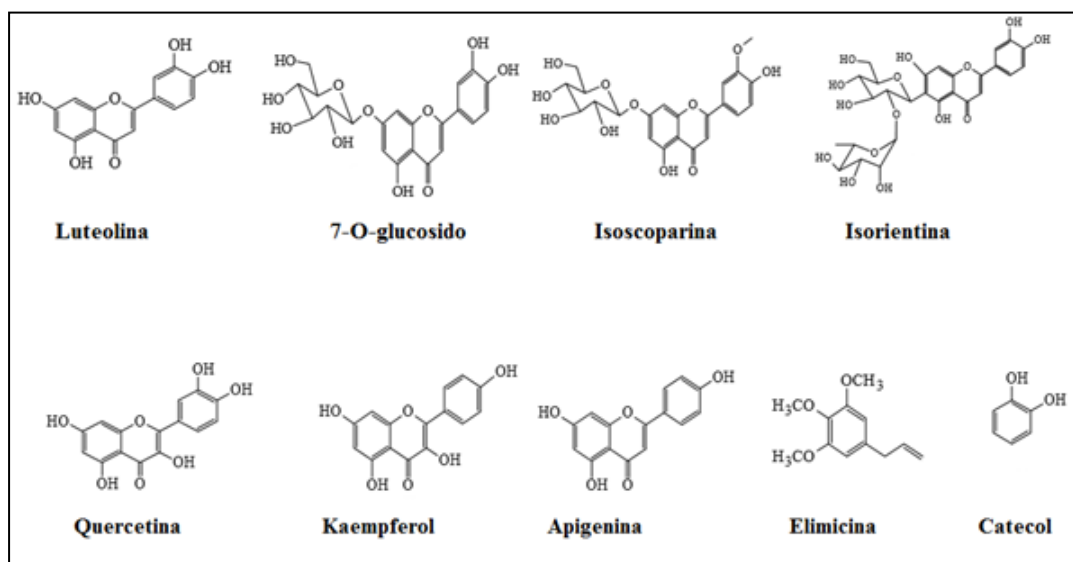
Aviseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, (2015, p 7443); reportan que los rizomas del *C. citratus* de Nigeria, se ha encontrado que contiene cerca de un 0,52% de alcaloides obtenido de una muestra de 300 gramos de material de la planta.

Flavonoides

Los flavonoides a los cuales se les describen propiedades antioxidantes, han sido aislados de especies de *Cymbopogon*, entre los principales se tiene: isoorientin y triclin que fueron aislados usando diclorometano y obtenidos de *C.parkeri*. Se ha evaluado el uso de estos compuestos con actividad relajante del músculo.

De los rizomas y hojas de *C.citratus* se ha obtenido: luteolina, 7-O-glucosido (cynarosido), isoscoparina y la 2''-O-rhamnosyl (isorientina). Otros compuestos flavonoides se han aislado de las partes aéreas de la planta: quercetina, kaempferol, apigenina, elimicina, catecol, ácido clorogenico, ácido cafeico y la hidroquinona (Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, p 7443).

Figura 6. Estructuras químicas de algunos flavonoides presentes en *C. citratus*.



Fuente: Tomado de Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, pp 7443.

Taninos

Se han descrito la presencia de taninos, sin embargo, la separación y cantidad presente es prácticamente despreciable, según menciona Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, extractos fraccionados de especies colectadas en Portugal se reporta cantidades por debajo de 10mg en material seco de taninos hidrosolubles como la protocianidina, el *C. citratus* de Nigeria muestra cerca de un 0,6% de taninos (p.7446).

Farmacología

Distintos bioensayos han confirmado el potencial de las especies de *Cymbopogon* para diferentes usos. El *C. citatus* se ha encontrado que posee actividad quimioprotectora hepática en ratas que denotan patologías en este órgano. En África extractos de *C. citratus* se ha empleado para el tratamiento de candidiasis bucal en pacientes VIH positivos con efectos comprobados y efectivos.

La actividad insecticida es uno de los efectos biológicos que más se han descrito del género *Cymbopogon* como agente repelente contra mosquitos y protector de cultivos. Extractos de aceite esencial de *C. martinii* han sido estudiados encontrándose alta actividad anti-helmíntica contra *Caenorhabditis elegans*, con LD50: 125,4 µg/mL. Las especies de *Cymbopogon*: *C. schoenanthus*, *C. giganteus* y *C. citratus* han demostrado efectividad de un 100% contra el mosquito *Anopheles gambiae* (Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, p 7446).

Actividad anticancerígena se ha descrito siendo el *C. citratus* describiendo actividad inhibitoria en la fase inicial de la hepatocarcinogenesis, actividad anti-protozoaria, antimicrobiana, anti-inflamatoria, anti-diabética, anticolinesterásica, antifúngica y larvicida (Avisseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, p 7446-7447). En la tabla 2 se resume los distintas actividades farmacológicas descritas para *C. citratus*.

Tabla 2. Información farmacológica descrita para *Cymbopogon citratus*.

Farmacología descrita	Actividad
Citotoxicidad	Demuestra alta toxicidad contra células ováricas de hámster chino (IC ₅₀ :10,63µg/mL), moderada toxicidad contra células fibroblásticas humanas línea 138 (IC ₅₀ : 39,77µg/mL)
Insecticida	LC50: 48,6µg/mL contra larvas de moscas.

Efectos neuronales	Actividad sedativa, ansiolítica y anticonvulsivante.
Anti-tripanosomal	Actividad moderada contra <i>Trypanosoma brucei</i> IC ₅₀ : 1,837±0,13 µg/mL
Antidiabetico	Denota actividad inducida contra Poloxamero-407 en Diabetes Mellitus tipo II aplicado en ratas de laboratorio.
VIH-SIDA	Efectividad contra candidiasis oral
Larvicida	Alta inhibición y mortalidad contra larvas de <i>A.aegypti</i>
Quimioprotector	Inhibe la fase temprana de hepatocarcinogenesis en ratas.
Antiinflamatorio	Extractos en hexano inhibe iNOS (Enzima NO sintasa inducida), producción de NO, y varias vías inducida de lipo-polisacáridos (LPS).

Fuente: Tomado de Aviseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh-Chungag y Oyedeji, 2015, p 7447.

Extracción y aislamiento de aceites esenciales

La separación y extracción de solutos o compuestos bioactivos presentes en plantas son procedimientos muy empleados en la agroindustria alimenticia, industria farmacéutica y en la industria cosmética, en general. Para la separación de estos de la fase sólida (material orgánico, partes de plantas, tejidos) se hace necesario poner en contacto directo con una fase líquida que sea afín a los compuestos de interés, ambas fases deben entrar en contacto íntimo y los solutos difunden desde la fase sólida a la fase líquida cuando se llega

a un equilibrio químico lo cual permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como *lixiviación* y existen diferentes métodos (Martínez, D.M., 2016).

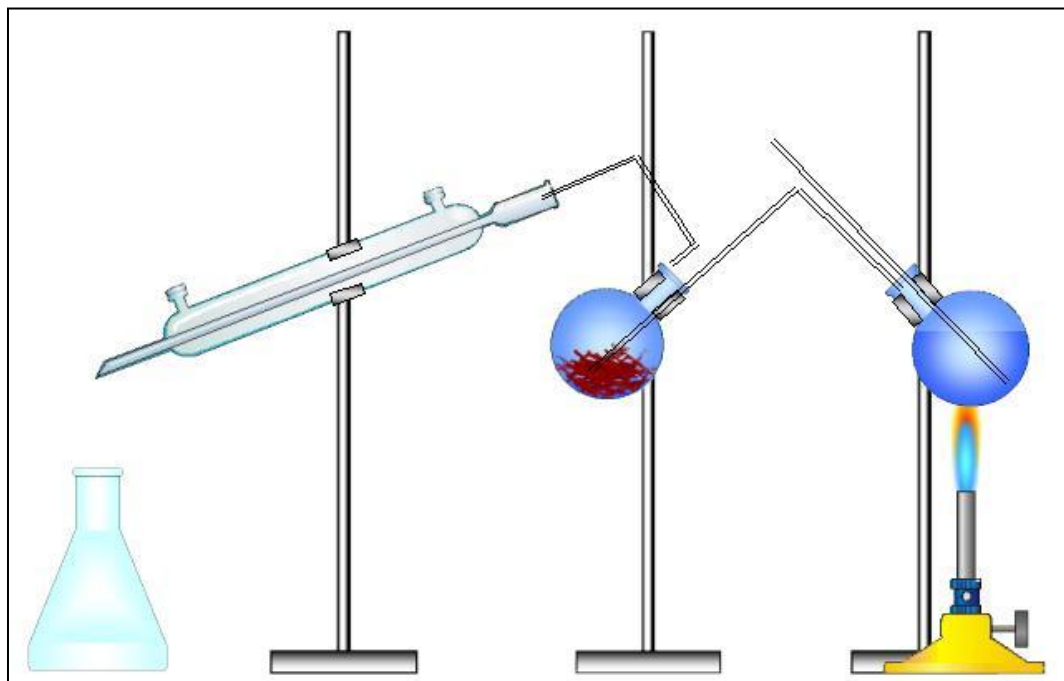
Para la extracción de aceites esenciales se emplean como fase líquida solventes orgánicos, tales como: hexano, diclorometano, etanol, cloroformo, agua y éter. Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físico-químicas como densidad, viscosidad, índice de refracción actividad óptica, entre otros.

Destilación por arrastre con vapor

Según lo descrito por Martínez (2016, p10), en este proceso se lleva a cabo la *“vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla sólida previamente macerada o triturada para favorecer el contacto entre fases”*, para ello, se hace pasar o inyectar vapor de agua directamente en el seno de la mezcla sólida. Este vapor en su paso por la mezcla empieza a *“arrastrar”* el componente volátil el cual, posteriormente, mediante un sistema de enfriamiento o condensación se pasa a fase líquida en el cual se tendrá una mezcla inmiscible agua-aceite esencial. Posteriormente, aplicando métodos de extracción con solventes inmiscibles es posible su separación física, o bien, usando métodos físicos como la decantación. Este método se caracteriza por su bajo costo, sencillo, sin embargo, tiene el inconveniente que requiere de tiempo prolongado y bajos rendimientos por evaporización de los aceites esenciales, a la vez, que hay una alta posibilidad de descomposición por las altas temperaturas del vapor de agua (más de 90°C).

Para la aplicación de este método, es importante que se cumpla la condición que el componente volátil no sea soluble en agua dado que la inmiscibilidad permite su separación posterior. El uso de vapor de agua es muy útil dada las características altamente polares del agua, disponibilidad y baja reactividad con los componentes de aceites esenciales y que cumpla la condición que el aceite esencial no sufra oxidación, daño o descomposición térmico como se mencionó con anterioridad. En la figura 7, se ilustra el equipo que es usado para este proceso:

Figura 7. Equipo empleado para la extracción de aceites esenciales por destilación por arrastre con vapor.



Fuente: <https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=vCR2r%2bRf&id=A4EA3D31B166741E9B3425431188C41ED69066DB&thid=OIP.vCR2r-Rfj78q3D4TU5U5egEsC-q=equipo+destilacion+arrastre+por+vapor&simid=608035064272519487&selectedIndex=0&ajaxhist=0>, Julio 2017

Extracción empleando aparato Dean-Stark

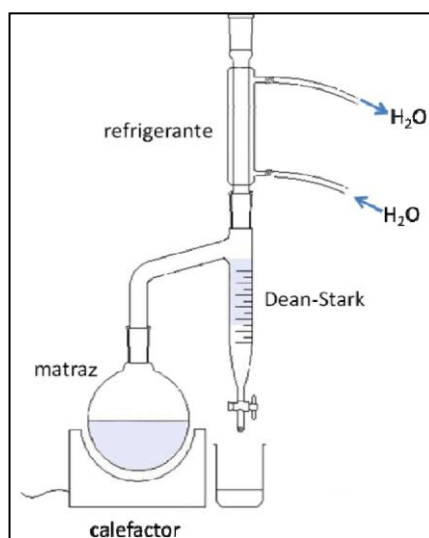
El aparato Dean-Stark, también, llamado colector Dean-Stark o trampa Dean-Stark, es una pieza de vidrio que se emplea para la separación o eliminación de agua en un medio de reacción, se usa acoplado a un condensador y matraz colector para eliminar de forma continua el agua que se produce durante una reacción química que tiene lugar a la temperatura de reflujo.

Dentro de sus usos iniciales estaba la de extraer agua de muestras de petróleo, sin embargo actualmente posee varios usos dentro de los cuales se encuentra la de separar aceites esenciales en muestras de plantas cuando se mezclan con agua, asemejando un proceso de arrastre con vapor. La diferencia de densidad existente entre el agua y el aceite

esencial facilita la separación en la trampa, aunque, posteriormente, se requieran procesos o técnicas de purificación.

El equipo o aparato se muestra en la figura 8, el aparato Dean-stark consta de una pieza vertical cilíndrica de vidrio, con graduación volumétrica en toda su longitud, posee una llave de teflón en la parte inferior similar a una bureta volumétrica, en la parte superior del cilindro se acopla la parte inferior del condensador de reflujo, por diferencia en las densidades es posible la separación.

Figura 8. Equipo empleado para la extracción de aceites esenciales por aparato Dean-Stark.



Fuente: Tomado de <http://www.ub.edu/talq/es/node/238>, Julio 2017

Técnicas espectroscópicas para identificación y cuantificación de aceites esenciales

Espectroscopía infrarroja

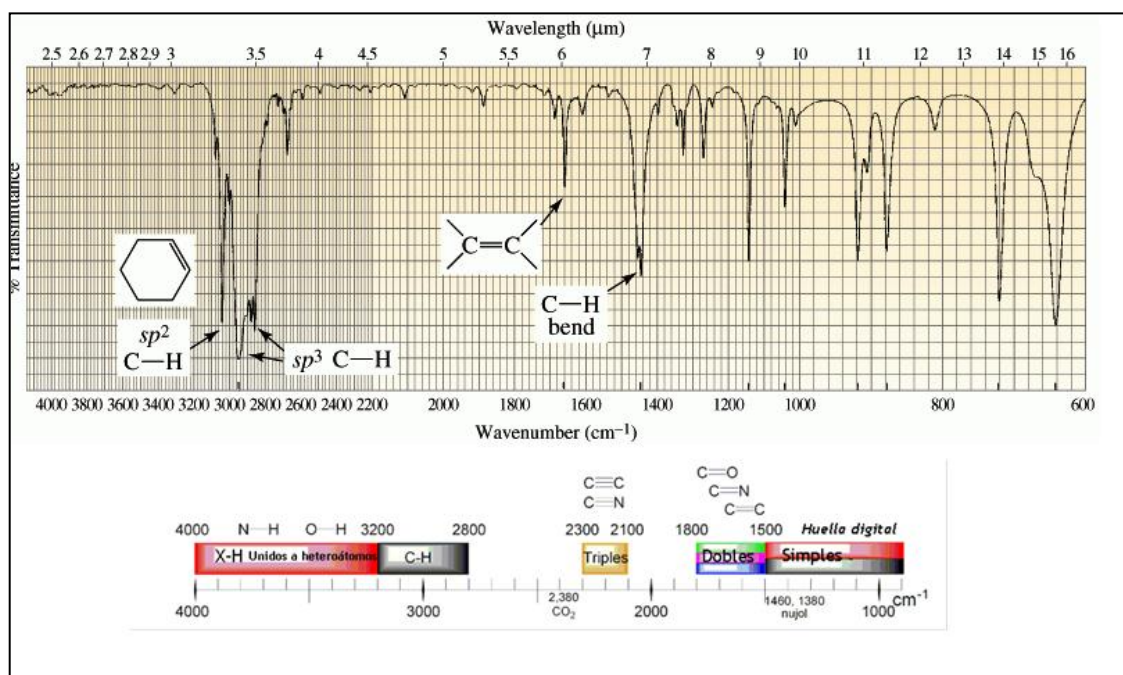
Skoog, Holler y Nieman (2001) mencionan que la espectrometría de infrarrojo es un tipo de espectrometría de absorción que emplea la región infrarroja del espectro de radiación la cual va desde 12800cm^{-1} hasta 1000cm^{-1} . La espectrometría infrarroja o IR es empleada para la identificación de compuestos orgánicos e inorgánicos que tengan grupos funcionales que absorban en la región descrita (p.409-410).

Dicha técnica se basa en el hecho que los enlaces químicos de las sustancias poseen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula, geometría molecular, masa atómica y acoplamiento vibracional. La absorción de radiación en la región IR pueda suministrar información sobre la naturaleza o identidad de los compuestos a partir de la presencia de grupos funcionales y estructura de las moléculas (p412).

Skoog, Holer y Nieman (2001) destacan que la región comprendida entre 3600cm^{-1} y 1250cm^{-1} se emplea para identificar grupos funcionales comunes y la región que se encuentra entre 1200cm^{-1} a 600cm^{-1} es conocida como huella dactilar donde pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a cambios significativos en el espectro IR (p.415).

La figura 9 describe, en general, los grupos funcionales y su región del espectro en el cual aparecen, muestra las divisiones en las que se podría dividir el espectro infrarrojo para lograr identificar, grupos funcionales de una especie química de interés y lograr elucidar su identidad según sea el propósito de investigador.

Figura 9. Espectro infrarrojo IR con ciertos grupos funcionales presentes en compuestos orgánicos.



Fuente: Tomado de <http://www.ugr.es/~quiored/espec/ir.htm>, Julio 2017.

Existen tablas generales en las que se muestran o enlistan valores específicos de las longitudes de onda para cada grupo funcional, principalmente de especies de compuestos orgánicos. Para ello, es importante considerar factores tales como: pureza, concentración de la muestra, ausencia de agua, así como variables propias del equipo de medición como la calibración por ejemplo. La tabla 3 se detalla valores de frecuencias de vibración generales para grupos funcionales en el espectro infrarrojo.

Tabla 3. Frecuencia de vibración general para grupos funcionales en el espectro infrarrojo IR usados para la identificación de compuestos orgánicos.

Grupo funcional	Tipo de vibración	Frecuencia (cm ⁻¹)
C-H	Alcanos (estiramiento)	3000-2850
	-CH ₃ (flexión)	1450-1375
	-CH ₂ (flexión)	1465
	Alquenos (estiramiento)	3100-3050
C=C	Aldehído	2900-2800
	Alqueno	1680-1600
C≡C	Aromático	1600-1475
	Alquino	2250-2100
C=O	Aldehído	1740-1720
	Cetona	1725-1705
	Ácido Carboxílico	1725-1700
	Éster	1750-1730
C-O	Alcohol, éter, éster, ácido carboxílico	1300-1000
O-H	Alcohol, Fenoles	3650-3200
	Ácido Carboxílico	3400-2400
N-H	Aminas primarias, secundarias, Amidas	3500-1550
C-N	Aminas	1350-1000
N=O	Nitro	1550-1350
S-H	Mercaptanos	2550
S=O	Sulfóxidos	1050

Fuente: Tomado de Skoog, Holer y Nieman (2001).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la medición de la relación masa/carga de especies iónicas relacionadas con el analito que se está investigando. Esta técnica se puede utilizar para determinar la masa molecular y la composición elemental de un analito, así como la elucidación de la estructura (USP40, pp 665).

Es una técnica sensible y altamente específica para la identificación de compuestos. La identificación o verificación de estructuras mediante Espectrometría de masas es particularmente potente cuando se usa junto con la técnica de separación tal como cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se puede obtener mayor especificidad en el análisis usando espectrometría de masas en tandem (MS/MS) o espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) la cual permitir cumplir con requerimientos más estrictos en cuanto a la exactitud de la masa determinada (USP40 pp666).

Formas Farmacéuticas

Geles

Los geles son semisólidos que consisten en una dispersión de partículas inorgánicas pequeñas o de moléculas orgánicas que son interpenetradas por una solución o líquido que contiene un agente gelificante que proporciona dureza y cuerpo. Las jaleas son un tipo de gel que presenta un contenido mayor de agua. Los geles se pueden clasificar en sistemas de una o dos fases (USP 40, pp 1699).

Un gel de dos fases consiste de una red de pequeñas partículas discretas, estos suelen ser tixotrópicos, los cuales forman semisólidos durante el reposo y se vuelven menos viscosos al agitarlos. Para garantizar la homogeneidad estos deben agitarse antes de su uso.

Los geles de una sola fase constan de macromoléculas orgánicas distribuidas uniformemente en todo el líquido de forma tal que no existe ningún límite evidente entre las macromoléculas dispersas y el líquido. Los geles de una sola fase se fabrican a partir de macromoléculas naturales o sintéticas: carbomero, hipromelosa, almidón o con gomas naturales, tales como: tragacanto, xantan o goma guar, estos últimos se les conoce como mucilagos. Los geles se pueden administrar por vía tópica o mucosa.

Dentro de las ventajas que ofrecen es que son fáciles de aplicar, fácil eliminar o remover, son bien tolerados por el paciente, algunos producen sensación de frescura. Dentro de las desventajas se tiene que pueden presentar o denotar incompatibilidad con una variedad de principios activos y bajo poder de penetración (USP 40, pp 1699).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En este apartado se describirán cuáles son los instrumentos y técnicas que se emplearán para la recolección de datos, así como se define el tipo de investigación y detalle de los procedimientos o protocolos aplicados con el objetivo o finalidad de brindar validez y autenticidad al trabajo de investigación, se considera, además cómo se será su enfoque, diseño, variables, instrumentos, proceso de recolección de datos entre otros.

Enfoque

La presente investigación va a consistir en la elaboración y observación de procedimientos realizados o ejecutados, tanto en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, en los cuales se aplicarán los conocimientos adquiridos para la extracción, identificación de muestras; así mismo, ejecutar métodos microbiológicos para demostrar la capacidad antibacteriana y cumplir con los objetivos del proyecto. Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p.96 establecen que “El enfoque cuantitativo emplea la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías”, por tanto, el presente trabajo de investigación es de tipo cuantitativo.

Diseño

Los autores Hernández, Fernández y Baptista (2014, p45), explican que el diseño de una investigación es referida al plan, estrategia que es concebida para la obtención de información cuya finalidad es la de resolver un planteamiento del problema. Considerando que el problema planteado, así como los objetivos y proyecciones, la investigación por realizar será de tipo experimental dado que consiste en la obtención de extractos de aceites esenciales con distintos métodos químicos disponibles, la identificación de las sustancias activas obtenidas de la planta *C. citratus*, así como pruebas *in vitro* para determinar la

actividad antibacteriana del aceite esencial de la planta contra un microorganismo específico: *S.aureus*.

Variables

En la presente investigación, las variables en estudio se derivan de los objetivos específicos planteados.

Tabla 4. Variables de la investigación.

Objetivo	Variable o variables	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentalización
Realizar la extracción del aceite esencial de zacate limón mediante el método arrastre con vapor y el método de extracción con el aparato Dean-Stark.	Aceite esencial	Son sustancias de naturaleza oleosa, aromáticas encontradas en las plantas, se distribuyen en distintas partes de la planta (Oliveira, 2005, párr.4)	Se obtendrá mediante el métodos de arrastre con vapor y el método empleando Dean-Stark	Equipo de arrastre con vapor, Equipo Dean-Stark.
Identificar la presencia de los metabolitos activos en el aceite esencial de zacate limón.	Principio activo	Son sustancias activas que denotan propiedades terapéuticas, farmacológicas y que definen y sirven para la clasificación de la planta.	Identificar el o los principios activos mediante el uso de espectroscopia infrarroja, cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), técnicas de laboratorio para identificación cualitativa de grupos funcionales presentes en el aceite esencial de zacate limón.	Espectrómetro infrarrojo, Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. Tubos de ensayo, soluciones de reactivos específicos para grupos funcionales.
Establecer la actividad del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (zacate limón) en el crecimiento in vitro de <i>Staphylococcus aureus</i> , mediante la medición de halos de inhibición.	Actividad antibacteriana	Modificaciones o alteraciones en la función de la bacteria causado por agentes químicos externos produciendo inhibición en el crecimiento de la bacteria.	Medir los halos de inhibición en medio de cultivo específico de agar, así como la comparación con un control positivo.	Placas Petri, medios de cultivo preparados, incubadoras, cristalería, regla de medición, cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .

Elaborar una forma farmacéutica de aplicación tópica gel a partir del aceite esencial de zacate limón.	Gel	Los geles son semisólidos que consisten en una dispersión de partículas inorgánicas pequeñas o de moléculas orgánicas que son interpenetradas por una solución o líquido que contiene un agente gelificante que proporciona dureza y cuerpo. Las jaleas son un tipo de gel que presenta un contenido mayor de agua (USP40, p 666)	Diseñar y elaborar un gel con propiedades antibacterianas.	Agitador magnético, beakers, pastillas de agitación.
--	-----	--	--	--

Instrumentos y técnicas de recolección

En el siguiente apartado, se describe los instrumentos, métodos y técnicas por utilizar en el desarrollo del proyecto de investigación. Estas se desarrollaron en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, en el Laboratorio microbiológico Microlabs y Centro de Investigación en Productos Naturales CIPRONA de la Universidad de Costa Rica.

Proceso de recolección de la muestra de zacate limón

El material vegetal utilizado fue obtenido de la finca propiedad del señor Kenneth Oviedo Sánchez, ubicado en Jabillos, Turrialba, Cartago durante el mes de Setiembre 2017. La muestra consistió en material fresco, verde el cual se le separo hojas secas y raíces previas a su utilización en el laboratorio. El material se mantuvo en almacenamiento envuelto en papel toalla y en bolsas plásticas en refrigeración con temperatura entre 8-10°C.

Materiales y equipo para la obtención del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (zacate limón) por arrastre con vapor y Dean-Stark:

Balanza analítica capacidad 210 gramos, balanza granataria capacidad 3000 gramos

Balón fondo redondo 1000mL

Balón tres bocas con capacidad de 250mL

Columna relleno para termómetro

Termómetro vidrio de mercurio rango 20°C-200°C

Beaker 50mL, 100mL

Probeta 500mL

Condensador para destilación

Mangueras caucho para conexiones

Alargadera

Agitador-calentador magnético

Embudo separados 250mL

Soporte universal

Prensa universal

Pescador pastilla magnética

Pastilla magnética

Piseta

Tiras reactivas de pH

Agua purificada

Rotavapor

Bomba para generación de vacío

Papel filtro

Erlenmeyer de 125mL

Papel toalla

Papel aluminio

Etiquetas

Zacate limón: muestra de 300 gramos

Reactivos:

Sulfato de Sodio anhidro, Marca Labquimar

Solvente hexano, Marca Labquimar

Trampa o aparato Dean-Stark

Embudo separador de 250mL

Bomba de recirculación para agua-condensador.

Método de extracción aceite esencial *Cymbopogon citratus* (Zacate limón) por arrastre con vapor

1. Se pesó 100 gramos de material fresco preseleccionado en balanza granataria en balón de 200ml de tres bocas, limpio y seco. Se anotó el peso obtenido.
2. Se adicionó 150mL de agua purificada.
3. Se instaló el aparato para destilación por arrastre con vapor.

4. Se colocó 500mL de agua purificada en el balón de una boca de 1000mL fondo redondo; se encendió el calentador-agitador magnético manteniendo agitación y calentamiento constante para generar vapor de agua.
5. Se encendió el calentador-agitador que está sobre la muestra orgánica y se mantuvo a una temperatura poco inferior al punto de ebullición. No se permitió que se excediera respecto del balón donde se genera vapor.
6. El tiempo de destilación lo dio la cantidad de producto condensado, según capacidad del Erlenmeyer colector, aproximadamente fue entre 3-4 horas.
7. Los extractos acuosos del aceite se taparon, se rotularon y se protegió de la luz, posteriormente, se almacenó en el enfriador a una temperatura entre 5-10°C.

Figura 10. Método de extracción del aceite esencial de *C. citratus* por arrastre con vapor.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Método de extracción aceite esencial *Cymbopogon citratus* (Zacate limón) mediante aparato Dean-stark

1. Se pesó 100 gramos de material fresco preseleccionado en balanza granataria en balón de 200ml de una boca, limpio y seco. Se anotó el peso obtenido. Se adicionó 150mL de agua purificada.
2. Se instaló el aparato Dean-stark en un extremo del conector de tres bocas, en el centro se le colocó tapón de hule y el restante se conectó al embudo separador con 200mL de agua purificada el cual que sirve para mantener nivel de agua en la mezcla cuando empieza a generar vapor de agua.
3. Se encendió el calentador-agitador que esté sobre la mezcla agua-zacate limón y se mantuvo a una temperatura con incrementos paulatinos hasta llegar a ebullición.
4. El tiempo de destilación lo dio la cantidad de producto condensado que se colecta en el Dean-stark. El proceso de extracción tarda entre 2-3 horas. Los extractos acuosos del aceite se taparon, rotularon y protegieron de la luz y se almacenaron en el enfriador a una temperatura entre 5-10°C.

Figura 11. Equipo Dean-Stark empleado para la extracción de aceite esencial de *C. citratus*.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Proceso de purificación del esencial de *Cymbopogon citratus* (zacate limón)

1. Se colocó el destilado o extracto que es una mezcla agua-aceite esencial en un embudo separador.
2. Se realizó extracciones con 20 ml de solvente hexano.
3. Aparte se acopló un embudo de espiga, filtro y aro de metal. Se colocaron 10 gramos de Sulfato de Sodio anhidro en el filtro de papel.
4. Se separó la fase orgánica de la acuosa y se vertió poco a poco sobre el embudo de espiga larga de manera que se filtró toda la fase orgánica. Se recolectó la fase orgánica en un erlenmeyer de 200mL.
5. Durante la extracción no se separó bien las fases, se agregó punta de espátula de NaCl en la fase acuosa, luego se agitó levemente, esto ayuda a separar bien las fases. La fase con el aceite esencial se mantuvo en la parte superior.
6. Se realizó el proceso de extracción cuatro veces más, de forma que se recolectó unos 100mL de la mezcla Hexano-aceite esencial.
7. Durante todo el proceso es importante proteger de la luz, para ello se colocó papel aluminio alrededor del erlenmeyer.
8. Los extractos en hexano colectados se colocaron en el rotavapor a una temperatura de baño de 45°C y a velocidad de giro de 100rpm.
9. En caso que no funcione adecuadamente el rotavapor, se emplea evaporación mediante trampa de vacío hecho con el chorro de agua del laboratorio. Para ello se colocó el erlenmeyer con la fase orgánica (hexano) un tapón de hule que posee un orificio de salida unido a conector-manguera a la trampa de vacío disponible en el grifo de agua potable del Laboratorio. Mientras se generó vacío, se colocó en baño maría de agua a 45°C, se abrió llave de agua y evaporó hasta sequedad todo el solvente.

10. Posteriormente, por diferencia de peso, se registró el peso del Erlenmeyer vacío, limpio y seco y Erlenmeyer con al aceite esencial. La diferencia de peso corresponde a la masa de aceite esencial obtenido.

Figura 12. Proceso de purificación del aceite esencial *C. citratus*.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Identificación de los componentes del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Para este apartado, se realizaron tres procesos:

1. Identificación de grupos funcionales por espectroscopia infrarroja
2. Identificación por cromatografía de gases acoplado a detector de masas (CG-MS)

3. Identificación de grupos funcionales de los principales componentes descritos en la literatura.

Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Para la realización de dicho análisis, se empleó el equipo disponible en el Laboratorio Químico de la Universidad Internacional de las Américas. Espectrómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo: Cary 630 FTIR.

A continuación, se detalla el procedimiento aplicado durante el uso del equipo.

1. Se encendió el equipo, se dejó calentar la lámpara, se activó el software de uso mediante manejo desde la PC.
2. Se limpió el portamuestras aplicando acetona pura desde una pisseta y se empleó papel higiénico suave, no papel toalla porque raya el lente.
3. Desde el software, se activó la opción de correr u “blanco” para ello se presionó la opción “Blank”. Inmediatamente el software indicó que se debe agregar la sustancia en estudio.
4. Se aplicó sobre el lente unos 50µL del aceite esencial (una gota). Se aseguró que la gota cubriera todo el lente y no hubiese presencia de burbujas o sedimentos o alguna partícula.
5. Se realizó el escaneo y se obtuvo el respectivo espectro para la muestra de aceite esencial.
6. Se identificó los principales grupos funcionales basados en lo reportado en la literatura.
7. Se comparó con los espectros teóricos reportados en la base de datos: Spectral database for Organic compounds o SDBS por sus siglas en inglés. Esto para la comparación con el espectro del α,β -citral principal componente.

Figura 13 Espectrofotómetro Infrarrojo IR usado para la identificación de grupos funcionales de compuestos orgánicos en el aceite esencial de *C. citratus*.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Análisis cualitativo por cromatografía de gases acoplado a un detector e masas (CG/MS) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Para la realización de dicho análisis, se contrató los servicios que brinda el Centro de Investigación en Productos Naturales CIPRONA de la Universidad de Costa Rica. Se les remitió una muestra de aceite esencial purificado aproximadamente unos 200 μ L contenidos en un vial color ámbar para proteger de la luz, debidamente sellado y tapado para evitar pérdidas.

El análisis es para determinar: áreas relativas de los distintos componentes presentes en el aceite esencial de zacate limón (m/z) y el correspondiente análisis de barrido de los compuestos orgánicos. Este servicio se contrató durante el mes de Octubre 2017, se remitió una muestra de aceite esencial purificado.

Figura 14. Muestra de aceite esencial de *C. citratus* para análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS).



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Análisis cualitativo aplicando pruebas de laboratorio o tamizaje fitoquímico en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Como complemento en el proceso de identificación, se procedió a realizar pruebas de laboratorio para identificación cualitativa de grupos funcionales de compuestos orgánicos presentes en el aceite esencial obtenido. Para su realización, se basó en los principales grupos funcionales presentes y reportados en la literatura: terpenos-terpenoides, alcaloides, flavonoides.

Durante su realización se usaron reactivos químicos, solventes y preparados en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.

La figura 15 muestra distintos reactivos que se usaron para la identificación de grupos funcionales encontrados en el aceite de *C. citratus*.

Figura 15 Reactivos utilizados durante la caracterización fitoquímica del aceite esencial de *C.citratus* suministrados por el Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas (UIA).



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Identificación de alcaloides mediante el ensayo con reactivo Dragendorff

1. Se trabajó en una cámara extractora de gases.
2. En un tubo de ensayo limpio y seco se colocó dos gotas de aceite esencial con gotero y se agregó 2mL de alcohol etílico.
3. Se adicionó 1mL de HCl al 1%.
4. Se agregó dos gotas del reactivo de Dragendorff.
5. Se realizó la prueba con un blanco en el cual no se le agregó el aceite esencial en estudio.
6. Se observó si hay presencia de algún cambio en la muestra: cambio coloración, formación de precipitado, turbidez. Compare con el blanco.

Identificación de terpenos-terpenoides: ensayo o prueba de Libermann-Burchard

1. Se trabajó en una cámara extractora de gases.
2. En un tubo de ensayo limpio y seco se colocó dos gotas del aceite esencial.
3. Se agregó 1 mL de Cloroformo, se agitó suavemente.
4. Se adicionó 1mL de Anhídrido Acético, se mezcló bien.
5. Con cuidado agregue gota a gota Ácido Sulfúrico concentrado, no más de tres gotas, evitar agitar la muestra.
6. Se realizó la prueba con un blanco en el cual no se le agrega el aceite esencial en estudio.
7. Se observó si hubo un cambio, comparar con el blanco y se anotó lo observado.

Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda

1. El ensayo se realizó en una cámara extractora de gases.
2. Se colocó de dos a tres gotas del aceite esencial en estudio en un tubo de ensayo limpio y seco. Se agregó 1mL de Alcohol etílico y se agitó.
3. Se adicionó virutas de magnesio metálico.
4. Se agregó 0,5mL de HCl concentrado. Se agitó vigorosamente.
5. Se repitió la prueba con un blanco en el cual no se le agrega el aceite esencial en estudio.
6. Se observó si hubo un cambio y se comparó con el blanco.

Pruebas microbiológicas para evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (zacate limón)

Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial en *Staphylococcus aureus*

En esta fase se evaluó la posible actividad antibacteriana a distintas diluciones del aceite esencial de zacate limón usando como solvente hexano sobre rayado en medio de cultivo Mueller-Hinton de una cepa de *S.aureus*. Para ello, se contrata los servicios que brinda el Laboratorio Análisis Microbiológico Microlabs, previa coordinación con el Dr. Roldan Ajun Chaverri quien estuvo presente durante cada una de las etapas de los ensayos realizados, dicho laboratorio brindó los materiales, insumos y equipo requeridos para su elaboración.

En el Tabla 5, se detalla las diluciones aplicadas durante el ensayo, para ellos el volumen de solvente se midió por peso con la densidad del solvente usado (densidad hexano: 0,6548 g/cm³). Se aplicó un control positivo de un producto que describe actividad antibacteriana: Neotrol NF ® solución oftálmica, el cual es un antibiótico de amplio espectro y un control del solvente puro para evaluar si denota alguna actividad antibacteriana y que pudiera interferir en el ensayo. Para la identificación cualitativa del *S. aureus* se empleó Agua Oxigenada al 3% solución disponible comercialmente. La aplicación de cada muestra fue de 10µL, sobre placas petri recién hechas con medio de cultivo fresco. Tanto reactivos, insumos y equipo fue suministrado por el Laboratorio contratado Microlabs ubicado en Guadalupe, San José.

Tabla 5. Diluciones de aceite esencial de *C. citratus* que se emplearon para evaluar la actividad antibacteriana sobre una cepa de *S.aureus* empleando como solvente hexano.

Muestra	Concentración %v/v Aceite esencial	Volumen solvente usado para diluir (μ L)	Volumen de Aceite esencial <i>C.citratus</i> (μ L)
1	1%	4950	50
2	2%	4900	100
3	3%	4850	150
4	4%	4800	200

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia.

Materiales y equipos para el desarrollo del ensayo microbiológico

Goteros

Asa para inoculación

Lámpara de alcohol para esterilización

Medios de cultivo Mueller-Hinton

Portaobjetos

Regla con escala métrica

Cámara de flujo laminar

Incubadora

Reactivos y otros.

Hexano, calidad reactivo.

Peróxido de hidrógeno al 3%, Laboratorios Mallick.

Caldo fresco cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Antibiótico suspensión oftálmica: Neotrol® NF, Fabricante Lansier.

Aceite esencial de *C.citratus* (zacate limón).

Figura 16. Materiales, reactivos empleados para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C.citratus* en *S.aureus* realizado en las Instalaciones de Microlabs, Guadalupe, San José.



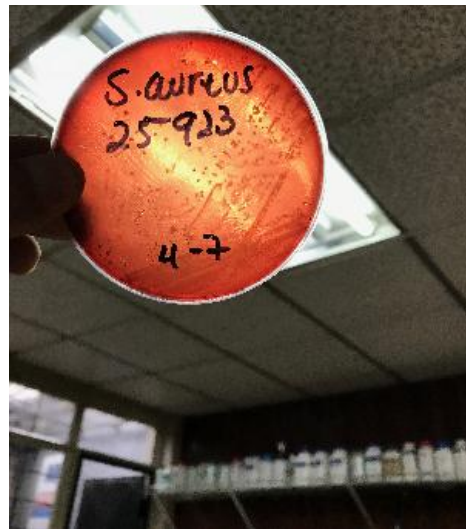
Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Figura 17. Equipo de laboratorio empleado en el desarrollo de los ensayos microbiológicos realizados en las instalaciones de Microlabs, Guadalupe San José.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Figura 18. Cepa de *S.aureus*, ATCC 25923 cultivada en agar sangre empleado en el estudio para evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C.citratus* realizado en las Instalaciones de Microlabs.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Método para evaluación de la actividad antibacteriana del *S.aureus*

1. En una cámara de flujo laminar encendida con al menos 10 minutos de anticipación y con la ventana baja, se procedió a elaborar medio de cultivo Mueller-Hinton sobre placas Petri de 90mm diámetro.
2. Se dejó solidificar, luego se le colocó la tapa a la placa petri. Se dejó en reposo unos 15 minutos.
3. Con el uso de puntas estériles de micropipeta se procedió a realizar hoyos uniformes a la misma profundidad en el agar de la placa de forma equidistantes. No se realizó más de tres hoyos para garantizar que en caso de formarse halos de inhibición no se crucen entre sí. Se garantizó que la profundidad de los hoyos eran similares.
4. Mediante técnica de hisopado se aplicó o se ralló caldo de la cepa de *S.aureus* en toda la superficie del medio de cultivo con los hoyos realizados.
5. En cada uno de los hoyos se aplicó 10µL de cada una de las muestras respectivas.
6. Se rotuló cada aplicación hecha, de forma que no se confundieran, para ello marcar con marcador permanente en la parte posterior de la placa.
7. Se tapó y colocó en la incubadora por 24 horas a una temperatura de 35°C.
8. Una vez transcurrido las 24 horas se sacaron las placas y se colocaron en la cámara de flujo laminar.
9. Se evaluó si se dio la formación de halos de inhibición que demuestren la actividad antimicrobiana desde el aceite esencial de *C.citratatus* para cada una de las aplicaciones realizadas por placa.
10. Se observó, comparó y midió los halos de inhibición en los casos que se formaron.
11. Se aplicó un control positivo del antibiótico, solvente, diluciones del aceite esencial.
12. Posteriormente se realizó el ensayo con la forma farmacéutica propuesta en el estudio (Gel) en caso que se denote actividad antibacteriana.

Método para el desarrollo de la prueba de la catalasa en la identificación del *S.aureus*

1. Se esterilizó el asa que se empleó para la inoculación y el portaobjetos.
2. Se tomó una muestra del caldo o cepa de cultivo de *S.aureus* y se colocó en el portaobjetos.
3. Se agregó una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3%.
4. Se observó y anotó los cambios que se dieron.

Figura 19. Insumos y materiales de laboratorio empleados en la identificación de la bacteria en estudio *S.aureus* realizado en las instalaciones de Microlabs, Guadalupe, San José.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Elaboración de la forma farmacéutica uso tópico Gel

Para esta parte se procedió a realizar la preparación de un formulado usando excipientes, cristalería suministrado por el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

Materiales y equipo utilizados en la elaboración del Gel

Beakers de vidrio con capacidad de 250mL

Gotero

Probeta 25mL, 50mL

Espátula

Agitador de vidrio

Pastilla magnética

Calentador-agitador magnético

Balanza granataria

Tubo colapsible de aluminio con capacidad de 25 y 50 gramos cada uno

Reactivos

Aceite esencial *Cymbopogon citratus*.

Carbopol

Trietanolamina (TEA)

Propilenglicol

Glicerina

Agua Purificada

Metilparabeno, Propilparabeno

Proceso de manufactura empleado para la elaboración del gel uso tópico

1. En un beaker #1 debidamente rotulado, se agregó la cantidad de agua purificada para elaborar 100 gramos del formulado, se adicionó lentamente el carbopol. Se mantuvo la agitación en forma vigorosa hasta disolverse por completo el sólido.
2. En un beaker #2 debidamente rotulado, se agregó el metilparabeno y propilparabeno y agregó propilenglicol, se mantuvo agitación constante hasta disolverse por completo los sólidos.
3. En un beaker #3 debidamente rotulado, se agregó la cantidad requerida de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y la glicerina, y se mantuvo la agitación constante.
4. Se agregó poco a poco el contenido del beaker #2 en el beaker #1. Se mantuvo la agitación constante.
5. Una vez teniendo una sola fase, se agregó el contenido del beaker #3 manteniendo agitación constante y vigorosa hasta lograr solo una fase.
6. Se agregó gota a gota trietanolamina (TEA) hasta formar un gel viscoso. Se evaluó que el pH del preparado mantenga un valor cercano a 6. Se siguió mezclando hasta que la mezcla fuera homogénea.
7. Posteriormente se trasvasó en un tubo colapsible o empaque primario adecuado.
8. Se tapó o selló el tubo colapsible.
9. Se colocó etiqueta autoadhesiva con la información requerida.

Figura 20. Materias primas e insumos usados para elaboración de la forma farmacéutica de uso tópico Gel con aceite esencial de *C. citratus*.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados e información que se proporcionan en este capítulo son los obtenidos en el desarrollo investigativo de cada variable planteada basado en los objetivos específicos establecidos.

Variable 1: Proceso de extracción y purificación del aceite esencial a partir del zacate limón (*Cymbopogon citratus*) empleando el método de arrastre con vapor-Aparato Dean-Stark

El material vegetal previo a hacer usado, se sometió a una selección de las partes de interés eliminando hojas secas, raíces y material orgánico extraño presente, dado que el material proviene directamente de la zona de cultivo. Se constató que fuese material verde de recién corta para evitar variaciones, durante su almacenamiento y manipulación se usó papel toalla y se mantuvo en bolsa plástica para su protección bajo refrigeración. Cabe mencionar que se empleó hojas del zacate limón dado que estudios que se reportan se trabajó con hojas, tal es el caso de los estudios hechos por Bassole, H et al, 2011 y de Naik, et al (2010).

En la figura 21, se observa este paso de selección del material de interés usado para cada proceso extractivo, tanto por el método de arrastre con vapor, así como del aparato Dean-Stark.

Figura 21. Separación del material que fue sometido al proceso de extracción por el método de arrastre con vapor y aparato Dean-Stark.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Para cada uno de los métodos usados se empleó 100 gramos de material dado que los equipos disponibles en el laboratorio no poseen mayor capacidad y la cantidad de ciertos equipos es limitada como es el caso del aparato Dean-Stark del cual solo se dispone de uno. En total, se realizaron tres extracciones por el método de arrastre con vapor y dos con el aparato Dean-Stark.

Es importante mencionar que para efectos de comparar métodos de extracción no se escogió la extracción continua con aparato Soxhlet debido a que como es un proceso que permite un contacto directo muestra-solvente orgánico volátil, conlleva a que se extrae, además de los posibles aceites esenciales otros compuestos orgánicos, tales como grasas, ceras e inclusive clorofila, obteniéndose al final una oleorresina o un aceite esencial contaminado con otras sustancias (Penredo, Palou- García y López, 2009).

Una vez acoplados los equipos para la extracción, se obtuvieron extractos acuosos del aceite esencial de *C.citratu*s, el cual en general es de aspecto incoloro, opaco con fuerte aroma cítrico característico, similar a lo descrito por Asaolu, M.; Oyeyemi, O.; Olanlokun, J. (2009). Es importante mencionar que los extractos acuosos se mantuvieron en baño de hielo para evitar la evaporación y pérdida de componentes volátiles, así mismo, protegidos de la luz para evitar la oxidación de algunos de sus componentes dado que luz UV puede promover reacciones de dimerización o polimerización de dobles enlaces Carbono-carbono que están presentes en aceites esenciales aspecto (Asaolu, M.; Oyeyemi, O.; Olanlokun, J. 2009).

Figura 22. Muestra de los extractos acuosos obtenidos luego de realizar la extracción del *C. citratus* mediante el métodos de arrastre con vapor y el aparato Dean-Stark, realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Se puede decir que durante el proceso de extracción se logró encontrar que:

1. La cantidad de mililitros de extracto acuoso obtenido es mayor con el aparato Dean-Stark: dado que al solo requerir de una fuente de calor permanente y directa se facilita la generación de vapor y, por ende, se recoleta más rápidamente extracto acuoso, esto en comparación con el método de arrastre con vapor en el cual se debe primero generar vapor en un primer compartimento y luego trasladar ese vapor a otro compartimento por tuberías-mangueras donde se tiene el macerado al cual se le extraerá los aceites; esto conlleva más disponibilidad de tiempo para llegar al equilibrio vapor-líquido de la mezcla.
2. El tiempo requerido para la obtención del extracto acuoso fue menor con el aparato Dean-Stark, esto derivado de lo expuesto anteriormente dado que alcanzar el equilibrio vapor-líquido se logra más rápido por estar contacto directo con la fuente de calor de la mezcla del macerado.

En el Tabla 6, se detalla o resume estos datos observados durante este proceso.

Tabla 6. Resultados obtenidos durante el proceso de extracción de aceite esencial de *C. citratus* mediante el método de arrastre con vapor y Dean-Stark, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Método	Total de procesos de extracción	Cantidad de extracto acuoso obtenido (mL)	Tiempo de extracción
Arrastre con vapor	03	Entre 80-100 cada extracción	3-4 horas
Aparato Dean-Stark	02	Entre 150-200 cada extracción	2-3 horas

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Para el proceso de purificación del extracto acuoso de *C. citratus*, se procedió a colocar el volumen del destilado obtenido en un embudo separador de 250mL, con una probeta de 25 mL se procede a agregar volúmenes de 20mL exactos de solvente hexano el cual al ser menos denso que el destilado permanece en la parte superior como se puede observar en la figura 23, la densidad para n-hexano es de: 0,6548 g/cm³, la densidad de fase acuosa: 1,0053 g/cm³(datos tomados del Index Merck 1968).

Figura 23 Proceso de purificación de los extractos acuosos obtenidos del *C. citratus* mediante extracción líquido-líquido empleando hexano como solvente orgánico, realizado en las instalaciones Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas.



[Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Cabe mencionar que durante el proceso de extracción se debió agregar punta de espátula de NaCl para separar bien las fases debido a que se observó muy turbia y poca separación de las fases orgánica-acuosa, el NaCl se disuelve en la fase acuosa y eso polariza más la fase acuosa y la hace más densa que la fase orgánica. Una vez realizados esto se observó que estaba bien definida la separación de fases y se procedió a verter en un beaker la fase acuosa abriendo la llave. La fase orgánica se sacó por la parte superior del embudo e inmediatamente se pasa por un filtro de papel que contenía sal de sulfato de sodio anhidro para eliminarle trazas o cantidades de agua presente, esto por cuanto la sal anhidra absorbe las moléculas de agua dado que el agua interviene en las etapas posteriores de identificación planteadas en esta investigación por espectroscopía infrarroja, así como cromatografía de gases.

Es importante mencionar que las extracciones se usaron volúmenes pequeños de 20mL y no mayores con el hexano debido a que por el principio de partición se facilita que se tenga mayor capacidad extractiva de los aceites, de ahí que no se emplearan volúmenes de más de 20mL. Así mismo, al realizarse cinco extracciones consecutivas con 20mL se garantiza obtener la mayor cantidad de aceite esencial.

Una vez teniendo la fase orgánica separada y eliminado el agua, se procedió a separar el solvente de hexano mediante la evaporación de éste, para ello se aplicó vacío en el erlenmeyer con ayuda de una trampa de vacío conectado al chorro de agua, dado que el rotavapor que se disponía no funcionaba adecuadamente. La evaporación se facilita con ayuda de un baño maría con agua a temperatura de 50-55°C dado que el hexano posee un punto de ebullición de 68°C (Index Merck, 1968), con ello, se permitió una separación adecuada y se evitó exponer a altas temperaturas el aceite esencial evitándose posibles pérdidas.

Una vez obtenido solo el aceite esencial, se procedió a pesar por diferencia (peso de erlenmeyer vacío y erlenmeyer+aceite) el aceite *de C. citratus* para cada una de los procesos de extracción. En el Tabla 7, se resume los valores obtenidos de estos rendimientos donde se puede observar que usando el equipo Dean-Stark los rendimientos son superiores comparados con el método arrastre con vapor.

Tabla 7. Rendimientos obtenidos durante el proceso de extracción de aceite esencial de *C. citratus* mediante el método de arrastre con vapor y Dean-Stark, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Método	Total de procesos de extracción	%Aceite esencial
Arrastre con vapor	03	Promedio:1.5%
Aparato Dean-Stark	02	Promedio: 2.6%

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Los aceites obtenidos por el método de arrastre con vapor se unieron y se almacenaron en un frasco de vidrio con tapa de rosca, se protegieron de la luz y se almacenaron en el enfriador con una temperatura entre 8-10 °C esto para preservar el aceite esencial y no tener pérdidas por volatilidad la temperatura de almacenamiento es reportada por Leyra, J (2011). La Tabla 8 resume las características organolépticas del aceite esencial y la figura 24 una muestra del aceite esencial obtenido.

Tabla 8. Características organolépticas del aceite esencial *C.citratius* obtenido por el método arrastre con vapor, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Propiedad física	Aceite esencial <i>C.citratius</i>
Color	Ámbar
Aspecto	Homogéneo
Textura	Oleosa, untuosa poco viscosa
Olor	Cítrico agradable
Otros	Libre de partículas extrañas

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Figura 24. Aceite esencial de *C. citratius*, realizado en las instalaciones de laboratorio de química Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Variable 2: Identificación de los metabolitos activos presentes en el aceite esencial de zacate limón (*Cymbopogon citratus*)

Identificación o tamizaje fitoquímico

En una primera etapa mediante pruebas o ensayos de caracterización de grupos funcionales, se procedió al tamizaje fitoquímico del aceite esencial de *C.citratus* obtenido por medio del método arrastre con vapor. En el Tabla 9, se resume los resultados obtenidos durante la realización de los ensayos establecidos.

Tabla 9. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del aceite esencial *C.citratus*, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Tipo de reacción	Componente	Observación	Resultado
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	Precipitado color anaranjado oscuro	Positivo
Prueba de Libermann-Buchard	Terpenos	Coloración ámbar	Positivo
Prueba Shinoda	Flavonoides	Coloración amarillo oscuro	Positivo

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Para determinar la presencia de alcaloides, se aplicó el reactivo Dragendorff el cual está compuesto por tetrayoduro bismuto de potasio (KBiI_4), éste puede indicar la presencia de alcaloides por la formación de un precipitado color naranja rojizo cuando se le adiciona a una muestra de aceite esencial (Domínguez, 1985). Éste ensayo dio positivo durante la identificación de metabolitos presentes en el aceite esencial. Cabe mencionar que durante la realización del ensayo se corrió paralelamente un blanco negativo de forma que se pudiese observar por diferencia la presencia del mismo. En la figura 25, se puede apreciar lo observado durante la realización de la prueba de laboratorio.

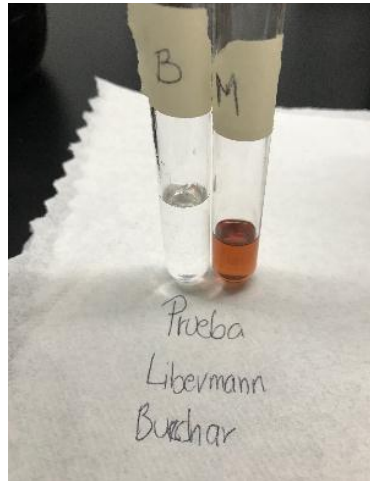
Figura 25. Ensayo de identificación alcaloides: reactivo Dragendorff con el aceite esencial de *C. citratus*, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

En la determinación e identificación de terpenos presentes en la muestra de aceite esencial de *C. citratus*, se aplicó el ensayo de Libermann-Buchard (Domínguez, 1985), el cual consistió en una reacción de la muestra (previamente agregado ácido acético anhidro) con H_2SO_4 concentrado agregado gota a gota dando cambio de coloración. Este ensayo con la muestra de aceite esencial dio positivo dado que mostró un cambio de coloración de incoloro a café oscuro en la muestra de prueba, la figura 26, se puede observar respecto al blanco negativo que se corrió para demostrar la reacción.

Figura 26. Ensayo de identificación terpenos: prueba Libermann-Buchard con el aceite esencial de *C. citratus*, realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química, Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Para la identificación de flavonoides en el aceite esencial de *C.citratus*, se aplicó el ensayo o reacción de Shinoda (Domínguez, 1985), en el cual se describe una coloración amarilla o anaranjada oscura para flavonoides al agregarse tiras de magnesio a la muestra previamente acidificada con HCl. Esta prueba aplicada a una muestra de aceite esencial de *C. citratus* dio positivo dado que se observó una coloración amarilla intensa oscura. En la figura 27, se puede apreciar el resultado obtenido de éste.

Figura 27. Ensayo de identificación para flavonoides, prueba de Shinoda en el aceite esencial de *C. citratus*, prueba realizada en las Instalaciones de Laboratorio de Química Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

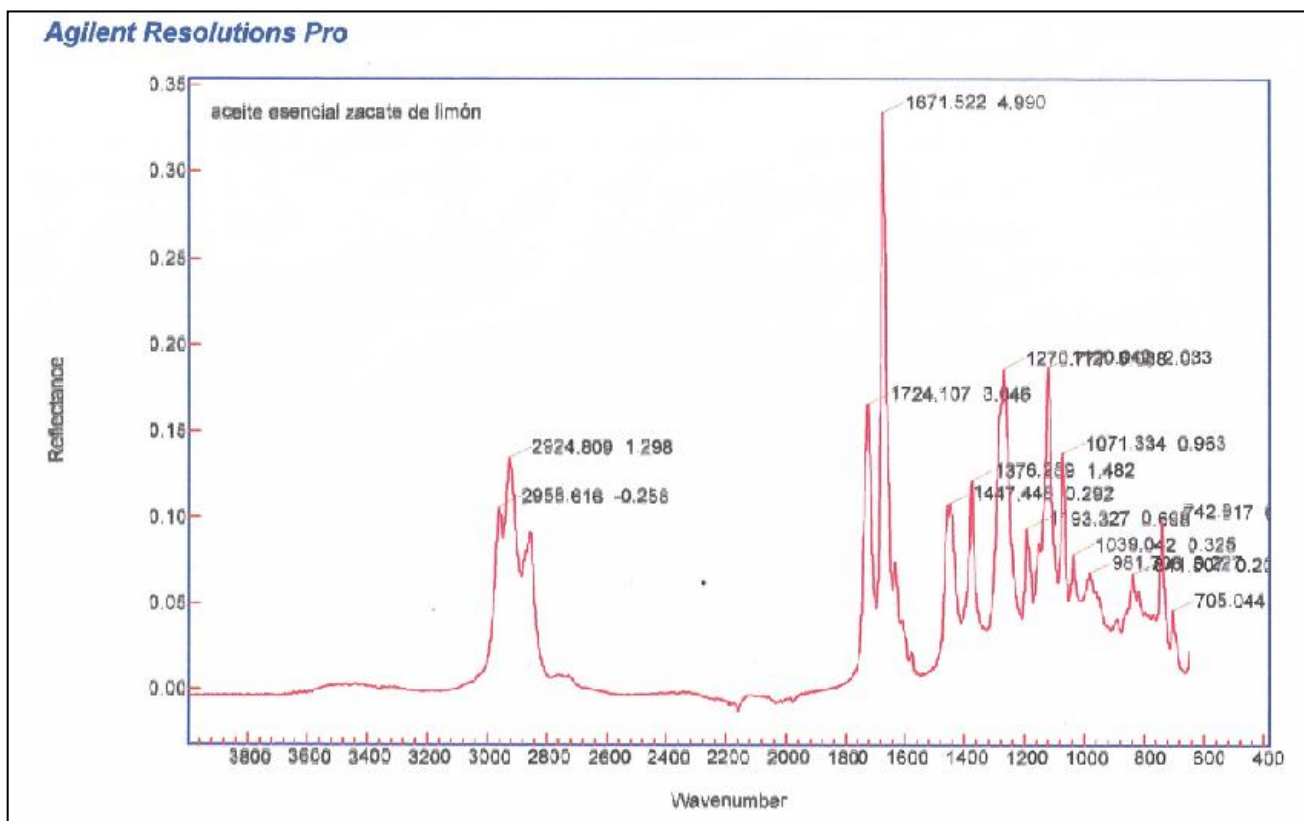
Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

En este apartado, se procedió a realizar un análisis del espectro infrarrojo usando un espectrómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo Cary 630 FTIR para la muestra de aceite esencial *C. citratus* obtenido por el método arrastre con vapor. Es importante mencionar que la prueba se realizó inmediatamente posterior a la purificación del aceite esencial, esto para garantizar que la muestra no presentara o absorba agua dado que éste interfiere en el espectro de absorción por la formación de una banda ancha que enmascara u oculta bandas de absorción de los componentes en el ámbito de 3000 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} (DQO, Universidad Buenos Aires, 2017).

En el uso del equipo, se observó que la operación para las mediciones fue sencilla lo que facilitó evitar mucha manipulación de la muestra, dado que no requirió preparación alguna como sucede con otros equipos de medición disponibles comercialmente. Para el análisis de las señales obtenidas en el espectro infrarrojo de la muestra, se procedió a realizar un listado de las principales bandas observadas y clasificándolas, según el grupo funcional y rango de absorción aproximado de la señal teórica descrita por Skoog, Holler, Nieman (2011) y Carey (1999); una vez realizada la identificación se procedió a comparar

el espectro de la muestra contra uno de referencia disponible en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en inglés) para el principal componente, esto por cuanto no se dispone de un estándar primario de referencia del aceite esencial de *C. citratus*. En la figura 28, se observa el espectro infrarrojo obtenido para la muestra de aceite esencial de *C. citratus*.

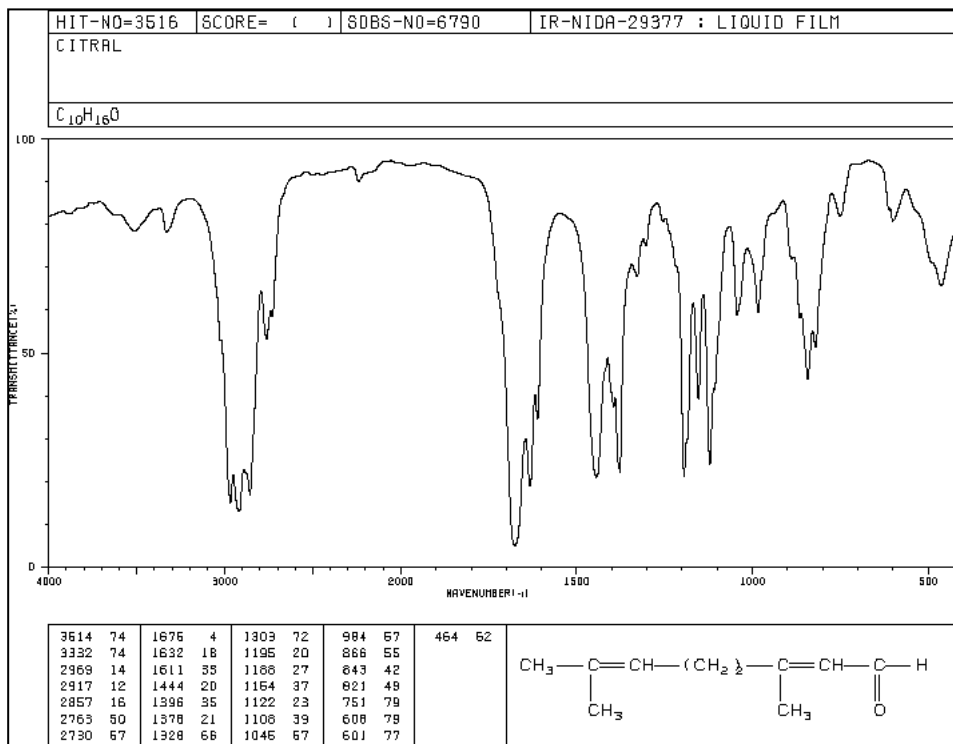
Figura 28. Espectro infrarrojo obtenido del aceite esencial *C. citratus* purificado usando un Espectrómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo: Cary 630 FTIR, realizado en las Instalaciones de Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

En la figura 29, se describe el espectro de absorción infrarrojo para el citral, dicho espectro fue obtenido de la base de datos Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en inglés) esto debido a que, al no disponer de un estándar primario del aceite esencial no fue posible su adecuada comparación, sin embargo, esta base de datos es muy usada dado que brinda espectros de sustancias puras y producto de una serie de repeticiones del ensayo, ofreciendo veracidad y confianza.

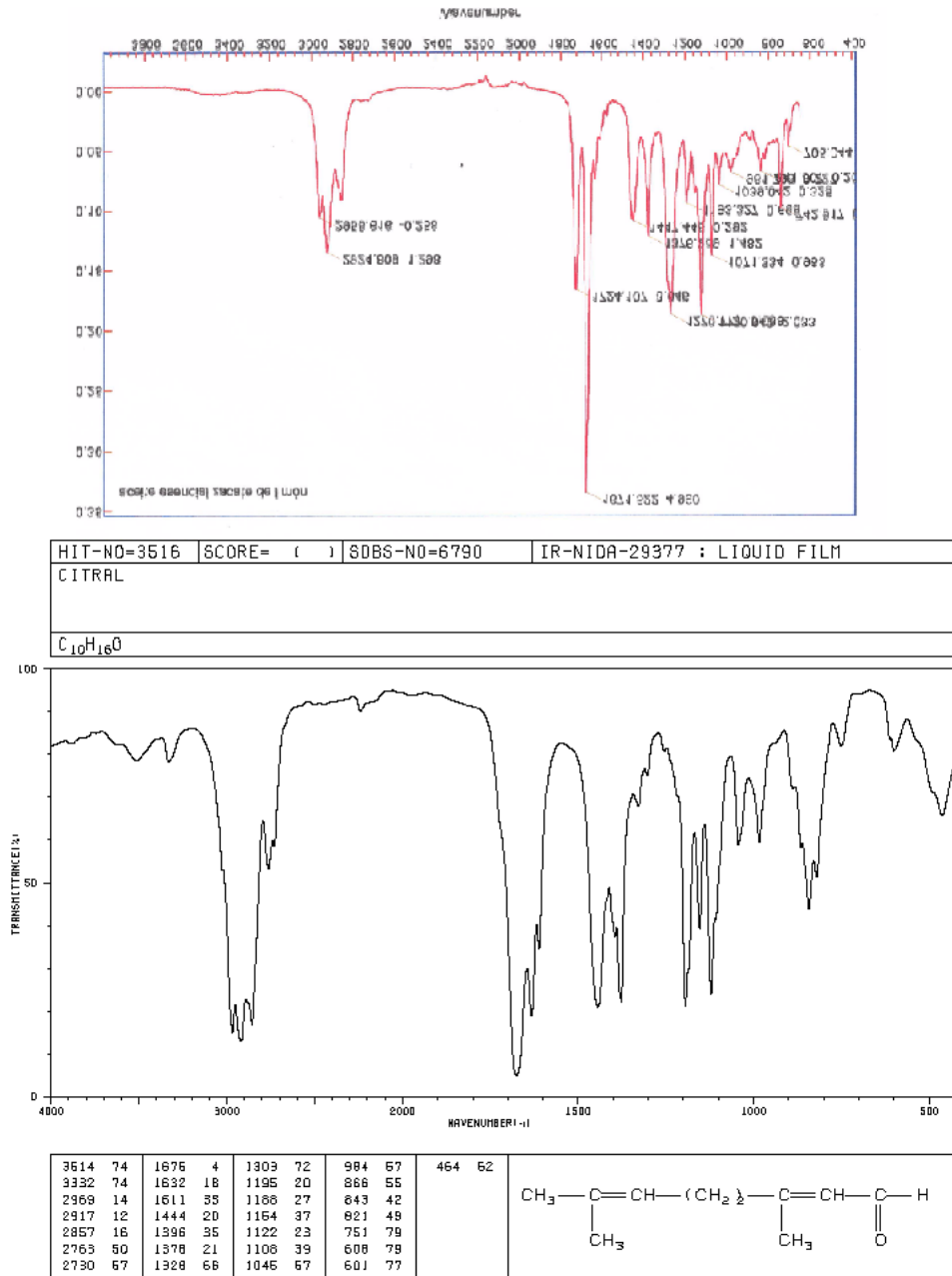
Figura 29. Espectro infrarrojo del α,β -citral, disponible en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en inglés).



Fuente: Tomado de http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi, Octubre 2017.

En la figura 30, se tiene ambos espectros, tanto de la muestra de aceite esencial extraído y purificado como el de referencia, de ambos se puede obtener que: describen la misma cantidad de bandas anchas de absorción una cercana a 3000cm^{-1} , 1700cm^{-1} , 1450cm^{-1} , 1100cm^{-1} , 1000cm^{-1} , 800cm^{-1} .

Figura 30 Comparación de espectro infrarrojo obtenido del aceite esencial de *C.citrus* versus espectro infrarrojo del SDBS para el compuesto citral.



Fuente: Rojas, R. (2017), y de http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi,
 Octubre 2017

Tabla 10. Descripción y asignación de las bandas de absorción obtenidas del aceite esencial de *C.citratu*s purificado.

Muestra	Señal detectada (cm⁻¹)	Grupo funcional perteneciente	Rango aproximado de la señal teórica (cm⁻¹) **	Intensidad de la señal **
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	2958	C-H estiramiento alcano	2850-2970	Fuerte
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	2924	C-H estiramiento	3010-3095	Media
	989	alqueno	675-995	Fuerte
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	1724	C=O aldehido	1690-1760	Fuerte
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	1376	-CH ₂ -CHO aldehído	1300-1400	Media
	1071		1000-1100	Media
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	1671	-CH=CH alqueno	1610-1680	Variable
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	1447	CH ₂ flexión sp ³	1450	Media
Aceite esencial <i>C. citratu</i> s	1270	-CH ₃ alcano	1250-1500	Media

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia y ** Skoog, Holler y Nieman (2011); Carey (1999).

Como se logra apreciar en la tabla anterior y analizando las figuras 29 y 30, se obtuvieron varias señales que coinciden entre sí la muestra versus la referencia, confirmando de esta forma la presencia de los principales componentes del aceite esencial de *C. citratus* como lo es α,β -citral.

Análisis del cromatograma y espectro de masas obtenido del aceite esencial de *C. citratus* mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas

Para comprobar la presencia de los componentes presentes en el aceite esencial de *C. citratus*, se realizó un análisis por Cromatografía de Gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), cabe mencionar que dicha técnica, además de ser confiable, es eficaz para identificar y determinar la proporción de componentes con alto grado de veracidad dado que además, de separar en forma individual permite mediante espectrometría de masas dilucidar los compuestos orgánicos por análisis de los fragmentos mayoritarios producto del proceso de la técnica.

Dicho ensayo fue contratado al Centro de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica (CIPRONA). En el cromatograma se logró establecer la presencia de 14 compuestos siendo cuatro los componentes mayoritarios (porcentajes mayores a 1%): los isómeros E-Citral o α -Citral con un 26,03% y Z-Citral o β -Citral con un 16,25%, β -Mirceno con un 2,37% y ftalato de n-Octilo con un 51,85% siendo este último un contaminante de la muestra que, según lo descrito por personal técnico del CIPRONA es común que aparezca este compuesto dado que se “arrastra” en la muestra por diversas fuentes de contaminación:

a-Una primera fuente es por la calidad del solvente usado en el proceso de purificación, en nuestro caso fue el n-hexano calidad reactivo, lo idóneo es emplear uno de calidad para aplicaciones cromatográficas, con lo cual es posible que estuviese el reactivo contaminado.

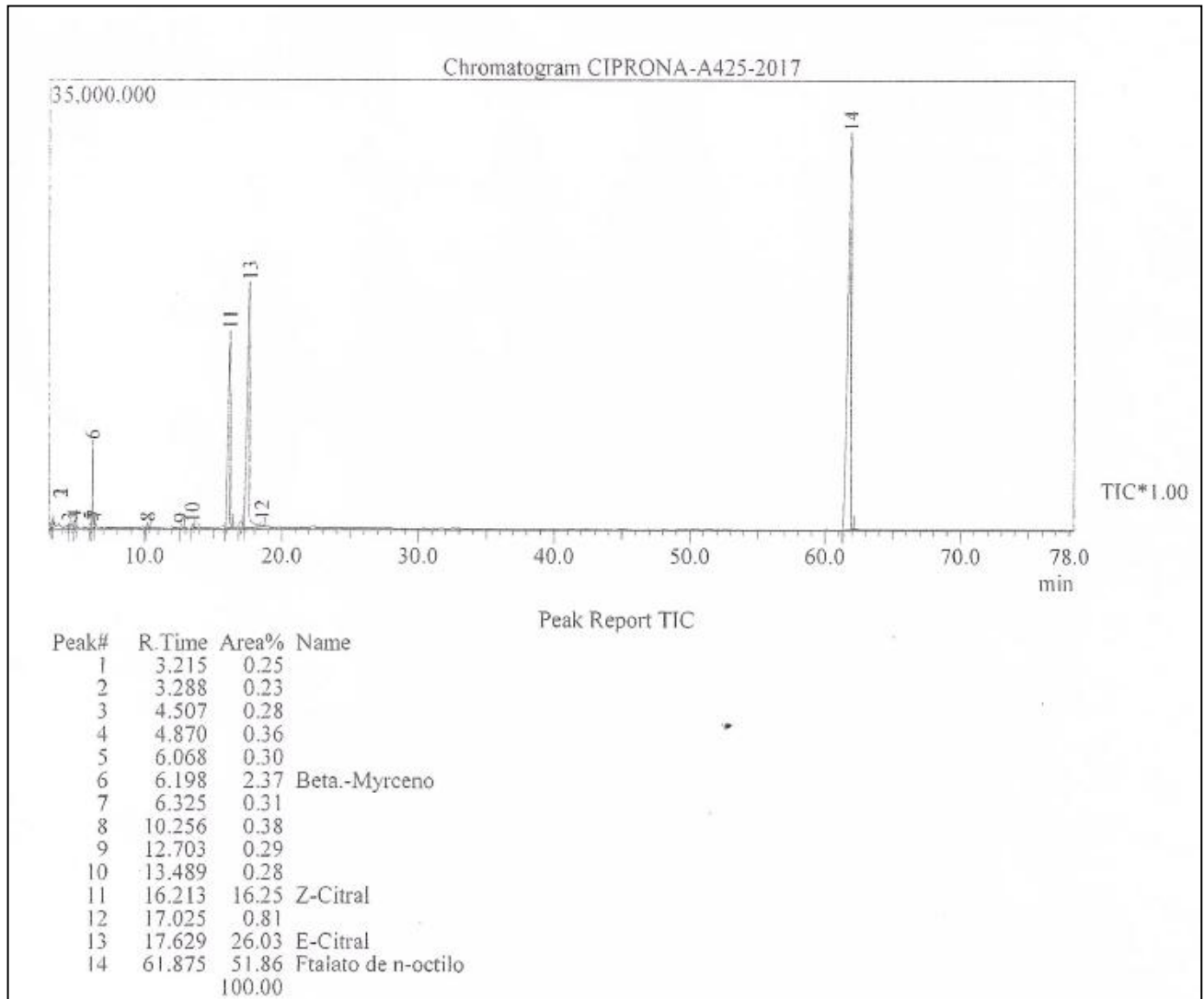
b- Otra posible fuente de contaminación es que encuentre presente en los bulbos de las pipetas pasteur usadas en la manipulación del aceite esencial dado que por contacto del bulbo con el aceite se disolviera algo del ftalato de n-Octilo en la muestra.

c-Disolución del ftalato de n-Octilo que está presente en los polímeros de los linner o sellos de tapas del vial que contenía la muestra o tapas del vial porta muestras que se empleó en la cromatografía.

Si se elimina el componente que aparece como contaminante: ftalato de n-Octilo, las proporciones de los tres componentes principales recalculados serán de: isómeros E-Citral o α -Citral con un 54,07% y Z-Citral o β -Citral con un 33,76%, β -Mirceno con un 4,92%. Como se ve, el principal componente es el α,β -Ccitral con un 87,83% siendo de esta forma consistente con algunos de los reportado por Avoseh, Oyedeji, Rungqu, Nkeh,-Chungag, B. y Oyedejo (2015) en la cual dentro de los principales componentes del aceite están los terpenoides volátiles: Geranial o (α,β)Citral ($C_{10}H_{16}O$), Neral ($C_{10}H_{16}O$), Myrceno ($C_{10}H_{16}$).

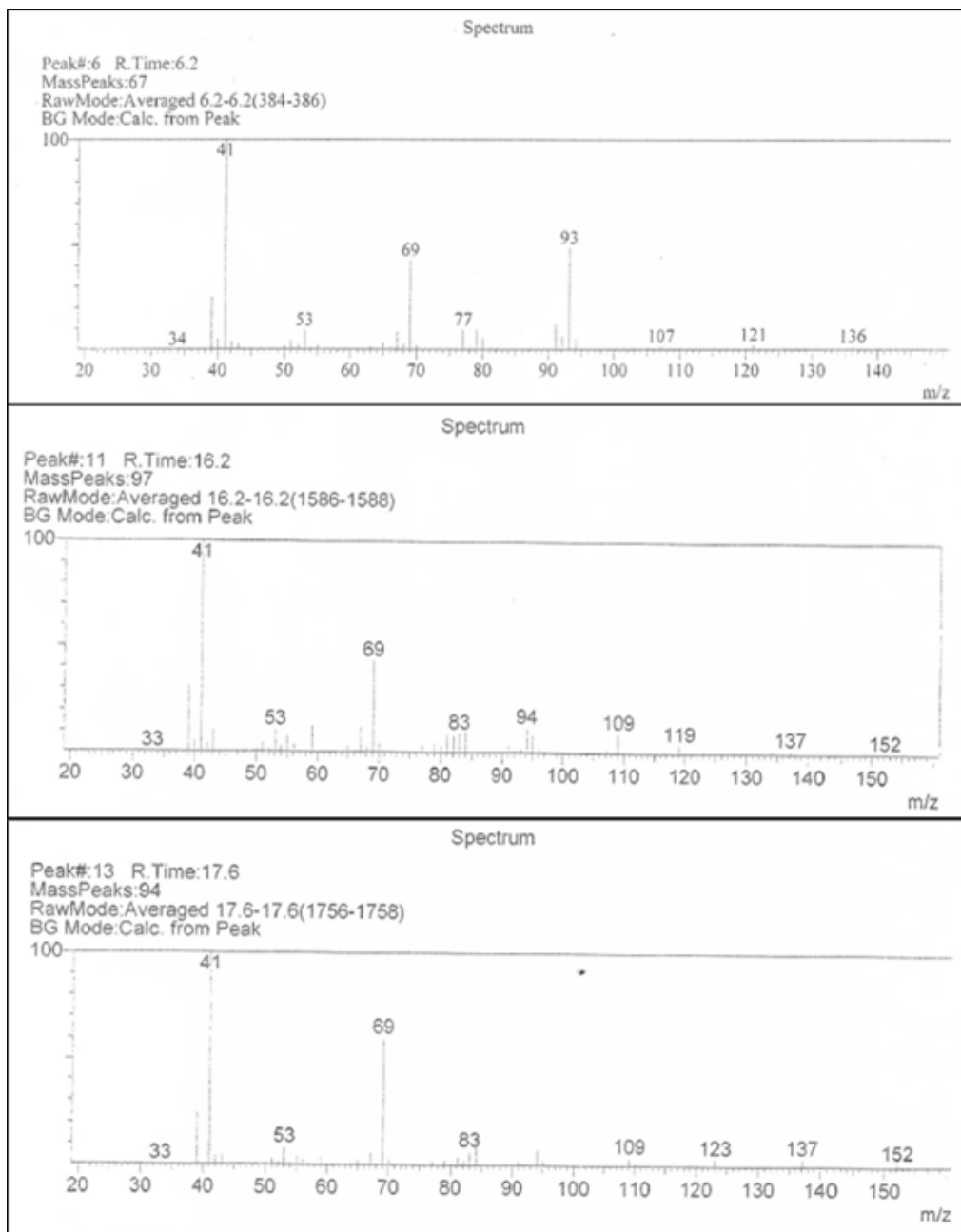
La figura 31, es la muestra del cromatograma obtenido para la muestra de aceite esencial, los tiempos de retención de los principales picos corresponden al β -Myrceno con un tr: 6.198 minutos, β -Citral con un tr: 16.213 minutos y α -Citral con un tr: 17.629 minutos. Se nota que el contaminante ftalato de n-Octilo describe un tr de 61,785 minutos con lo cual hizo que la corrida de muestra llevara mayor tiempo de elución.

Figura 31. Cromatograma obtenido mediante el análisis por Cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), realizado por el CIPRONA Universidad de Costa Rica.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Figura 32. Espectro de masas del β -Myrceno, β -Citral α -Citral y respectivamente obtenidos mediante el análisis por Cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), realizado por el CIPRONA Universidad de Costa Rica.



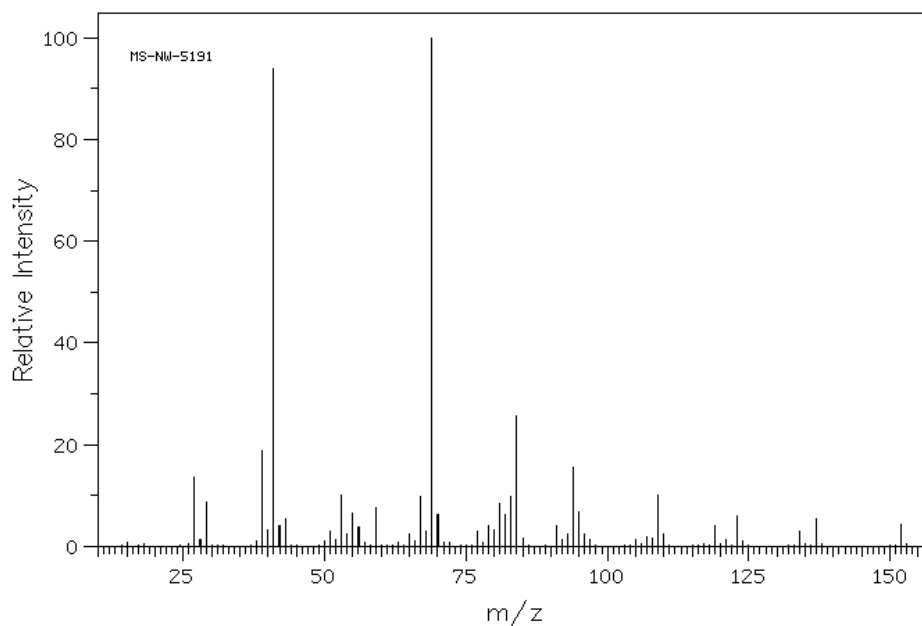
Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

En la figura 32, se resumen los tres espectros de masas para los tres principales componentes encontrados: β -Myrceno (pico#6), β -Citral (pico #11) y α -Citral (pico #13) respectivamente, según lo descrito por Restrepo, et al. (2009), se puede ver que los tres

espectros tienen en común señales de fragmentos con una relación m/z de 41 que corresponde al fragmento $[C_2OH]^+$ y otro con relación m/z de 69 que corresponde al fragmento $[C_4H_5O]^+$. En el caso β -Myrceno (pico #6) describe una señal con relación m/z de 136 que corresponde al peso molecular del compuesto orgánico; en el caso del espectro para β -Citral y α -Citral (pico #11 y #13) se observa una señal de relación m/z de 152 que corresponde al peso molecular del compuesto orgánico Citral.

En la figura 33, se describe el espectro masas del Citral disponible en la base de datos: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en inglés) debido a que no se dispone de un estándar primario del aceite esencial; se realiza una comparación del mismo con los obtenidos de la muestra de aceite esencial de *C. citratus* (figura 32); se puede establecer por observación y comparación que los principales picos de ambos espectros describen similitud en intensidad y los fragmentos con relación m/z de : 41, 53, 69, 83.

Figura 33. Espectro masas del citral, disponible en Spectral Database for Organic Compounds (SDBS, siglas en ingles).



Fuente: Tomado de http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi, Octubre 2017.

Variable 3: Evaluación de actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (zacate limón) en el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, mediante la medición de halos de inhibición

Para asegurarse que los ensayos se realizaran en forma adecuada y con las medidas de bioseguridad, se aplicaron técnicas asépticas y el uso de materiales e insumos estériles en todo momento, así mismo, usando cámara de flujo laminar en cada etapa de desarrollo de las pruebas. Durante el periodo de incubación se mantuvo variables como temperatura adecuada, según el procedimiento.

Se procedió a trabajar con una cepa de *Staphylococcus aureus* que estuviese “fresca”, es decir, que estuviese en fase de crecimiento; para ello en las instalaciones de Microlabs se suministró un caldo de esta bacteria preparado con 24 horas de anticipación. De forma tal que se eliminara este aspecto, datos suministrados por el laboratorio la cepa es trazable a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 reproducida por quinta vez a partir de su apertura.

Con las diluciones establecidas del aceite esencial en el solvente de hexano, se procedió a realizar la siembra de medio de cultivo Mueller-Hinton aplicando la técnica de hisopado de manera que no quedasen áreas o espacios de la placa de agar sin la presencia de la bacteria en estudio para ello, se realizaron trazados del hisopado en cuatro diferentes direcciones perpendiculares entre sí y cada aplicación impregnado de caldo fresco de la bacteria. Posterior a la aplicación de la cepa sobre el medio de cultivo agar en lugar de usar discos de celulosa impregnados de la dilución del aceite, por recomendación del Dr Ajun de Microlabs, se realizan “hoyos” con ayuda de una punta de micropipeta dado que brinda un mismo diámetro, cada hoyo se formó de manera tal que tuviesen la misma profundidad.

Luego de 24 horas de incubación a temperatura controlada de 35 °C, se observó la formación de halos de inhibición microbiana en el medio de cultivo a partir de la tercera dilución o al 3% v/v. En la figura 34 se puede apreciar lo observado así como los controles, tanto positivo como negativo llevados a cabo.

Figura 34. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria *S.aureus*, a diferentes diluciones del aceite esencial de *C. citratus* y su respectivo control positivo-negativo, ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Tabla 11. Resultados de la formación de los halos de inhibición formados con distintas muestras evaluadas.

Muestra	Descripción de la muestra	Medida halo inhibición (mm)
1	Dilución aceite esencial <i>C. citratus</i> 1% v/v	0
2	Dilución aceite esencial <i>C. citratus</i> 2% v/v	0
3	Dilución aceite esencial <i>C. citratus</i> 3% v/v	11
4	Dilución aceite esencial <i>C. citratus</i> 4% v/v	16
7	Blanco negativo solvente hexano	0

8	Neotrol ®NF solución oftálmica	22
9	Neotrol ®NF solución oftálmica	22

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

En la figura 34, se observa que hay inhibición en el crecimiento de la bacteria en estudio visible a partir de una concentración al 3% dado que hay formación del halo de inhibición de gran tamaño ejerciendo una acción irreversible sobre la bacteria en estudio. Ahora bien, comparado con el control positivo de Neotrol ®NF sigue siendo menor el halo de inhibición con el aceite de estudio y no hay efecto del solvente sobre el crecimiento bacteriano como se describe la muestra #7 que corresponde solo al solvente empleado durante las pruebas.

En la tabla 11, se puede observar los valores de medición obtenidos siendo en el caso del control positivo: Neotrol® NF el que presentó mayor diámetro de inhibición el cual fue de 22mm seguido de 16mm para la solución al 4% del aceite y de 11mm para el aceite al 3%. Cabe señalar que se empleó de referencia el medicamento Neotrol ® NF dado que es una combinación de dos ingredientes: Polimixina B y Neomicina ambos son eficaces bactericidas, la mezcla de estos proporciona un espectro de acción amplio contra la gran mayoría de cepas bacterianas, tanto gram-positivas como gram-negativas siendo efectivo contra *S.aureus*.

La neomicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos cuyo mecanismo de acción es actuar sobre la sub-unidad 30S del ribosoma interfiriendo en la alineación-reconocimiento del ARN mensajero y del ARN de transferencia durante la formación de la cadena peptídica. La polimixina B por su lado actúa como bactericida uniéndose a los grupos fosfatos en los lípidos de la membrana citoplasmática bacteriana actuando como un detergente catiónico y alterando el equilibrio osmótico de la membrana lo que provoca fuga o migración de metabolitos esenciales para la bacteria.

Comparando el valor obtenido al 4% y 3% del *C.citratus* versus el Neotrol ®NF se ve que el halo de inhibición es un 27% y 50% menor respectivamente comparado al producto con demostrada actividad antibacteriana. Datos reportados en una investigación hecha por Bassole, H et al, 2011 frente a *S. aureus* se produce un halo de inhibición de 24,3mm cuando se aplica 5µL del aceite esencial de forma directa sobre discos es decir puro. Otro estudio realizado por Naik, Bashir, Ebenezer y Javid (2010) reportan un halo de inhibición de 14,33 mm a una concentración de 5% del aceite esencial. Así las cosas y considerando lo descrito por Clinical Laboratory Standars Institute CLSI (2017), en el cual “una bacteria es sensible cuando ha generado un halo de inhibición de entre 30mm y 35mm de diámetro, de la misma forma se describe como regla general que una cepa es resistente cuando genera halos de inhibición menores a 15mm”, se puede establecer que partir de una concentración del 4% del aceite esencial muestra sensibilidad intermedia.

Cabe mencionar que la acción antibacteriana contra el *S.aureus*, en nuestra muestra de estudio las posibles causas de diferencias sean debidas a factores, tales como:

- a. Variabilidad de la composición de metabolitos presente en el aceite esencial, dado que diferentes regiones o zonas climáticas que muestran variaciones en condiciones ambientales de temperatura, humedad ambiental relativa, luminosidad, presencia de plagas entre otros; todos estos factores afectan o alteran la composición del aceite esencial en la planta.
- b. Condiciones de la cepa o caldo que se usa durante el procedimiento dado que variaciones en la fase crecimiento alteran el ensayo.
- c. Uso de discos impregnados con el aceite versus aceite en “hoyos” de agar con lo cual se afecta los fenómenos de difusión que se logren dar.

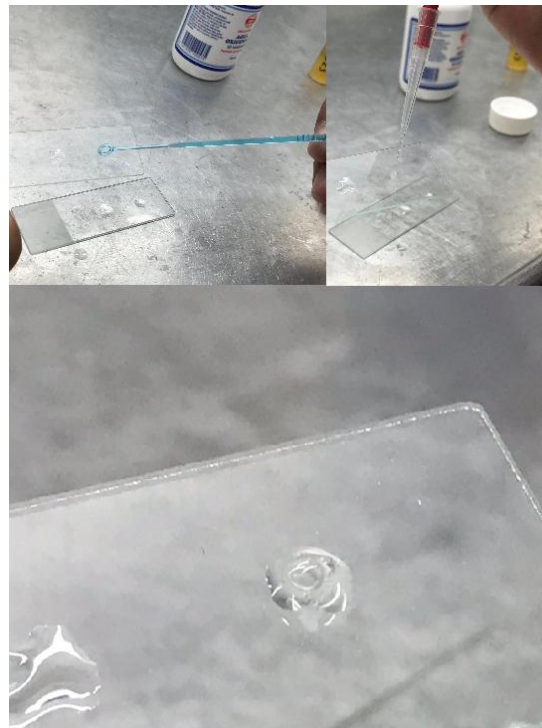
Paralelamente al estudio se aplicó la prueba de catalasa como ensayo de identificación y diferenciación entre bacterias del género estreptococos (prueba negativa) versus estafilococos (prueba positiva), dado que la catalasa es una enzima presente en *S. aureus* el cual al entrar en contacto con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% se produce una liberación o desprendimiento de burbujas que corresponde a O₂ dando así

positivo, tal como se describe en la siguiente reacción química (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2011, pp204).



En la figura 35, se aprecia la realización de este ensayo donde se observa la liberación de O_2 y con ello confirmar la presencia de *S. aureus*.

Figura 35. Prueba de identificación de catalasa para *S.aureus*, ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs, Guadalupe, San José.



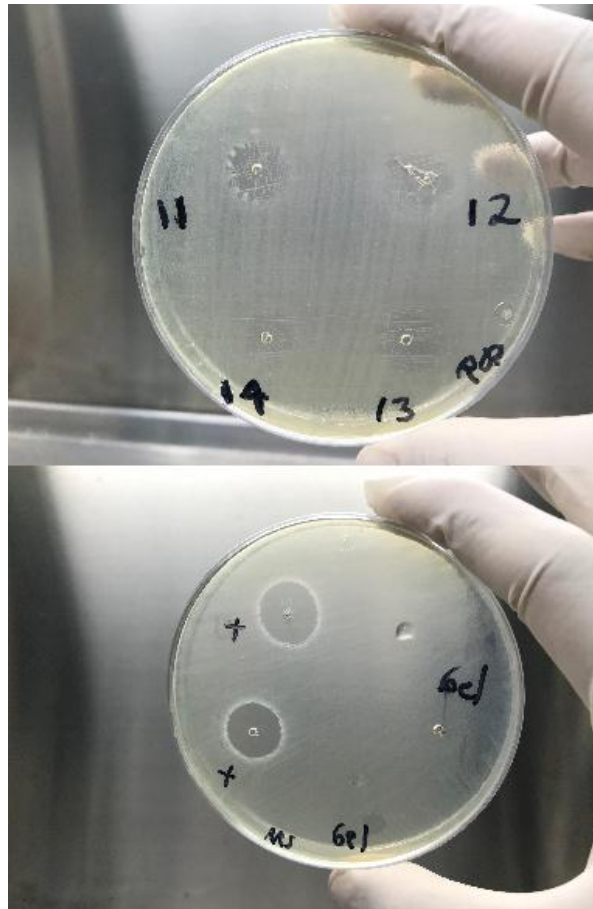
Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Evaluación de la actividad antibacteriana de la forma farmacéutica gel

Una vez que se estableció la actividad antibacteriana de sensibilidad moderada para el aceite esencial de *C. citratus* al 4%, se elaboró una forma farmacéutica gel al 0% (sin preservantes), al 3% y 4% para observar la inhibición de crecimiento frente a la bacteria.

Se logra determinar que, tanto al 3 % como al 4% producen inhibición y al 0% del gel sin preservantes no hay inhibición, todos fueron comparados con la muestra control positivo de Neotrol ®NF como se logra apreciar en la figura 36. El tamaño del halo de inhibición del control positivo fue mayor que los preparados a base del aceite esencial el cual fue de 21 mm, para el gel al 4% fue de 15mm y al 3% fue de 9mm , la tabla 12 describe los datos obtenidos.

Figura 36. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria *S.aureus*, para la forma farmacéutica Gel propuesta a tres concentraciones: 0% (sin preservantes), 3% y 4% de aceite esencial de *C. citratus* y su respectivo control positivo-negativo, ensayo realizado en las instalaciones del Laboratorio Microlabs, Guadalupe, San José.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Tabla 12. Resultados de la formación de los halos de inhibición frente a la bacteria *S. aureus* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *C.citratus* para la forma farmacéutica propuesta, realizado en las instalaciones del Laboratorio Microbiológico Microlabs.

Muestra	Descripción de la muestra	Medida halo inhibición (mm)
Gel	Gel sin preservantes y con 0% de aceite esencial <i>C. citratus</i>	0
13 y 14	Gel sin preservantes y con 3% de aceite esencial <i>C. citratus</i>	9
11 y 12	Gel sin preservantes y con 4% de aceite esencial <i>C. citratus</i>	15
+	Neotrol NF® solución oftálmica	21

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Variable 4: Formulación de un Gel antibacterial uso tópico a partir del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

Para este apartado se procedió a elaborar un gel con el aceite esencial de *C. citratus* al 4%, dado que resultó ser el que mostró resultados óptimos por la formación de halos de inhibición contra el *S. aureus* (tabla 12).

Para el proceso de elaboración de la forma farmacéutica, se requirió aplicar operaciones unitarias, tales como: agitación, mezclado y disolución de los distintos componentes. En la figura 37, se puede observar el proceso de elaboración del gel y en la

siguiente tabla 13, se muestra las proporciones de los distintos excipientes empleados en la elaboración.

Tabla 13. Descripción y composición del gel antibacteriano de zacate limón (*C. citratus*), elaborado en las Instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas UIA.

Nombre de la materia prima	Porcentaje
Carbopol	0,50%
Propilenglicol	10%
Propilparabeno	0,05%
Metilparabeno	0,15%
Glicerina	10%
Trietanolamina	10 gotas
Aceite esencial <i>C.citratus</i>	4%
Agua Purificada csp	100%

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

Figura 37 Proceso de elaboración del gel antibacteriano y producto terminado debidamente etiquetado, realizado en las instalaciones de Laboratorio Química, Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

El producto como tal es de fácil aplicación sobre la piel, no deja sensación grasosa y es de secado rápido, dejando una sensación de frescura posterior. La tabla 14 resume las características organolépticas y físico-químicas del gel antibacteriano, los datos que se reportan corresponden al formulado al 4% que demostró mejores resultados.

Tabla 14. Características organolépticas y físico-químicas del formulado gel antibacteriano al 4% aceite esencial de *C. citratus*, elaborado en las Instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas UIA.

Propiedad organoléptica o físico-química	Resultado obtenido
Color	Incoloro, leve opalescencia
Textura	Suave de fácil aplicación, levemente viscoso
Olor	Agradable, cítrico
Aspecto	Homogéneo
pH directo	5,7 upH

Fuente: Rojas, R. (2017). Elaboración propia

El producto ya terminado se envasó en tubo colapsible de aluminio blanco opaco, que posee un revestimiento interno epóxico, inerte de fácil sellado, debido a la sensibilidad a la luz, este empaque primario protege de la luz la parte inferior de la figura 38 se puede apreciar el producto.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una vez finalizado el presente trabajo de investigación dentro de las principales conclusiones se tiene:

- El método adecuado para la extracción del aceite esencial de *C. citratus* es el que emplea el aparato Dean-Stark .
- El hexano resultó un solvente adecuado para la separación y purificación del aceite esencial de zacate limón.
- En el proceso de purificación es importante la eliminación de trazas de agua para obtener espectros infrarrojos libre de la banda de absorción por parte del grupo OH del agua.
- La identificación de metabolitos activos empleando pruebas de química líquida tales como: Liberman-Buchard, Dragendorff y Shinoda permitieron corroborar la presencia de terpenos, alcaloides y flavonoides en la muestra de aceite esencial.
- La prueba de identificación aplicando la técnica de espectrofotometría infrarroja en la muestra de aceite esencial, confirma la presencia de bandas de absorción características de metabolitos, tales como terpenos. Así mismo, se hace imperante la comparación con una referencia que en nuestro caso fue el espectro del citral.
- La técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector masas brinda mayor certeza de los componentes presentes, el α -Citral es el componente mayoritario con un 54,07%, β -Citral con un 33,76% y β -Mirceno con un 4,92%.
- La actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. citratus* contra cepa de *S. aureus* mediante medición de halos de inhibición, se establece que a partir de una solución al 4% del aceite esencial denota una sensibilidad intermedia.
- Se confirma la presencia de estafilocos en las placas de cultivo mediante prueba positiva a la catalasa.

- Se establece que el gel de aceite esencial al 4% describe un halo de inhibición de 15mm, describiendo así una sensibilidad intermedia, comparado con un halo de inhibición de 21 mm de un antibiótico comercial.
- Se elaboró un gel antibacteriano que describe propiedades organolépticas y físico-químicas adecuadas para ser aplicadas en piel.

Recomendaciones

- Se recomienda que para futuros trabajos de investigación se logre obtener un estándar primario de referencia para la comparación, tanto del espectro infrarrojo como de cromatografía de gases con detector de masas para mayor confiabilidad.
- Asimismo, complementar con la técnica de cromatografía de capa fina comparando con un estándar de referencia.
- Para efectos de realizar procedimientos de identificación de componentes mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas, es importante el uso de solvente con una calidad química superior para evitar el arrastre de impurezas.
- A la vez, proteger de la luz la muestra y mantener en recipientes herméticos con tapas libres de polímeros orgánicos que pueden disolverse e incorporarse a la muestra de aceite esencial y que puedan afectar las pruebas de identificación.
- Así como evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial con otros microorganismos patógenos que sean de importancia para la salud de la población.
- También realizar estudios de inhibición a concentraciones mayores de aceite esencial.

REFERENCIAS

- Aguilar, L.C.; Gutiérrez, M.A. (2009). Acción larvicida de *Ocimum basilicum* y *Cymbopogon citratus* para combatir el *Aedes aegypti*. Proyecto de investigación para optar por el grado de Licenciatura de Farmacia. Universidad de Iberoamérica UNIBE, Costa Rica.
- Alos, J. (2012). Revisión Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Elsevier, vol. 33, n.10. Recuperado Junio 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14003413>
- Almeida, RBA., Akisue, G., Cardoso, LML., Junqueira, JC., Jorge, AOC (2013). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf. on *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* and *Candida spp.* Revista Brasileira Plantas Medicinales. Vol: 15 (4): 474-482.
- Asaolu, M.; Oyeyemi, O.; Olanlokun, J. (2009). Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. Pakistan Journal of Nutrition Vol: 8 (12): pp1921
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh,-Chungag, B. y Oyedejo, A. (2015). *Cymbopogon* Species; Ehtnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacological Importance. Molecules. Vol: 20, 7238-7453. DOI: 10.3390/molecules20057438
- Balachandar, B., Sadayan, P., Abimanan, A. (2014). Evaluation of the lemongrass plant (*Cymbopogon citratus*) extracted in different solvents for antioxidant and antibacterial activity against human pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. Vol: 4 (1): S134-S139. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60428-X.
- Bassole, I.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Obame, L.; Illboudo, A.; Franz, C. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. Phytomedicine. Vol: 18,1070-1074.

- Barrantes, R. (2007). Investigación: Un camino al conocimiento, un enfoque cualitativo y cuantitativo. (13th reimpresión). San José: EUNED.
- Berger, Stephen. (2017). Infectious diseases of Costa Rica. E-Book series Gideon. Edición. Recuperado Jun 2017 de: https://books.google.co.cr/books?id=wDUWDgAAQBAJ&pg=PA230&lpg=PA230&dq=impetigo+costa+rica&source=bl&ots=ePnMdzd6wF&sig=xTWmkYrC_33B6wQbxkAF59ZYBIk&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=impetigo%20costa%20rica&f=false
- Campos, J.A.; Wing, C.J (2009). Utilización de *Cymbopogon citratus* para la obtención de α -iononas, precursores de productos farmacéuticos y perfumes. Trabajo de investigación para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Iberoamérica, Costa Rica.
- Carey, F. (1999). Química Orgánica. Tercera edición. Editorial McGrawHill. España, pp481.
- Castañón,-Sánchez, C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Revista Evidencia Médica e Investigación en Salud. Vol 5 (3) pp 79-84.
- Castro, B. J.; Bedoya, G. J. (2011). Aislamiento y epoxidación con dimetildioxirano de los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales de *Tagetes lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* y *Eucalyptus citriodora*. Tesis de grado para optar título Tecnólogo Químico. Universidad Tecnológica Pereira pp 79.
- Centro de investigación en productos naturales (CIPRONA). Universidad de Costa Rica, Setiembre 2017, sitio web: <http://ciprona.ucr.ac.cr/ciprona/sobre-ciprona>.
- Ciccio, J. (1996). Aceites esenciales de las hojas y de los frutos verdes de *Drimys granadensis* (Winteraceae). Revista de Biología Tropical. Recuperado de <http://repositorio.ucr.ac.cr/handle/10669/26745>
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017) Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Ed, pp56-63.

- Departamento Química Orgánica (DQO). (2017). Universidad Buenos Aires. Sitio web:
http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/Te%C3%B3rica%2020-08-2013%20Espectroscop%C3%ADa%20infrarrojo_pdf%20.pdf
- Domínguez, J. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México.
- Ewansiha, J., Garba, S., Mawak, J., Oyewole, O. (2012). Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Lemon grass) and its phytochemical properties. *Frontiers in science* Vol 2 (6): 214-220. DOI: 10.5923/j.fs.20120206.14
- Falco, A., Martínez, J., Rodríguez, J., Núñez de Villavicencio, M., Sevillano, E. (2011). Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Cúrcuma longa*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol. 2 (1): 085-093.
- Farmacopea Estadounidense 40-Formulario Nacional 35. 2017. USP40NF35. Sección capítulos generales.
- García, G.M. Plantas medicinales científicamente validadas. Fundación CIENTEC, Setiembre 2017, <http://www.cientec.or.cr/ciencias/articulos.html>
- Gay, C. y Berini, L. (2004). Cirugía Bucal. España: Océano/Ergon.
- Gómez, M. (1998/2005). Elementos de estadística descriptiva. (3ra ed/13th reimpresión). San José: EUNED.
- Howe, G. y Bastian, R. (1987/1991). Cirugía Bucal Menor. (3ra ed/1ra reimpresión). México: Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V.
- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2010). Microbiología Médica. China, 25ª Edición, Mc Graw Hill. pp199.
- Instituto de Biodiversidad (INBIO). (2017). Sitio web:<http://www.inbio.ac.cr/que-es-inbio.html>
- Jiménez, J., y Del Corral, H. (2017). Vigilancia molecular de la resistencia bacteriana. *Revista experimental*. Recuperado Junio, 2017, <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/experimenta/article/viewFile/327421/20784550>

- Kruger, G. (1983/2000). Cirugía Buco-maxilofacial. (5ta ed./6ta reimpresión). México: Editorial Médica Panamericana.
- Laboratorios Kin. Sitio Web visitado en julio 2017:
http://www.kin.es/es/health_care/2a28b12c84/geles/perio-kin-gel.html
- Laskin, D. (1987). Cirugía bucal y maxilofacial. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Leyra, J.R. (2011). Extracción del aceite esencial de zacate limón (*Cymbopogon citratus*) y su aplicación como agente antimicrobiano y antimicótico. Trabajo de investigación, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Mexico.
- Lindhe, J. Karring, T. y Lang, N. (2005). Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. (4ta Eed) Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Madrigal, B., F. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del producto aceite esencial de tomillo (*Thymus Vulgaris*) en el *S. aureus*. Tesis de grado para optar por Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas
- Martínez, D.M. (2016). Laboratorio de Farmacognosia, Libreta de Laboratorio. Universidad Internacional de las Américas UIA, San José Costa Rica, pp10-23.
- Matasyoh, J., Wagara, I., Nakavuma, L., Kiburai, A.(2011). Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. African Journal food science. Vol. 5 (3), pp 138-142.
- Mcphee, J.S. (2011). Fisiopatología de la enfermedad. 6th Edición, Editorial McGrawHill, México, pp183-204.
- Mendoza, N. (2008). Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana. Mexico.
- Mohd, I.N., Bashir, A.F., Ebenezar, J., Javid, A.B. (2010).Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. Asian Pacific Journal of Tropicicla Medicine, pp: 535-538.
- Morillo, J. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial de *cymbopogon citratus* en diferentes concentraciones sobre la cepa de *porphyromona gingivalis*. Tesis de

- Licenciatura en Odontología. Ecuador: Universidad Central de Ecuador.
Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9134>
- Nadjib, M.B., Amine, M., Kamelli, A., Saidi, F., Tchoketch, H (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus* essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. Libian Journal of Medicine. Vol:9.
- Natural Resources Conservation Service. United States of Agriculture (USAD). Dirección url: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CYCI>, Julio 2017
- Oliveira, M., Velázquez, D.; Bermúdez A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia. v.30, n.8. Recuperado Junio, 2017 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1373833>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Informe técnico 2013. Dirección url: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>, accesado junio 2017
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Resistencia a los antimicrobianos. Dirección url: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Definición fitofármacos. Dirección url: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18840es/s18840es.pdf>, Octubre 2017)
- Pelczar, Reid, Chan. (2011). Microbiología. Editorial McGraw Hill. México, pp: 440-490.
- Penredo, H.A.; Palou-García, E.; López, A. (2009) Aceites esenciales: métodos de extracción. Revista Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos Vol: 3, pp 24-32
- Porth, C.M.; Grossman, S.C. (2014). Fisiopatología de Porth. 9th Ed. Editorial Wolters Kluwer, Espana.p541-1554.

- Restrepo, J.; Vinasco, L.; Jaramillo, L. (2009). Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*C.citratus*) en β -Ciclodextrinas usando CO₂ supercrítico. Revista Ingeniería Química. Vol: 11 (2) pp 9-19.
- Rodríguez, F.L. Obtención de un insecticida natural a partir de *Cymbopogon citratus*. Proyecto de investigación para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Iberoamérica (UNIBE), Costa Rica.
- Sajjad, A.K., Ahmad, I.(2012). Sajjad, A.K., Ahmad, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. Journal of Ethnopharmacology. Vol 140: 416-423. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.045
- Sampieri, Hernández Roberto; Collado, Fernández Carlos; Baptista, Lucio María del Pilar. (2014). Metodología de la Investigación. Editorial Mac Graw Hill. México. 6ta Edición.
- Santos, C.E., Cavalcante, N.M., Lima, E., Pereira, F., Wanderley, C. (2013). Treatment of *pityriasis versicolor* with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* therapeutics pilot study. Annais Brasileiros de Dermatología. Vol: 88 (3): 381-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20131800>.
- Skoog, D., Holler, J., Nieman, T. (2011). Principios de análisis instrumental. 5th Edición, Editorial Mcgraw Hill. pp 409-460.
- Shah G., Shri, R., Sharma, N., Singh, B., Mann, A. (2011). Scientific basis of the therapeutics use of *Cymbopogon citratus*, *Stapf* (Lemon grass). Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. Vol 2. Enero-Marzo 2011. DOI: 10.4103/2231-4040.79796
- Soares, M., Alves, R., Pires, P., Beatriz, M., Oliveira, B., Vinha, A. (2013). Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. Food and Chemical Toxicology. Vol 60: 413-418.

- Tavares, F., Costa G., Francisco, V., Liberal, J., Figueirinha, A., Cruz, T.M., Lopes, Maria C. (2015). *Cymbopogon citratus* industrial waste as a potencial source of bioactive compounds. *Journal Science Food Agriculture*. Vol 95, pp:2652-2659
DOI:10.1002/jsfa.6999
- Valdés, R. (2017). Uso potencial de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Laurus nobilis* para el control de *Myzus persicae* en lechuga bajo cubierta. Tesis de Maestría en Protección Vegetal. Argentina: Universidad Nacional de la Plata. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59112>
- Vargas, J. (2016). Análisis de las propiedades antibacterianas de dos preparados farmacéuticos tópicos a partir del extracto de propóleo de abeja. Tesis de grado para optar Licenciatura en Farmacia. Costa Rica: Universidad Internacional de las Américas
- Vélez, A.H., Rojas, M.W., Restrepo, J.M. (2009). Fundamentos de Medicina: Dermatología. Séptima Edición, Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, pp3-45; 211-218
- The Index Merck. (1968). An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 8th Edition, pp821
- Waite, D. (1990). Textbook of Practical Oral and Maxillofacial Surgery. (3ra ed) Estados Unidos: Lea & Febiger.
- Zambrano, A. (2015). Estudio farmacognóstico y composición proximal de *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa), *Melissa Officinalis* (Toronjil) y *Lippia Citriodora* (Cedrón) proveniente de las Provincias El Oro y Azuay, Ecuador. Tesis de Licenciatura en Farmacia. Ecuador: Universidad Técnica de Machala. Recuperado de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/2795>
- Zulfa, Z., Chia, C.T., Rukayadi, Y. (2016). In vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. *International Food Resarch Journal*. Vol: 23 (3): 1262-1267.