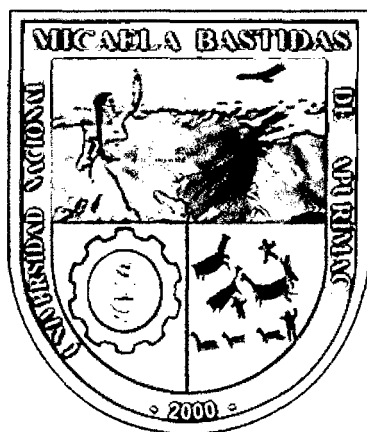


UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE

APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Salvia officinalis* VARIEDAD *alba*
EXTRAÍDO POR EL MÉTODO MIXTO EN *Staphylococcus aureus*,
Bacillus cereus, *Salmonella spp.* Y *Escherichia coli*”**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

JUBITZA MERINO TORRES

Abancay, Diciembre del 2011

PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
T IAE M 2011	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	28 MAR 2012
Nº DE INGRESO:	00247

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE

APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERIA


ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR:


Blgo. Trifón Oros Huayhua
PRESIDENTE


Ing. Ruth Mery Ccopa Flores
JURADO


Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres
JURADO


Dra. Dagnit Liz Bejarano Lujan
CO-ASESOR


Blgo. Gladys Marilú Castro Pérez
ASESOR

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Salvia officinalis* VARIEDAD *alba*
EXTRAÍDO POR EL MÉTODO MIXTO EN *Staphylococcus aureus*,
Bacillus cereus, *Salmonella spp.* Y *Escherichia coli*”**

DEDICATORIA

A Dios, que diariamente me da la vida y la fortaleza para seguir adelante en la lucha para un buen porvenir.

A mis padres Lucio y Timotea por su sacrificio diario, porque si no hubieran estado a mi lado dándome aliento cuando me sentía derrotada y sin ganas de luchar, no hubiese logrado, salir adelante en mi carrera y cumplir esta meta, los amo porque a pesar de todo están junto a mí. Dios los bendiga y los guarde siempre.

A mis amigos y profesores por brindarme siempre su apoyo.

AGRADECIMIENTO

A mi padre celestial, por darme la fortaleza para lograr esta meta, por haberme puesto en el camino aquellas personas que han sido guía y compañía durante todo el periodo de estudio y porque has sido tú mi fuerza para continuar.

A mis padres Lucio y Timotea por ser quienes siempre nos guían en el transitar de la vida.

A mi apreciada Universidad, en cuyas aulas tuve la oportunidad de formarme ética e intelectualmente.

A la Universidad Nacional del Santa por brindarme todos los medios para llevar a cabo esta investigación y al Dr. Gilbert Rodríguez Paucar, por ofrecerme su amistad y ayuda incondicional en el desarrollo de la tesis.

A mis asesores Blga. Gladys Marilú Castro Pérez y a la Dr. Dagnith Liz Bejarano Luján, por compartir sus conocimientos, experiencia y guía, lo que contribuyo para la finalización del presente proyecto.

A todos mis profesores por compartir sus conocimientos, dedicación, tiempo y motivarnos a salir adelante y específicamente a aquellos que gentilmente nos escucharon y aportaron en la tesis con sus ideas.

A mis amigos y compañeros de clase con quienes hemos compartido momentos únicos e inolvidables y que nuestra amistad perdure por muchos años sin importar que ya no estemos en la universidad.

INDICE

Nomenclatura	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	4
2.1. GENERALIDADES DE LA <i>Salvia officinalis</i>	4
2.1.1. Clasificación Científica de <i>Salvia officinalis</i>	4
2.1.2. Características botánicas	4
2.1.3. Variedades	5
2.1.3.1. La <i>Salvia officinalis</i> (típica)	5
2.1.3.2. La <i>Salvia Officinalis</i> variedad <i>alba</i>	5
2.1.3.3. La <i>Salvia Officinalis</i> variedad <i>crispa</i>	5
2.1.3. Aspectos Químicos	6
2.1.3.1. Principales componentes del aceite esencial de las hojas y espigas de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	7
2.1.4. Aspectos físicos	8
2.2. ACEITES ESENCIALES	8
2.2.1. Definición	8
2.2.2. Clasificación de los aceites esenciales	8
2.2.2.1. Consistencia	8
2.2.2.2. Origen.	9
2.2.2.3. Naturaleza química	10
2.2.3. Biogénesis de los aceites esenciales	11

2.2.3.1. Metabolismo de las plantas	11
2.2.3.2. Ubicación de los aceites esenciales en las plantas	14
2.2.4. Características químicas de los aceites esenciales	14
2.2.5. Características físicas de los aceites esenciales	16
2.2.6. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales	17
2.3. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	18
2.3.1. Tratamiento post-cosecha	18
2.3.1.1. Limpieza:	18
2.3.1.2. Selección:	18
2.3.1.3. Secado:	19
2.3.1.4. Empacado:	19
2.3.1.5. Almacenamiento:	19
2.3.2. Métodos de obtención de aceites esenciales	19
2.3.2.1. Destilación	20
2.3.3. Análisis y control de calidad de los aceites esenciales	25
2.3.3.1. Características organolépticas	27
2.3.3.2. Características físicas	28
2.3.3.3. Características químicas	28
2.3.3.4. Características biológicas de los aceites esenciales	31
2.3.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar	34
2.3.4.1. Método Kirby-Bauer	35
2.3.4.2. Interpretación de los resultados de la prueba de difusión en disco	37
2.3.5. Toxiinfecciones alimentarias	38
2.3.5.1. Staphylococcus aureus	39

2.3.5.2. Bacillus cereus	42
2.3.5.3. Salmonella spp.	43
2.3.5.4. Escherichia coli	45
2.4. ENCAPSULAMIENTO DE ACEITE ESENCIAL	46
2.4.1. Maltodextrinas	47
2.4.2. Métodos de Liberación	47
2.4.3. Aplicaciones de encapsulación en la industria de alimentos	48
2.4.4. Aplicación de aceite esenciales	49
III. MATERIALES Y METODOS	51
3.1. MATERIA PRIMA	51
3.2. MATERIALES	51
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS	55
3.3.1. Extracción de Aceite Esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	55
3.3.1.1. Recepción de Materia Prima	58
3.3.1.2. Selección y limpieza	58
3.3.1.3. Secado en sombra	58
3.3.1.4. Cortado	59
3.3.1.5. Pesado	59
3.3.1.6. Destilación	59
3.3.1.7. Condensación	59
3.3.1.8. Separación	60
3.3.1.9. Envasado y almacenamiento	60
3.3.2. Análisis Químico Proximal de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	61
3.3.2.1. Determinación de la Humedad	61

3.3.2.2. Determinación de Proteínas	61
3.3.2.3. Determinación de Grasas	61
3.3.2.4. Determinación de Cenizas	61
3.3.3. Análisis Físicoquímico del Aceite Esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	62
3.3.3.1. Determinación de la Densidad	62
3.3.3.2. Determinación del Índice de Refracción	62
3.3.3.3. Determinación del Índice de Acidez	62
3.1.5.4. Determinación del Índice de Ester	62
3.3.3.5. Determinación del Índice de Saponificación	62
3.3.3.6. Determinación de Solubilidad en Etanol	62
3.3.4. Análisis Cromatográfico del Aceite Esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	63
3.3.4.1. Preparación de la muestra	63
3.3.4.1. Corrida de la muestra	63
3.3.5. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	65
3.3.5.1. Cepas bacterianas	65
3.3.5.2. Preparación de Agar Mueller Hinton	66
3.3.5.3. Preparación del inóculo	66
3.3.5.4. Inoculación en las Placas	66
3.3.5.5. Aplicación de los Discos	67
3.3.5.6. Condiciones de Incubación	69
3.3.5.7. Lectura de Placas	69

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	70
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	72
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	92
VII. ANEXOS	96

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
Cuadro 1: Clasificación Científica de <i>Salvia officinalis</i>	4
Cuadro 2: Variación en la composición de esencias de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> con la época de cosecha.	7
Cuadro 3: Porcentaje de los principales componentes de las esencias de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> determinado por cromatografía en fase gaseosa.	7
Cuadro 4: Características físicas de las esencias de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	8
Cuadro 5: Grupos funcionales de cada compuesto.	15
Cuadro 6: Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los AEs.	27
Cuadro 7: Interpretación de resultados de la prueba de difusión en agar.	38
Cuadro 8: Parámetros de extracción de aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i>	57
Cuadro 09: Operacionalización de variables.	71
Cuadro 10: Composición de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> secada a la sombra.	72
Cuadro 11: Características físicas de aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> extraído por el método mixto (agua - vapor).	73
Cuadro 12: Componentes del aceite esencial de Salvia.	75
Cuadro 13: Diámetro de los halos de inhibición obtenido para cada tratamiento	77
Cuadro 14: Promedio de halos de inhibición presentadas en las diferentes bacterias.	77

Cuadro 15: Análisis de varianza (ANVA) para el modelo matemático que evalúa la concentración del aceite esencial en la cepa bacteriana.	78
Cuadro 16: Síntesis del análisis estadístico de Tukey	79
Cuadro 17: Tamaño de Halos de Inhibición para cada tratamiento.	105
Cuadro 18: Promedio de Halos de Inhibición para cada tratamiento, codificados.	105
Cuadro 19: Tabla de Análisis de Varianza (ANVA)	109
Cuadro 20: Ordenando promedios, Según Cuadro 14.	110
Cuadro 21: Síntesis del análisis estadístico.	115

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1: Hojas y parte superior de la hoja de <i>salvia officinalis</i> .	5
Figura 2: Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su relación con los metabolitos primarios.	12
Figura 3: Métodos de extracción de mezclas aromáticas.	20
Figura 4: Principales partes de un equipo de extracción de aceites esenciales.	21
Figura 5: Equipo de Hidrodestilación.	23
Figura 6: Método de destilación con agua.	25
Figura 7: Destilacion mixta.	25
Figura 8: Esquema general de un cromatógrafo de gases.	30
Figura 9: Test de Kirby-Bauer.	35
Figura 10: <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figura 11: <i>Bacillus cereus</i>	43
Figura 12: <i>Salmonella spp.</i>	44
Figura 13: <i>Escherichia coli</i>	45
Figura 14: Aplicacion de los aceites esenciales.	49
Figura 15: Diagrama de flujo para la extracción de aceite esencial.	55
Figura 16: Equipo de extracción de aceites esenciales de yerbas officinalis. Mod. UDCA-2/EV.	56
Figura 17: Diagrama de programación de los parámetros de trabajo.	56
Figura 18: Cromatógrafo de Gas Shimadzu; Modelo 2010.	64
Figura 19: (A) Cepa bacteriana <i>E. coli</i> ; (B) Cepa bacteriana de <i>S. aureus</i> conservada en refrigeración.	65

Figura 20: Siembra por estrías en tres direcciones.	67
Figura 21: Colocación de discos de sensibilidad.	68
Figura 22: Colocación de aceite esencial encapsulado en maltodextrina en el orificio de 6mm.	69
Figura 23: Espectro, presente en el aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> .	75
Figura 24: Perfiles de halos de inhibición de bacterias a diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> .	81
Figura 25: Perfiles de halos de inhibición de bacterias a diferentes concentraciones de aceite esencial encapsulado en maltodextrina.	81
Figura 26: Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> puro a diferentes concentraciones sobre <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i> .	82
Figura 27: Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> provocado por el aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> ; (A) Concentración de 10ul; (B) Concentración de 5ul; (C) Concentración de 2.5ul.	82
Figura 28: Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>B. cereus</i> provocado por el aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> ; (A*) Concentración de 10ul; (B*) Concentración de 5ul; (C*) Concentración de 2.5ul.	83
Figura 29: Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Salvia officinalis</i> variedad <i>alba</i> encapsulado en maltodextrina a diferentes	84

concentraciones.

Figura 30: Halos de inhibición de *S. aureus* frente al aceite esencial de *Salvia* 84

officinalis variedad *alba* encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones: **(a)** Concentración de 10ul; **(b)** Concentración de 5ul; **(b)** y Concentración de 2.5ul.

Figura 31: Halos de inhibición de *B. cereus* frente al aceite esencial de *Salvia* 85

officinalis variedad *alba* encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones: **(a*)** Concentración de 10ul; **(b*)** Concentración de 5ul; **(b*)** Concentración de 2.5ul.

Figura 32: Halos de inhibición de bacterias gram negativas provocado por el 86

aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; **(M)** *Salmonella spp.*; **(N)** *E. coli*.

RESUMEN

La presente investigación es una respuesta a la creciente tendencia del consumo de alimentos naturales, con especial atención al empleo del aceite esencial de salvia como conservante natural, la formulación de una tecnología de conservación alternativa, a través del uso de sistemas que permitan la liberación de los aceites esenciales.

El objetivo del trabajo fue determinar las características físico y químicas del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; evaluar y comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de salvia puro y encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones por halos de inhibición en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. La salvia, presentó: 69,8% de humedad; 0,7% de proteínas; 3,2% de grasa; 1,8% de cenizas y 24,5% de carbohidratos. Las condiciones de extracción fueron: Flujo de vapor, 40 kg/h; temperatura, 100 °C y tiempo, 45min; se obtuvo un rendimiento de 1,61%. Las propiedades físicas fueron coherentes con la bibliografía relatada y con la presencia de compuestos químicos encontrados. El aceite esencial obtenido se caracterizó por presentar cineol, 20%; limoneo, 9%; y citral, 1,2%, los cuales son indicadores de actividad antibacteriana. Se encapsuló 10, 5, 2.5µl de aceite esencial de salvia en 0.72g de maltodextrina. Para la determinación del poder inhibitorio se usó el método de difusión en agar usando como soporte un papel filtro doble de 6 mm de diámetro, el cual fue colocado después de la siembra. Según el análisis estadístico se obtuvo mejores resultados con una confianza al 95% en el aceite esencial encapsulado en maltodextrina con una concentración de 10µl de aceite para *S. aureus*, *B. cereus*; presentando un Halo de Inhibición de 21.7 y 20.7 mm respectivamente, lo cual indica que estas bacterias son Sensibles al aceite de salvia; no se evidenció formación de Halo en *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* que indica Resistencia hacia el aceite esencial.

I. INTRODUCCIÓN

En la última década, el mercado mundial de aceites esenciales ha experimentado aumento, debido a la tendencia creciente de utilización de productos naturales por su actividad antioxidante y antimicrobiana.

Los extractos naturales, así como los aceites esenciales de los vegetales, son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles y semillas. Químicamente, los aceites esenciales son mezclas complejas compuestas por: monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos, con actividad antimicrobiana (Martínez, 2003 citado por Matos et al., 2010).

En la industria de los alimentos, los AE son extensivamente usados como saborizantes en una amplia variedad de alimentos y bebidas. Además, debido a su actividad antimicrobiana, diversos investigadores (Holley y Patel, 2005; Burt, 2004; Doyle, et al., 2001) han mostrado interés en su uso como conservantes alternativos, en comparación con los conservantes sintéticos.

La *Salvia officinalis* variedad *alba* es una planta ampliamente distribuida en zonas alto andinas de la región Apurímac, probablemente con importantes propiedades medicinales debido a componentes activos poco estudiados. Estos componentes activos pueden ser aprovechados en la industria de alimentos y ser de importancia económica en el ámbito nacional y regional.

En la actualidad la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son de origen microbiano, siendo uno de los problemas de mayor impacto a nivel mundial; entre los microorganismos de carácter patógeno responsables de dichas enfermedades y de la aparición de graves intoxicaciones alimentarias con importancia en salud pública, cabe resaltar al *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*. Según estimaciones del Ministerio de Salud de la Dirección

Regional de Salud Apurímac, los casos de las enfermedades diarreicas agudas (EDA) tienen tendencia a incrementarse con altos índices de enfermedades gastrointestinales. En lo que va del presente año, marzo – 2011 (semana epidemiológica SE:01-08), se tiene notificado 2018 casos de EDA, comparativamente con la misma semana epidemiológica del 2010, existe un incremento de 6,28% (Diresa, 2011).

La presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, conduce a buscar alternativas de inhibición y eliminación mediante el uso de sustancias naturales, no perjudiciales para el consumidor. Los aceites esenciales vienen recibiendo especial atención como conservantes en la industria de alimentos, sin embargo, aún existen interrogantes en relación a su forma de aplicación, entre ellas: impregnación en el producto alimenticio y volatilización rápida del aceite (Holley y Patel, 2005 citado por Matos et al., 2010).

Estas dificultades podrían solucionarse a través de un soporte que contenga en su interior el aceite esencial y que permita su liberación paulatinamente. Algunos autores (proponen como alternativa la micro encapsulación del aceite esencial (Bhandari et al., 1998, citado por Matos et al., 2010). Las maltodextrinas han sido citadas para la formación de un complejo (aceite esencial + maltodextrina), el cual ofrecería protección a los compuestos encapsulados, los cuales serían liberados controlando la humedad del ambiente. Los compuestos liberados de manera continua y prolongada pueden proteger a los alimentos contra el crecimiento microbiano; afectando o no su calidad sensorial (Fanger et al., 2002).

El presente trabajo de investigación es una respuesta a la creciente tendencia del consumo de alimentos naturales, con especial atención al empleo del aceite esencial de salvia como conservante natural y la formulación de una tecnología de conservación alternativa, a través del uso de sistemas que permitan la liberación del aceite esencial,

tales como, microcápsulas de maltodextrina. Así mismo será una oportunidad de proyectar los conocimientos científicos adquiridos en la E.A.P. Ing. Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac a la comunidad.

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

Objetivo general:

- ✓ Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* extraído por el método mixto en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.

Objetivos específicos:

- ✓ Determinar las características físico y químicas del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*.
- ✓ Evaluar y comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* puro y encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones por halos de inhibición en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.

II. MARCO TEORICO

2.1. GENERALIDADES DE LA *Salvia officinalis*

2.1.1. Clasificación Científica de *Salvia officinalis*

Cuadro 01: Clasificación Científica de *Salvia officinalis*.

Clasificación científica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Genero	Salvia
Nombre binomial	
<i>Salvia officinalis</i> L.	

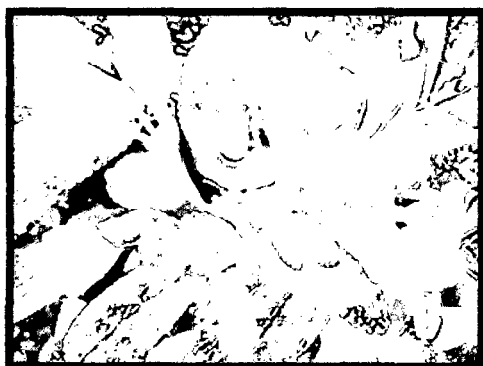
Fuente: Cárdenas et al., 2004.

2.1.2. Características botánicas

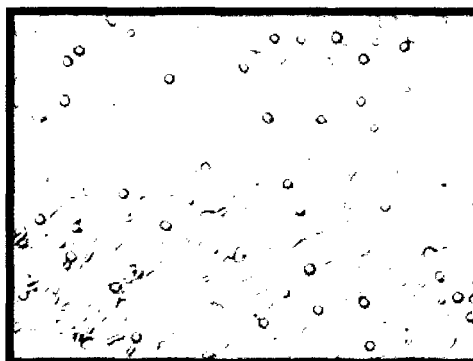
La salvia (*Salvia officinalis*) es una planta herbácea perenne o bienal. Es una hierba de 20 cm, de hojas pequeñas; flor blanca; crece hasta por encima de los 4000 msnm; cuyas hojas son ampliamente utilizadas con fines medicinales, siendo consumida en mates, anisados y otros, por el poblador de las altas comunidades de la región de Apurímac y también se encuentran en todo el sur de Perú (Cárdenas et al., 2004).

La salvia es un sufrútice en forma de mata con raíz fusiforme, robusta y fibrosa, tallo erecto de sección cuadrangular del cual salen numerosas ramificaciones, hojas

opuestas, pecioladas, ovales-lanceoladas, espesas y rugosas, con bordes finamente dentados, recubiertos de pelusilla y de color verde ceniciento. Las flores, bilabiadas, están reunidas en verticilos situados en inflorescencias verticales que suelen aparecer de junio a julio (Cárdenas et al., 2004).



a) Hojas de *Salvia officinalis*.



b) La parte superior de una hoja de salvia - trichomas son visibles

Figura 01: Hojas y parte superior de la hoja de *salvia officinalis* (Cárdenas et al., 2004).

2.1.3. Variedades

2.1.3.1. La *Salvia officinalis* (típica) alcanza en su desarrollo una altura de 40-60 centímetros, presenta hojas ovales y flores violetas. Es la que más se cultiva.

2.1.3.2. La *Salvia Officinalis* variedad *alba* presenta hojas de mayores dimensiones respecto a la anterior y flores de color blanco.

2.1.3.3. La *Salvia Officinalis* variedad *crispa* tiene hojas espesas, muy alargadas y rizadas. Las flores son de color azul lavanda. Resiste particularmente a la sequía (Cárdenas et al., 2004).

2.1.4. Aspectos Químicos

El contenido de aceite esencial de *salvia officinalis* se sitúa entre 0.8 – 2.5%. Los principales componentes son cetonas monoterpenicas biológicas, las *a* y *b* tuyonas (35-60%, predominando claramente la *a*-tuyona, salvo raras excepciones). El aceite esencial contiene además, como componentes mayoritarios, alcanfor (10-40%), cineol, borneol (libre y esterificado), entre el resto de los componentes identificados (por cromatografía de gases y cromatografía de gases/espectrofotometria de masa) se encuentran con bastante frecuencia una decena de hidrocarburos mono y sesquiterpenicos; pineno, canfeno, sabineno, limoneno, etc. Las proporciones de estos componentes pueden variar de forma importante en función de numerosos criterios: origen geográfico, época, y frecuencia de recolección (Sánchez et al., 2005).

- Aceite esencial (1 a 2,5%):
- Monoterpenos.
- Sesquiterpenos.
- Alcoholes no terpénicos
- Monoterpenoles.
- Sesquiterpenoles
- Monoterpenonas: tuyona, alcanfor.
- Aldehidos.
- Diterpenos.
- Flavonoides.
- Ácidos fenólicos: rosmarínico, labiático y caféico.
- Taninos: salvia-tanino.
- Principio estrogénico (1000 g de droga seca equivalen aproximadamente a 6000 u. i. de estrona) (Sánchez et al., 2005).

2.1.4.1. Principales componentes del aceite esencial de las hojas y espigas de *Salvia officinalis* variedad *alba*

Cuadro 02: Variación en la composición de esencias de *Salvia officinalis* variedad *alba* con la época de cosecha.

Componentes	Plantas no florecidas	Plantas florecidas
Canfeno	0,4	0,2
β -pineno	1,9	8,3
1,8-cineol	4,6	4,7
α -tuyona	1,5	28,1
β -tuyona	5,0	3,7
Alcanfor	10,2	1,2
β -cariofileno	3,6	4,8
α -humuleno	13,0	15,2
Comp. carbonílicos totales	46,7	33,0

Fuente: Mizrahi et al., 1994.

Cuadro 03: Porcentaje de los principales componentes de las esencias de *Salvia officinalis* variedad *alba* determinado por cromatografía en fase gaseosa.

Componente	Referencia
β -pineno	0,5 - 13,2
1,8-cineol	2,3 - 15,2
α -tuyona	17,0 - 43,0
β -tuyona	2,4 - 14,2
Alcanfor	4,5 - 27,7
β -cariofileno	2,0 - 9,3
α -humuleno	0,2 - 16,7
Compuestos carbonílicos totales	34,0 - 63,7

Fuente: Mizrahi et al., 1994.

2.1.5. Aspectos físicos

Cuadro 04: Características físicas de las esencias de *Salvia officinalis* variedad *alba*.

Característica física	Referencia
Índice de refracción a 20°C	1,4450 a 1,4837
Densidad relativa	0,8973 a 0,9310
Rotación óptica a 20°C	- 11,40° a + 33,40°

Fuente: Mizrahi et al., 1994.

2.2. ACEITES ESENCIALES

2.2.1. Definición

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.2. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

2.2.2.1. Consistencia

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- ✓ Esencias
- ✓ Bálsamos
- ✓ Resinas

Las **esencias** fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Los **bálsamos** son extractos naturales obtenidos de un arbusto o un árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. (Vargas y Bottia, 2008).

Dentro del grupo de las **resinas** podemos encontrar a su vez una serie de posibles combinaciones o mezclas:

1. Las **resinas**, son productos amorfos sólidos o semisólidos de naturaleza química compleja. Pueden ser de origen fisiológico o fisiopatológico. Por ejemplo, la colofonia, obtenida por separación de la oleorresina trementina. Contiene ácido abiético y derivados (Vargas y Bottia, 2008).

2. Las **oleorresinas**, son mezclas homogéneas de resinas y aceites esenciales. Por ejemplo, la trementina, obtenida por incisión en los troncos de diversas especies de *Pinus*. Contiene resina (colofonia) y aceite esencial (esencia de trementina) que se separa por destilación por arrastre de vapor. También se utiliza el término oleorresina para nombrar los extractos vegetales obtenidos mediante el uso de solventes, los cuales deben estar virtualmente libres de dichos solventes. Se utilizan extensamente para la sustitución de especias de uso alimenticio y farmacéutico por sus ventajas (estabilidad y uniformidad química y microbiológica, facilidad de incorporar al producto terminado). Éstos tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (oleorresina de pimentón, pimienta negra, clavo, etc.) (Vargas y Bottia, 2008).

3. **Gomorresinas**, son extractos naturales obtenidos de un árbol o planta. Están compuestos por mezclas de gomas y resinas (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.2.2. Origen. De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- ✓ Naturales
- ✓ Artificiales
- ✓ Sintéticos

Los **naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los **artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalol, o la esencia de anís enriquecida con anetol (Vargas y Bottia, 2008).

Los aceites esenciales **sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.2.3. Naturaleza química

El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%), mediante extracción se obtiene en una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente. El término quimiotipo alude a la variación en la composición del aceite esencial, incluso dentro de la misma especie. Un quimiotipo es una entidad químicamente distinta, que se diferencia en los metabolitos secundarios. Existen pequeñas variaciones (ambientales, geográficas, genéticas, etc.) que producen poco o

ningún efecto a nivel morfológico, sin embargo producen grandes cambios a nivel de fenotipo químico. Un caso típico es el del tomillo, *Thymus vulgaris*, que tiene 6 quimiotipos distintos según cuál sea el componente mayoritario de su esencia (timol, carvacrol, linalol, geraniol, tujanol – 4 o terpineol. Cuando esto ocurre, se nombra la planta con el nombre de la especie seguido del componente más característico del quimiotipo, por ejemplo, *Thymus vulgaris* linalol ó *Thymus vulgaris* timol (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.3. Biogénesis de los aceites esenciales

2.2.3.1. Metabolismo de las plantas

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta. El metabolismo primario proporciona las moléculas de partida para las rutas del metabolismo secundario, entre las que se encuentran (Santander, 2007).

Ácido shikímico: da origen a muchos componentes aromáticos, aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y ciertos polifenoles, y

Aminoácidos: precursores de los alcaloides y antibióticos peptídicos, que incluyen las penicilinas y cefalosporinas.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse según la estructura química en tres grupos, a saber: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados, y alcaloides. En la Figura 02 se ilustra la relación que existe entre los metabolitos primarios y secundarios (Santander, 2007).

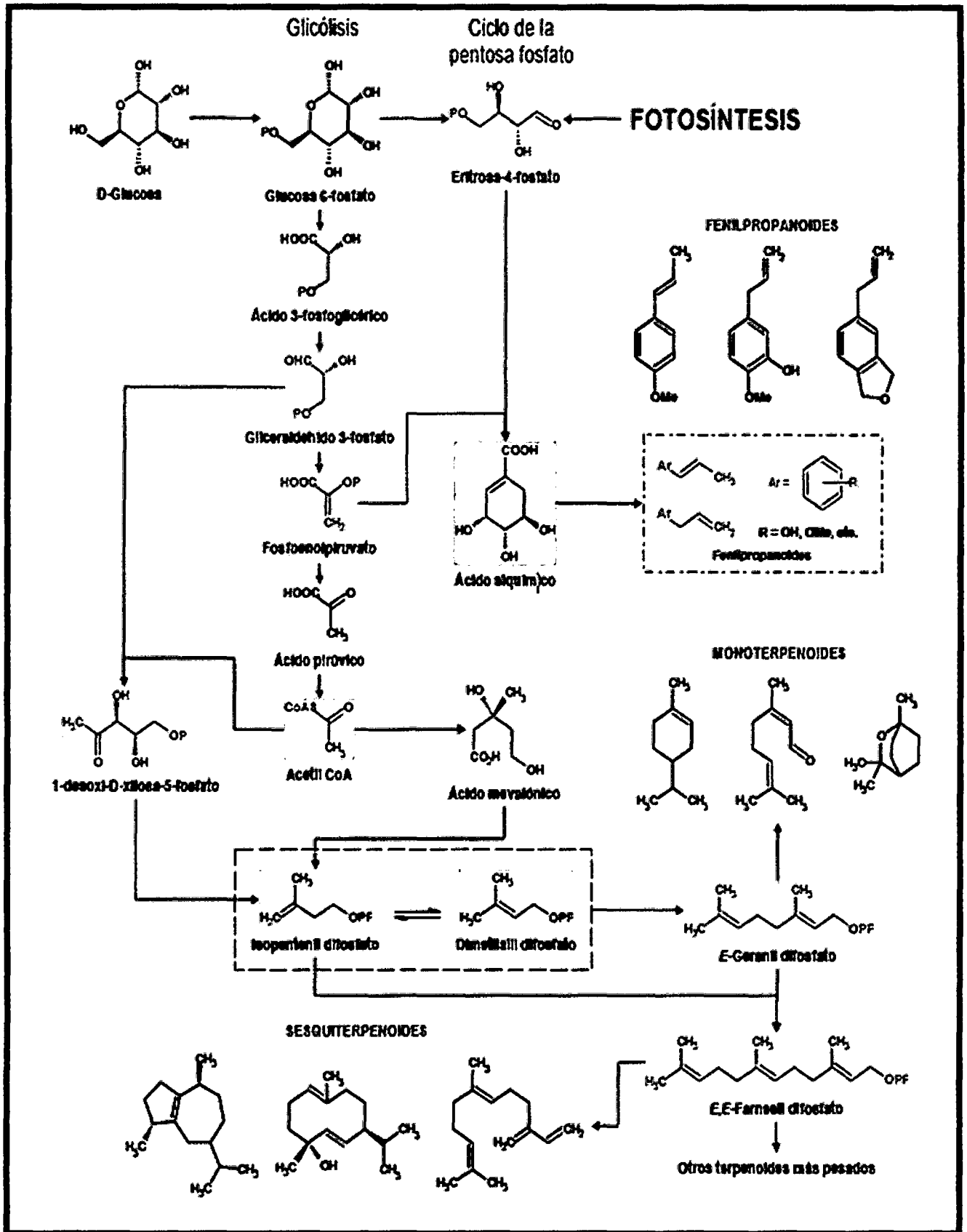


Figura 02. Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su relación con los metabolitos primarios (Vargas y Bottia, 2008).

Durante varios años se ha considerado que los metabolitos secundarios en las plantas son un material de desecho de las mismas. Sin embargo, se ha demostrado que éstos cumplen importantes funciones ecológicas en las plantas como agentes atrayentes de polinizadores, sustancias de reserva de la planta, regulan los procesos de evaporación de agua, hacen parte del mecanismo de defensa contra depredadores y otros vegetales (alelopatía) (Vargas y Bottia, 2008).

La distribución de los metabolitos secundarios dentro de los grupos de las plantas presenta algunas características particulares, entre las que cabe mencionar las siguientes (Vargas y Bottia, 2008).

- Una planta contiene una mezcla de metabolitos secundarios con cantidades variables en diferentes células, tejidos y órganos;
- En el organismo individual o de tejido, las cantidades y tipos de productos del metabolismo secundario varían con la edad o con las condiciones ambientales de la planta, y;
- Especies de géneros afines o familias de plantas pueden presentar los mismos metabolitos secundarios.

Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grupos más grandes de compuestos secundarios ampliamente presentes en el reino vegetal. Entre ellos, se encuentran los componentes de esencias, bálsamos y resinas. En las plantas, los isoprenoides pueden sintetizarse por dos rutas diferentes, a saber: la ruta del ácido mevalónico y/o la ruta de metileritriol fosfato (MEP).

Dependiendo del número de átomos de carbono, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos, C₁₀ (por ejemplo limoneno, mentol, timol, alcanfor), sesquiterpenos, C₁₅ (farnesol), diterpenos, C₂₀, etc, donde cada uno de ellos presenta

una función característica. Por ejemplo, los monoterpenos presentan acción antiséptica, o se emplean como expectorantes (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.3.2. Ubicación de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales se ubican en las diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, flores y frutos, así como también en diferentes órganos celulares. Es así como los aceites de menta y lavanda se localizan en pelos glandulares, mientras que el aceite de la pimienta se ubica en las células modificadas del parénquima. De igual forma, el aceite de rosa y jazmín se encuentra en las flores; el aceite de menta y eucalipto en las hojas; el alcanfor en los leños; el de los cítricos en los frutos; el aceite de almendras en las semillas y el aceite esencial de *Lippia alba* se encuentra principalmente en las hojas (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.4. Características químicas de los aceites esenciales

En cuanto a su composición química, los aceites esenciales contienen una buena proporción de hidrocarburos junto con compuestos oxigenados; tales como cetonas, alcoholes, acetatos, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, entre otros, los cuales prevalecen en las partes aéreas de las plantas, mientras que los hidrocarburos se concentran básicamente en las raíces. Presentan variación en la proporción de sus constituyentes, ya que en ocasiones se transforman unos en otros según la parte de la planta, el momento de su desarrollo o el momento del día de la recolección (Vargas y Bottia, 2008).






Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

- **No terpenoides.** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones (Escudero, 1999).

- **Terpenoides.** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.

Los terpenos derivan, de unidades de isopreno (C5) unidas en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Escudero, 1999).

Cuadro 05: Grupos funcionales de cada compuesto.

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol		Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído		Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona		Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster		Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	-C-O-C-	Cineol, ascanol	Expectorante, estimulante
Éter fenólico	Anillo-O-C	Safrol, anetol, miristicina	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol		Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico
Hidrocarburo	Sólo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante descongestionante antivirico, antitumoral

Fuente: Escudero, 1999.

Es característico de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos; sin embargo, no todas las esencias están compuestas exclusivamente por terpenos, existen algunas que carecen de éstos y están constituidas

por derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales, hasta por componentes difícilmente relacionados con las esencias, como alcaloides, glicósidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, aminas, sulfuros, etc. (Vargas y Bottia, 2008).

Existen diferentes factores que influyen sobre la composición química de un AE, entre ellos se pueden destacar los siguientes

- Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad;
- Método del cultivo: fertilizantes, abonos y pesticidas;
- Época de recolección y parte de la planta;
- Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento postcosecha;
- Modo de obtención del aceite: destilación (hidrodestilación, arrastre con vapor).
- Edad de la planta y su estado fenológico.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la modificación de la composición de los aceites esenciales, está relacionado con el momento oportuno para comenzar la cosecha del material vegetal, ya que existe un momento óptimo en cada órgano de la planta para una acumulación máxima de principios activos, que son función de su estado fenológico, y también puede deberse a variaciones durante el día.

2.2.5. Características físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos. Su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones). Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol. Son

liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua (Escudero, 1999).

2.2.6. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

- ✓ Los aceites esenciales se caracterizan por su olor pronunciado y penetrante, generalmente agradable, que siempre nos recuerda el olor del vegetal del que proviene, pero generalmente menos suave. Tienen sabor cáustico, acre e irritante y a veces aromático, dulce y delicado. Son sustancias de aspecto oleoso poco solubles o insolubles en el agua, a la que le comunican su aroma característico; soluble en alcohol absoluto, en el sulfuro de carbono, en éter de petróleo, en tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos, son volátiles y en su mayoría líquidos a la temperatura ambiente, en los aceites etéreos el punto de ebullición varía entre 150 y 300°C.
- ✓ En lo que respecta a la volatilidad, todos los perfumes son más o menos volátiles y el conocimiento de su grado de volatilidad es un factor de importancia, pues estas esencias no se preparan aisladas, sino en combinación con otras que deben tener las mismas características, tanto en la solubilidad como en la volatilidad (Vargas y Bottia, 2008;Bandoni, 2000).
- ✓ Si los aceites esenciales se dejan en contacto con el aire, se oxidan, solidifican y resinifican, perdiendo su olor característico, al igual que se alteran fácilmente bajo la acción de la luz, volviéndose amarillos y oscuros, modificándose asimismo su perfume. La acción del aire sobre estas sustancias, se debe a la transformación de los terpenos, razón por la cual se trata de eliminarlos por distintos procedimientos, obteniéndose entonces las esencias desterpenadas cuya solubilidad e inalterabilidad es mucho más grande (Vargas y Bottia, 2008; Bandoni, 2000).

- ✓ Las esencias se unen con facilidad a las grasas y a los aceites fijos a los que disuelve. Cuando se encuentran puros son incoloros, pero como siempre llevan disueltos ciertas impurezas afectan diversos colores así, son amarillos y pardos como el clavo aromático, azulados como el ajeno, la manzanilla y el cálamo o bien verdes como la bergamota y el cayeput. Arden fácilmente como llama fuliginosa (Bandoni, 2000).
- ✓ En algunos casos como consecuencia de la oxidación, llega a producir ácido carbónico, como por ejemplo la esencia de anís; otras veces ácido benzoico, como en la esencia de almendra y también ácido cinámico, como en el de canela (Bandoni, 2000).
- ✓ Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que se usa para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos (Vargas y Bottia, 2008; Bandoni, 2000).

2.3. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

2.3.1. Tratamiento post-cosecha

Una vez realizada la cosecha de las partes pertinentes del material vegetal, se deben llevar a cabo las siguientes labores (Guenther, 1948).

2.3.1.1. Limpieza: Se realiza tan pronto se recoge la cosecha, consiste en un lavado con agua fresca y limpia;

2.3.1.2. Selección: En esta parte se eliminan las partes vegetativas afectadas durante la cosecha o que presenten algún problema fitosanitario en alguno de sus órganos;

2.3.1.3. Secado: Es el proceso más importante en el tratamiento postcosecha, sus principales objetivos son (Guenther, 1948).

- ✓ Inhibir la destrucción enzimática, para evitar la descomposición del material vegetal.
- ✓ Estabilizar el color, el olor, el sabor, la textura y la composición química.
- ✓ Reducir fletes, costos de embalaje y almacenaje.
- ✓ Reducir tiempos y costos de destilación.

2.3.1.4. Empacado: El material vegetal previamente desecado, se empaca en sacos de polipropileno o fibra.

2.3.1.5. Almacenamiento: El material vegetal en fresco se almacena en cuartos fríos con temperaturas entre 2 y 40°C, mientras que el material vegetal deshidratado se almacena en lugares frescos y secos, protegido del sol y del agua. El contenido de humedad cuando el material está almacenado no debe ser mayor del 8 ó 10% (Guenther, 1948).

2.3.2. Métodos de obtención de aceites esenciales

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos, se pueden resumir de la siguiente forma:

Método	Procedimiento	Productos obtenidos
1. Métodos Directos	1.1. Extrusión. <ul style="list-style-type: none"> 1.1.1. Compresión de cascaras. 1.1.2. Raspado de cascaras. 	Aceites esenciales cítricos.
	1.2. Maceración. <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. Lesiones mecánicas en cortezas. 	Gomas, resinas, bálsamos.
2. Destilación	2.1. Directa.	Aceites esenciales y aguas aromáticas.
	2.2. Arrastre con vapor de agua (directo, indirecto, a presión, a vacío).	
	2.3. Destilación – maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente).	
2. Extracción con solventes	3.1. Solventes volátiles. <ul style="list-style-type: none"> 3.1.1. En caliente. 3.1.2. En frío. 	Infusiones y resionoides alcohólicos.
		Concretos y absolutos.
	3.2. Solventes fijos (grasas y aceites) <ul style="list-style-type: none"> 3.2.1. En caliente. 3.2.2. En frío. 	Absolutos de pomadas.
		Absolutos de enflorados.
4. Técnicas de vanguardia	4.1. Utilización de ultrasonidos en el proceso extractivo de Hidrodestilación.	
	4.2. Extracción por microondas.	
	4.3. Extracción con fluidos en estado supercrítico.	

Figura 03: Métodos de extracción de mezclas aromáticas (Albarracín, 2003)

2.3.2.1. Destilación

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la obtención de AE; industrialmente, la destilación se realiza en tres modos, a saber: destilación con agua o hidrodestilación, destilación con agua y vapor, y destilación con vapor directo. El esquema de un equipo básico para la obtención de aceites esenciales por destilación se observa en la figura 04.

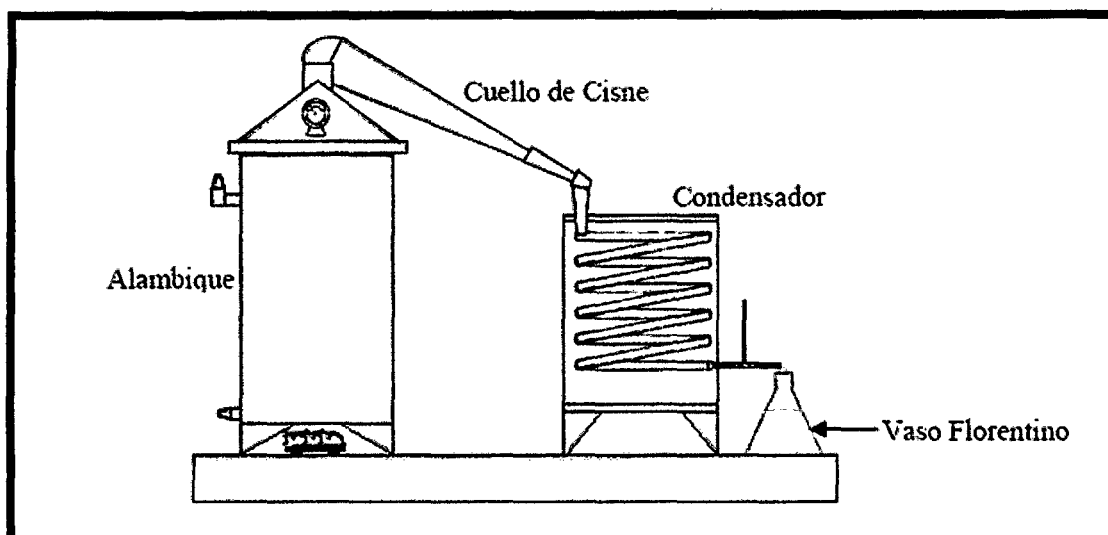


Figura 04: Principales partes de un equipo de extracción de aceites esenciales
(Vargas y Bottia, 2008).

- a) **Alambique:** Es el componente principal del equipo de destilación, puesto que el material vegetal se coloca en este sitio y se lleva a cabo el proceso de destilación. Las condiciones de operación, tales como presión, temperatura, flujo de vapor y altura del lecho de material vegetal son las variables del proceso más importantes a controlar (Vargas y Bottia, 2008).
- b) **Cuello de Cisne:** Es la parte más importante del equipo de destilación, porque comunica el alambique con el condensador. Algunos de los factores importantes a considerar durante su construcción son la forma y las dimensiones; ya que, deben reducirse al mínimo las posibilidades de re-condensación de vapores dentro del alambique y permitir su rápida transferencia al condensador del sistema.
- c) **Condensador:** Es parte del sistema, donde ocurre el cambio de estado de agregación, de gaseoso a líquido, de la mezcla de vapor de agua y aceite esencial. Entre los diferentes tipos de condensadores, el condensador de espiras es el más utilizado.

d) Recipiente recolector o Florentino: La mezcla líquida, agua y aceite esencial, que eluyen del condensador, se colectan en un recipiente conocido como vaso Florentino, en donde el aceite esencial se separa por decantación. El diseño del vaso Florentino depende de si el aceite esencial es más o menos denso que el agua

2.3.2.1.1. Destilación por arrastre con vapor de agua.

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias muy volátiles, por ejemplo las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

La destilación por arrastre con vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino (Vargas y Bottia, 2008).

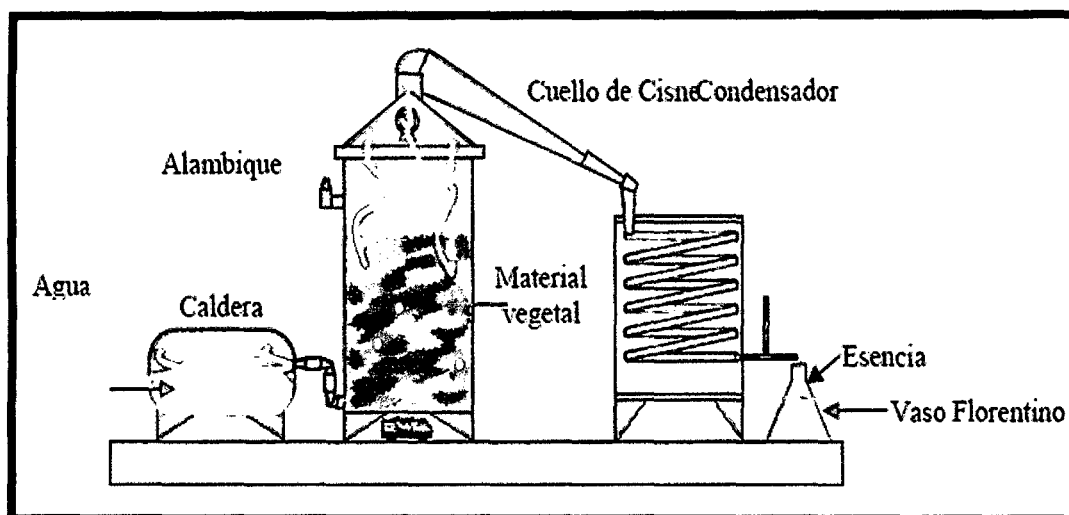


Figura 05: Método con arrastre de vapor (Vargas y Bottia, 2008).

2.3.2.1.2. Destilación con agua – vapor

En este caso el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro de la propia cámara extractora, aunque separado del material vegetal, la diferencia radical existente entre este sistema y los anteriormente mencionados es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido (Albarracín, 2003).

Estos procesos de destilación como tal no tienen una diferencia fundamental desde el punto de vista teórico, sin embargo existen ciertas variaciones en la práctica y en los resultados obtenidos que en muchos casos son considerables, esto depende del método empleado porque ciertas reacciones pueden ocurrir durante la destilación (Albarracín, 2003). Los principales efectos que acompañan estos procesos son:

- ✓ Difusión del aceite esencial y del agua caliente a través de las membranas de la planta.
- ✓ Hidrólisis de ciertos componentes del aceite esencial.
- ✓ Descomposición ocasionada por el calor (Albarracín, 2003).

En la destilación por arrastre con vapor, los componentes volátiles son retenidos por las membranas si estas se encuentran secas (material vegetal seco) lo que hace necesario un remojo del material, esto se logra con la condición de vapor saturado. Diferentes condiciones son logradas si el material se remoja con agua fría o caliente además, entran en juego factores como la solubilidad y las temperaturas (Albarracín, 2003).

En la presencia de agua y particularmente a altas temperaturas pueden ocurrir reacciones que favorecen la formación de compuestos, como alcoholes y ácidos por descomposición de los ésteres, causantes de una disminución en la producción del aceite, esta es una de las desventajas de la hidrodestilación pues por la cantidad de agua presente puede producirse mayor hidrólisis. En el caso de la destilación agua vapor, el grado de hidrólisis es mucho menor y lo es aún menos en la destilación por arrastre con vapor de agua (Albarracín, 2003).

Prácticamente todos los constituyentes de los aceites esenciales son algo inestables a altas temperaturas; Para obtener la mejor calidad del aceite es necesario asegurar que durante la destilación haya una baja temperatura o si es del caso tener altas temperaturas durante el menor tiempo posible. En el caso de la hidrodestilación o la destilación agua- vapor la temperatura es determinada por la presión de operación; En la destilación por arrastre con vapor de agua la temperatura puede ser cercana a 100 °C dependiendo de si es usado vapor saturado a baja presión o vapor sobrecalentado (Albarracín, 2003).

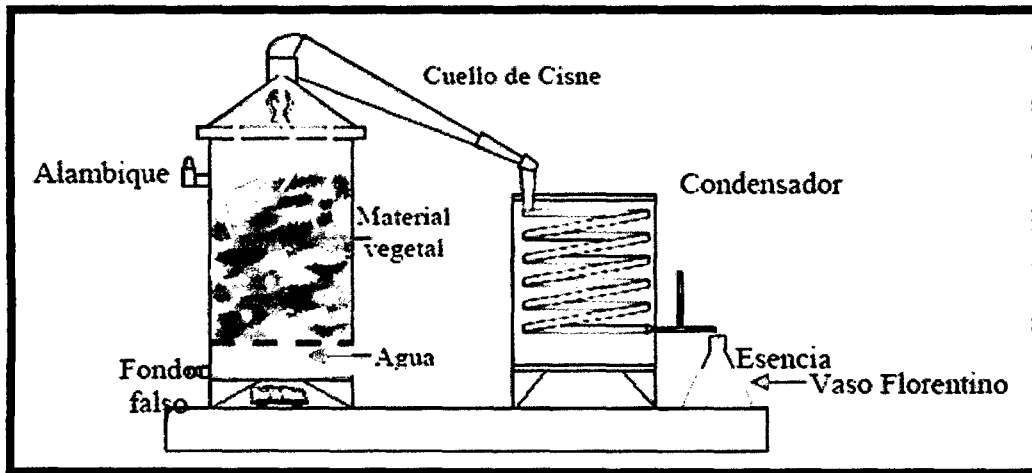


Figura 06: Método de destilación con agua (Vargas y Bottia, 2008).

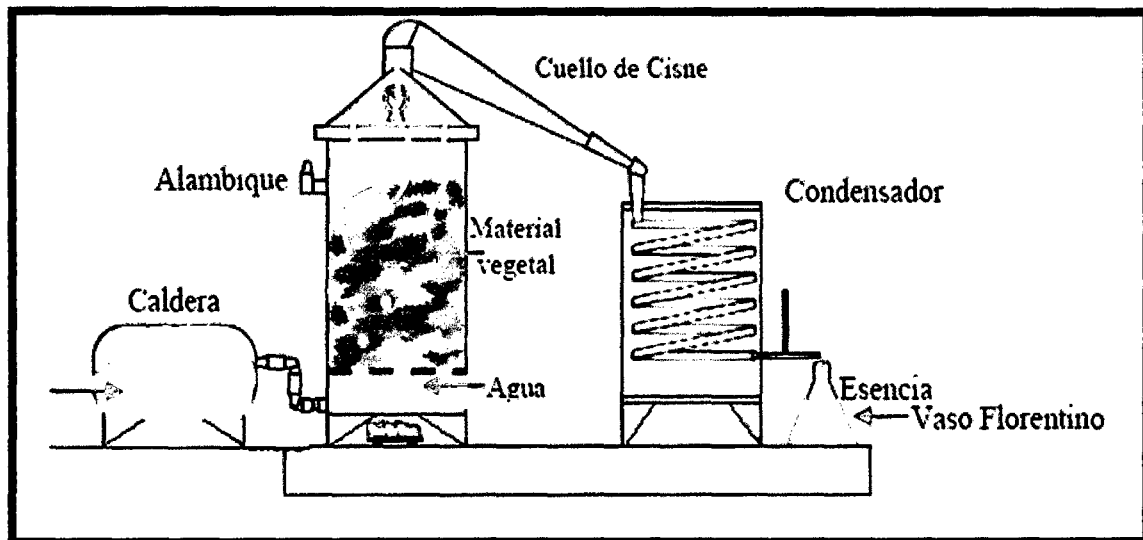


Figura 07: Destilación mixta (Vargas y Bottia, 2008).

2.3.3. Análisis y control de calidad de los aceites esenciales

El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posea determinadas características analíticas y que éstas se mantengan de un lote de producción a otro. A través de un análisis se puede evaluar (Albarracín, 2003).

- ✓ El cumplimiento con normas de calidad.
- ✓ La detección de adulteraciones: por ejemplo el agregado de diluyentes, u otros casos como el agregado de mentol a esencias naturales de mentas, o el de terpenos críticos a la esencia de limón.

- ✓ Discriminación de calidades: como puede ser diferenciar una esencia de Geranio de Reunión de una de origen africano.
- ✓ Normalización de calidades: como la estandarización de una esencia de menta por mezclado de distintas partidas con diferentes calidades.
- ✓ Determinación de que el producto es realmente natural (Albarracín, 2003).

Las características estudiadas deben ser suficientemente descriptivas del producto para que permitan detectar aquellas desviaciones que se consideren suficientes para rechazar el lote.

Se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una muestra se comparan con los establecidos en la correspondiente norma, que habrá sido dictada por algún organismo de normalización o, en su defecto, por el propio interesado (Albarracín, 2003).

Cuadro 06: Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales.

Descripción	Parámetros
Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia • Textura
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Miscibilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación • Rango de destilación
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de éster • Índice de saponificación • Índice de acetilo • Índice de fenoles
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico por CG • Cuantificación de los principales Componentes • Índices de retención • Identificación por GC-MS

Fuente: Santander, 2007.

2.3.3.1. Características organolépticas

Las características a tener en cuenta en este apartado son el olor, el color, y la apariencia.

El primero de ellos reviste especial importancia, ya que muchos usos de los aceites esenciales se relacionan con el olor (Albarracín, 2003).

2.3.3.2. Características físicas

Se trata principalmente de la determinación de constantes físicas, entre las que se destacan la densidad, el índice de refracción y el poder rotatorio.

2.3.3.2.1. Densidad: La determinación de la densidad permite, algunas veces, hacer ciertas deducciones acerca de la composición de las esencias. Así, los aceites esenciales que presentan densidades menores de 0.9 g/cm³ son ricos en hidrocarburos, alcoholes, ésteres y cetonas, algunos ejemplos son los aceites esenciales de naranja, limón, romero, trementina y coriandro, entre otros. Por otra parte, aquellos aceites que tienen densidades mayores de 1.0 g/cm³ contienen principalmente fenoles o sus derivados y ciertos ésteres aromáticos, por ejemplo, los aceites esenciales de anís, canela, clavo, mostaza, etc. (Santander, 2007).

La densidad de un AE no es constante porque depende de la planta de la cual se obtuvo, del método de extracción, purificación, tiempo y modo de almacenamiento.

2.3.3.2.2. Rotación óptica: En general, el valor del poder rotatorio no permite hacer deducciones sobre la composición de una esencia; sin embargo, esta medición no debe omitirse, ya que sirve para juzgar sobre el grado de pureza del aceite esencial y para detectar algunas adulteraciones con sustancias inactivas como el alcohol, o con sustancias de poder rotatorio diferente del aceite examinado (Santander, 2007).

2.3.3.2.3. Índice de refracción: Su valor para la mayoría de aceites esenciales es relativamente cercano y varía entre 1.43 y 1.61 a 20°C. En general, los aceites esenciales que presentan índices de refracción menores de 1.47, poseen un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Por el contrario, un índice de refracción mayor de 1.47, indica la posible presencia de compuestos alifáticos oxigenados en la esencia. En algunos casos, esta determinación puede revelar la presencia de impurezas (Santander, 2007).

2.3.3.2.4. Solubilidad en etanol: La solubilidad de las esencias en alcohol da una idea de su contenido en mono terpenos: cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de éstos en la esencia, o mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles. Es además, un método muy sencillo para detectar adulteraciones provocadas por el agregado de aceites vegetales o minerales, que son insolubles en alcohol (Santander, 2007).

2.3.3.3. Características químicas

2.3.3.3.1. Índice de acidez: Se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para neutralizar la acidez contenida en un gramo de aceite esencial (Albarracín, 2003).

2.3.3.3.2. Índice de éster: Se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para saponificar los ésteres contenidos en un gramo de aceite esencial (Albarracín, 2003).

2.3.3.3.3. Índice de saponificación: Es la suma de los dos índices anteriores (Albarracín, 2003).

2.3.3.3.4. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que nos permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. El cromatógrafo se completa con un sistema de inyección, que nos permite introducir la muestra en la columna y un detector que muestra las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar:

están constituidas por un tubo de cuarzo flexible de diámetro pequeño (normalmente 0.25 mm) y largo (25 a 60 m, hasta 200 m); proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponentes de sustancias de diversa polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.) (Albarracín, 2003).

Para la identificación de los componentes del aceite esencial mediante CG se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico) con los de los patrones. Sin embargo, los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño de equipo, etc. Por este motivo ha sido necesaria la introducción de parámetros relativos como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención. La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial (Albarracín, 2003).

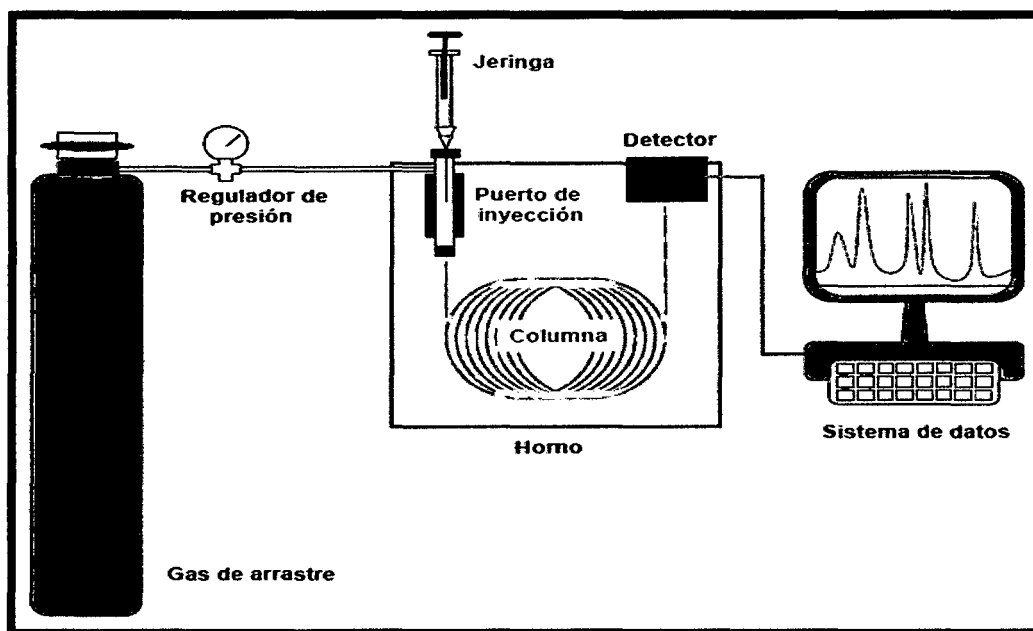


Figura 08: Esquema general de un cromatógrafo de gases (Vargas y Bottia, 2008).

2.3.3.4. Características biológicas de los aceites esenciales

2.3.3.4.1. Actividad antioxidante

Los actuales estudios revelan los problemas de salud asociados con la acumulación de radicales libres en el organismo, así como la utilización de antioxidantes sintéticos en productos alimentarios como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y nitrito sódico; pueden conducir al deterioro y muerte celular, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, cataratas y algunos tipos de cáncer (Cordona, 2009).

El mecanismo por el que los radicales libres producen sus efectos transcurre mediante una reacción radicalaria, en la que se forman especies reactivas oxigenadas, que son los que producen los efectos nocivos. Este proceso se ve favorecido por la presencia de oxígeno y de luz ultravioleta, que inicia la formación de radicales libres.

La utilización de antirradicales permite que no se produzcan las especies reactivas oxigenadas (por esto, también se les suele llamar antioxidantes), de forma que se impiden las consecuencias de su actividad. Estos antirradicales actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres. Impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres (Etherton, et al, 2002).

La reducción de la disponibilidad de vitaminas A, D, E y C debida a la disminución de la solubilidad de las proteínas y la oxidación de las vitaminas A, β -caroteno y ácido ascórbico, es consecuencia de los complejos mecanismos de oxidación lipídica. Gran cantidad de antioxidantes naturales han sido extraídos de diferentes especies de plantas. Entre estos antioxidantes naturales los fenólicos ocupan un sitio de importancia, toda vez que se hallan ampliamente distribuidos en el reino vegetal como fenoles simples, ácidos fenólicos, derivados de ácido hidroxicinámico, y flavonoides.

Todas las clases de compuestos fenólicos tienen el requerimiento estructural de recolectar radicales libres y tienen potencial como antioxidantes en alimentos. Compuestos fenólicos como el ácido carnósico, ácido rosmarínico y los flavonoides, han demostrado en innumerables ensayos ser más potentes antioxidantes que el butil hidroxil anisol BHA, butil hidroxil tolueno BHT y otros antioxidantes sintéticos. Muchas preparaciones y extractos antioxidantes obtenidos de especias de la familia Labiatae (romero, orégano, salvia, timo, entre otros) han sido desarrollados, evaluados y aplicados en diversos alimentos, bebidas, cosméticos y preparaciones farmacéuticas (Cordona, 2009).

2.3.3.4.2. Actividad antimicrobiana

Los productos de las plantas, poseen numerosas propiedades farmacológicas, incluyendo además otras propiedades como antimicrobianas, antimutagénicas, antivirales, antimicóticas, antitoxigénicas, antiparasitarias e insecticidas, además son utilizados en el tratamiento de forúnculos, del acné, de la gingivitis, de la candidiasis vaginal y para evitar la formación de placa dental y la habilidad de promover la cicatrización de heridas (Chen et al., 2003). Una de las principales fuentes de agentes antimicrobianos son los metabolitos secundarios de las plantas. La biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nematodos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran las flavanonas, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Concepción et al., 2010).

La acción antimicrobiana de los componentes de los extractos vegetales y de los aceites esenciales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales. La actividad de los

componentes de los aceites esenciales en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos (Concepción et al., 2010).

Los extractos de las plantas son muy populares en algunos países, las drogas son usadas para el tratamiento de diversos padecimientos como la hiperplasia prostática benigna sintomática (BPH) y las infecciones de las vías urinarias (Concepción et al., 2010). La presencia de compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y el eugenol sugieren la actividad bactericida de los extractos de orégano (*Lippia graveolens*), del tomillo (*Thymus vulgaris*), y del clavo (*Syzygium aromaticum*), la cual se ve favorecida por la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente de hidrógeno con un sitio activo enzimático (Chen et al., 2003).

Así, los aceites esenciales con fenol como componente principal expresan el más alto espectro de actividad en contra de los microorganismos, y su espectro de actividad es el mayor. Se incluyen los aceites esenciales de tomillo, orégano que contienen timol y carvacrol así como el aceite de clavo que contiene eugenol. Los laboratorios a nivel mundial han encontrado literalmente cientos de fitoquímicos los cuales tienen efectos inhibitorios sobre todos los microorganismos *in vitro*, propiedades antioxidantes y quimiopreventivas entre muchas otras (Chen et al., 2003; Concepción et al., 2010).

Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”. Por otro lado varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos (Concepción et al., 2010).

Sin embargo, el mecanismo de acción específico de estos compuestos todavía no ha sido elucidado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana (Concepción, et al, 2010).

Es de mencionar también que en la actualidad la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene el ímpetu en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles actualmente (Concepción et al., 2010).

2.3.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En varios laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas. Incluye un método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona correlacionada con la determinación de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

El método que actualmente recomienda el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad de la National Committee for Clinical Laboratory Standards está basado en el método originalmente descrito por Bauer et al., . Este es el método de difusión

en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

2.3.4.1. Método Kirby-Bauer

El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas (Cantón, et al., 2000).

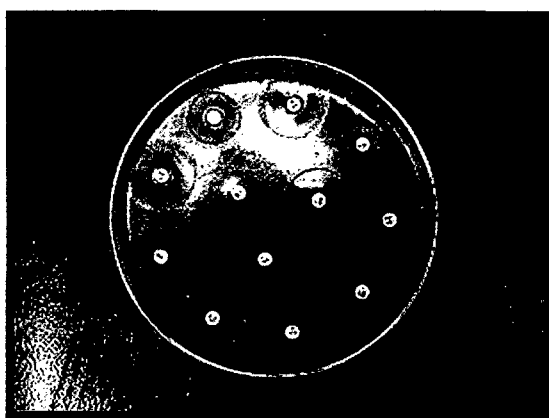


Figura 09: Test de Kirby-Bauer (NCCLS, 2002).

2.3.4.1.1. Forma de aplicación

Sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma pareja para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antibióticos a probar depende del germen y del foco de infección. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante 18-24 horas a 37 °C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico, dando halos

irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R) (Cantón, et al., 2000).

2.3.4.1.2. Comportamiento de inhibición

El tamaño del halo de inhibición de desarrollo variará en base a los siguientes parámetros o variables (Cantón, et al., 2000).

1. La concentración de la droga.
2. Sensibilidad bacteriana.
3. Coeficiente de difusión de la droga en el agar.
4. Tiempo y temperatura de incubación.
5. pH y composición del medio. Se usan preparados comerciales que den resultados reproducibles, por ejemplo: agar Müller-Hinton. Son cultivos aceptados por el comité de la OMS para la normalización de las pruebas de susceptibilidad.
6. Profundidad del medio en las placas. Esto está estandarizado: se emplean placas de 9 cm de diámetro, y se agrega siempre el mismo volumen de medio de cultivo: 15 ml por placa. De esta manera las placas poseen siempre la misma altura de agar.
7. Tamaño del inóculo. Debe estar estandarizado ya que si éste es muy pequeño dará una sensibilidad mayor a la real, y si el inóculo es muy denso pueden aparecer mutantes resistentes.

En los métodos de difusión de mutantes resistentes aparecen como colonias aisladas dentro del halo de inhibición, por lo tanto esto indica que no se puede usar ese antibiótico y se debe informar como resistente. La forma rigurosa de estandarizar un inóculo es normalizando la turbidez por un método fotométrico utilizando una suspensión de sulfato de bario como estándar, según la escala de Mac Farland.

2.3.4.2. Interpretación de los resultados de la prueba de difusión en disco

Existen tablas específicas NCCLS las que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente los niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos.

Las tablas NCCLS utilizadas deben ser las vigentes, ya que son periódicamente publicadas y pueden contener variaciones (NCCLS, 2002).

2.3.4.2.1. Sensible

La categoría "sensible" implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

2.3.4.2.2. Intermedio

La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con un CIM que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedia" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y β -lactámicos en orina) o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. β -lactámicos).

2.3.4.2.3. Resistente

Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CIM que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.

Cuadro 07: Interpretación de resultados de la prueba de difusión en agar.

Categoría	Diámetro (mm)
Sensible	$\geq 15\text{mm}$
Intermedio	11 – 14 mm
Resistente	$\leq 10\text{mm}$

(NCCLS, 2002).

2.3.5. Toxiinfecciones alimentarias

Los microorganismos, y en concreto las bacterias, son la principal causa de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados. Se habla de cómo evitar su presencia, de sus consecuencias sanitarias y socioeconómicas, pero a menudo no se conocen lo suficiente (Doyle et al., 2001).

El diagnóstico más frecuente es el de toxiinfección alimentaria; diferenciándose entre infección, si el trastorno lo origina un alimento o agua contaminados con microorganismos (salmonelosis, Shigelosis, etc.) o intoxicación, si se debe a las toxinas producidas por los gérmenes presentes en el alimento (botulismo, salmonelosis, estafilococia...) (Doyle et al., 2001).

Todos los alimentos son, por su propia composición, perecederos, o lo que es lo mismo, de duración limitada. Pueden alterarse o deteriorarse más o menos rápidamente en función de las condiciones de producción, obtención (recolección, sacrificio),

transporte, transformación o elaboración, conservación, etc. Si descuidamos alguno de estos pasos intermedios hasta el consumo de los alimentos, éstos pueden ser causa de riesgos o de trastornos para la salud (Doyle et al, 2001).

Si el alimento está contaminado por bacterias, en la mayoría de los casos y en los primeros estadios de la alteración, no se modifican sus propiedades organolépticas (olor, color y textura), constituyendo un mayor riesgo para la salud, que hemos de prevenir con una práctica culinaria y de conservación de alimentos suficientemente higiénica. Una vez que los alimentos se han contaminado, los microorganismos comienzan a multiplicarse en ellos, y sólo un tratamiento térmico adecuado es capaz de destruirlos a los microorganismos y a sus toxinas. La cocción, el asado y la fritura suficientes aseguran la destrucción de los gérmenes. Sin embargo, la refrigeración y la congelación, únicamente detienen el crecimiento de éstos, no los destruyen (Doyle et al., 2001).

2.3.5.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado, es una bacteria anaerobia facultativa grampositiva productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, que no infectadas, por ella (Doyle et al., 2001).

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus*

o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (Doyle. et al., 2001).

En la actualidad, este microorganismo se rige como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado, o incluso, con otro paciente (Doyle, et al, 2001).

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos más eficaces para combatirlos los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina.

2.3.5.1.1. Morfología

El *Staphylococcus aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo grampositivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos (Doyle et al., 2001).

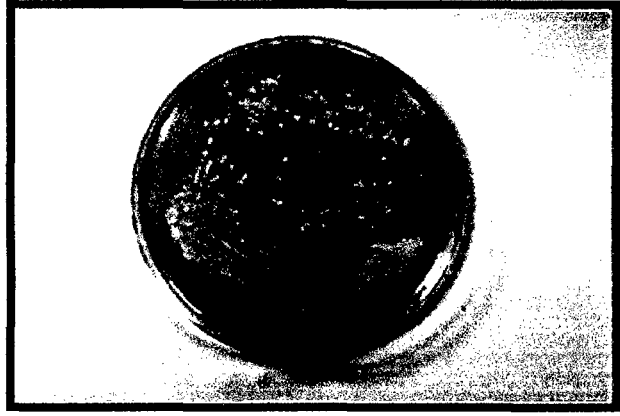


Figura 10: *Staphylococcus aureus* (Richardson, et al., 2008).

2.3.5.1.2. Toxiinfección por ingesta de alimentos contaminados por *S. aureus*

Staphylococcus aureus es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo (Doyle et al., 2001).

Infección de piel y partes blandas. Neumonía, sialadenitis, sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados), orzuelos. Enfermedades por toxinas (síndrome de piel escaldada por estafilococo, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis). Infecciones en el glande (Flores y Ponce, 2005).

La enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus* que contamina y se desarrolla en el alimento.

Generalmente ocurre en brotes, predominantemente en verano, y el organismo responsable es generalmente aislado de personas involucradas en la preparación del alimento (Doyle, et al, 2001).

La incidencia es desconocida pero es probablemente una de las causas de enfermedad transmitida por alimentos más frecuentes. Entre los alimentos implicados contaminados más frecuentemente se encuentran: ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas heladas (Flores y Ponce, 2005).

2.3.5.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria que causa envenenamiento por consumo, es un bacilo de tamaño grande que forma esporas, es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza y en los alimentos. Para que se evidencien los síntomas deben ingerirse cantidades muy elevadas de esta bacteria que, una vez en el tracto intestinal, libera una toxina (hexoenterotoxina) provocando una gastroenteritis. Su periodo de incubación puede ser corto, y produce una intoxicación similar a la causada por estafilococos, con náuseas y vómitos, o un cuadro de tipo diarreico. Haciendo justicia a su nombre, se lo relaciona principalmente con postres de pastelería, arroz hervido o frito y productos a base de cereales como pasta (Doyle et al., 2001).

2.3.5.2.1. Morfología

Bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil. La espora es ovoidea, central y no deformante. Hidroliza la lecitina de la yema del huevo y no fermenta el manitol. Temperatura optima 30°C a 37°C, su temperatura de crecimiento 5°C a 55°C y temperatura de germinación 5°C a 8°C. Su pH optimo 4.5 a 9.3, Aw 0.95 y su Concentración de sal 7.5% (Doyle et al., 2001).

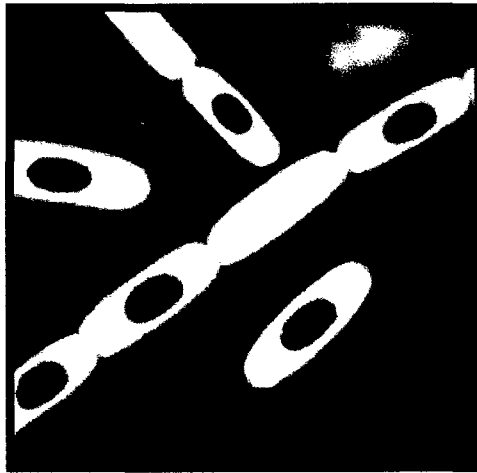


Figura 11: *Bacillus cereus* (Doyle, et al., 2001).

2.3.5.2.2. Intoxicación por ingesta de alimentos contaminados con *B. cereus*

Produce dos tipos de enterotoxina: vomitoxina (cereulida, termoestable) y diarreogénica (termolábil). Algunas cepas tienen capacidad para producir los dos tipos de toxina.

La distribución es universal. Está ampliamente distribuido en la naturaleza (suelo, plantas). Es frecuente la contaminación cruzada de la carne, leche y derivados. La aportación asintomática en el hombre tiene un rango del 13-43 %. La transmisión es fundamentalmente por alimentos conservados a temperatura ambiente luego de su cocción. Los alimentos asociados a brotes son el arroz, carne contaminada, salsa de vainilla (Flores y Ponce, 2005).

2.3.5.3. *Salmonella* spp.

2.3.5.3.1. Morfología

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi*) ni esporas.

Son bacterias móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H₂S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa

Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesado de alimentos o en el hogar, también por vía sexual (Doyle. et al., 2001).

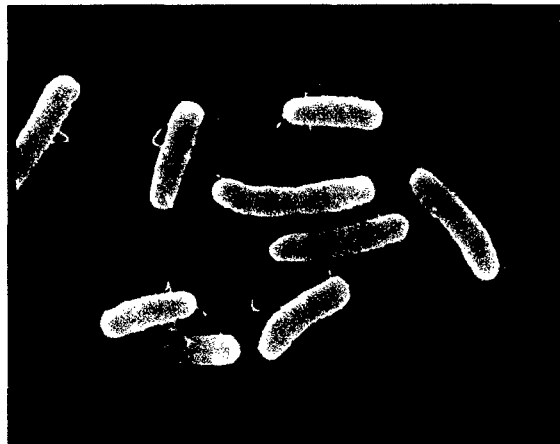


Figura 12: *Salmonella spp.* (Doyle, et al., 2001).

2.3.5.3.2. Intoxicación por ingesta de alimentos contaminados por *Salmonella spp.*

La salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, en especial por alimentos de origen animal y pueden aparecer en brotes en escuelas, guarderías, restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general entre 12 a 36 horas, a veces hasta 6 y 48 horas (Doyle et al., 2001).

En el caso de la *Salmonella*, es necesaria una inoculación relativamente grande, entre 10 a 100 millones de organismos, para provocar los síntomas en humanos saludables, según estudios hechos con voluntarios, al ser estas bacterias muy poco resistentes a los medios ácidos. Sin embargo, un pH estomacal artificialmente elevado, poco ácido, reduce enormemente el número de organismos necesario para provocar síntomas (de 10 a 100 órdenes de magnitud) (Doyle et al., 2001)

Salmonella habita normalmente en la superficie de los huevos, la piel de tomates y de aquellos frutos y verduras que tienen contacto con la tierra.

La fiebre tifoidea es otra de las enfermedades que pueden ser ocasionadas por bacterias del género *Salmonella*. Habitualmente esta enfermedad está provocada por cepas de *Salmonella enterica* susp. *enterica* serotipo Typhi (*Salmonella Typhi*). El único reservorio de la *Salmonella* Typhi es el hombre, de modo que se transmite de una persona a otra (Doyle, et al, 2001) y (Flores y Ponce, 2005).

2.3.5.4. *Escherichia coli*

2.3.5.4.1. Morfología

Escherichia coli, en su hábitat natural, vive en los intestinos de la mayor parte de los mamíferos sanos. Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. En individuos sanos, es decir, si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes (Doyle, et al, 2001).



Figura 13: *Escherichia coli* (Doyle, et al., 2001).

2.3.5.4.2. Intoxicación por ingesta de alimentos contaminados por *E. coli*

La salmonelosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, en especial por alimentos de origen animal y pueden aparecer en brotes en escuelas, guarderías,

restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general entre 12 a 36 horas, a veces hasta 6 y 48 horas (Doyle, et al, 2001).

En el caso de la *Salmonella*, es necesaria una inoculación relativamente grande, entre 10 a 100 millones de organismos, para provocar los síntomas en humanos saludables, según estudios hechos con voluntarios, al ser estas bacterias muy poco resistentes a los medios ácidos. Sin embargo, un pH estomacal artificialmente elevado, poco ácido, reduce enormemente el número de organismos necesario para provocar síntomas (de 10 a 100 órdenes de magnitud) (Doyle, et al, 2001).

La *Salmonella* habita normalmente en la superficie de los huevos, la piel de tomates y de aquellos frutos y verduras que tienen contacto con la tierra.

La fiebre tifoidea es otra de las enfermedades que pueden ser ocasionadas por bacterias del género *Salmonella*. Habitualmente esta enfermedad está provocada por cepas de *Salmonella enterica* susp. *enterica* serotipo Typhi (*Salmonella Typhi*). El único reservorio de la *Salmonella Typhi* es el hombre, de modo que se transmite de una persona a otra (Flores y Ponce, 2005).

2.4. ENCAPSULAMIENTO DE ACEITE ESENCIAL

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno (Shahidi, 1993). Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se liberará gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y

se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales.

Las microcápsulas han sido también barreras contra malos olores y sabores; las microcápsulas ayudan a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaado mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos. En la encapsulación de sabores, se reduce su volatilidad o previene reacciones indeseables con otros componentes del alimento aún cuando se almacene por un período prolongado (Shahidi, 1993;(Risch, 1998).

2.4.1. Maltodextrinas

Las maltodextrinas son obtenidas a partir de una hidrólisis parcial del almidón de maíz por vía ácida o enzimática (Yáñez et al., 2008).

Los polímeros de glucosa producidos pueden variar en longitud y en peso molecular. Sus viscosidades son inferiores a las de la goma arábiga y no presentan grupos lipofílicos, por lo que sus propiedades emulsificantes son pobres.

Sus ventajas incluyen sabor tenue, es posible su uso a altas concentraciones de sólidos y mejoran la vida de almacenamiento de aceites esenciales. Mezclas de sólidos de maíz, maltodextrinas y almidones modificados permiten un encapsulamiento óptimo.

Desarrollos recientes se han hecho con nuevos acarreadores, incluyendo coloides y gomas naturales, para la obtención de mezclas que permitan incrementar la retención de compuestos volátiles y la vida de anaquel de las microcápsulas. Se ha conseguido la retención de aceites esenciales de naranja y disminuido su oxidación al usar goma arábiga (Yáñez et al., 2008).

2.4.2. Métodos de Liberación

Los mecanismos de liberación de las cápsulas se pueden llevar a cabo por una disolución normal en agua, por esfuerzos de cizalla, por temperatura, por reacciones

químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. La liberación de componentes de una cápsula puede ser controlada por difusión de la pared de la cápsula o por una membrana que cubre la pared. La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad del componente de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión (Yáñez et al., 2008).

El compuesto que va a difundir debe ser soluble en la matriz. Aunque la presión de vapor de sustancias volátiles en cada lado de la matriz puede ser la fuerza que determine la difusión.

La selección de una matriz o membrana es importante. La naturaleza química, morfología y temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento también influyen en la difusión de la membrana aunque pueden disminuir la velocidad de liberación (Yáñez et al., 2008).

2.4.3. Aplicaciones de encapsulación en la industria de alimentos

Las aplicaciones de esta técnica han ido incrementándose en la industria de los alimentos debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. La microencapsulación puede mejorar el sabor y la estabilidad (Yáñez et al., 2008).

Las microcápsulas han sido también barreras contra malos olores y sabores. Las microcápsulas ayudan a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos (Yáñez et al., 2008).

En la encapsulación de sabores, se reduce su volatilidad o previene reacciones indeseables con otros componentes del alimento aun cuando se almacene por un periodo prolongado. Cuando se encapsula un sabor, para que sea liberado rápida y efectivamente

en la boca, se recomienda utilizar materiales solubles en agua como almidones y dextrinas (Yáñez et al., 2008).

2.4.4. Aplicación de los aceite esenciales

Los aceites esenciales tienen un rango de aplicaciones muy amplio. Éstos se usan en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y química, siendo incorporados en productos de consumo, jarabes, bebidas no alcohólicas, aderezos, mermeladas etc., o de uso externo, cremas, perfumes, jabones, geles; como saborizantes, aromatizantes y enmascarante de olores (Vargas y Bottia, 2008).

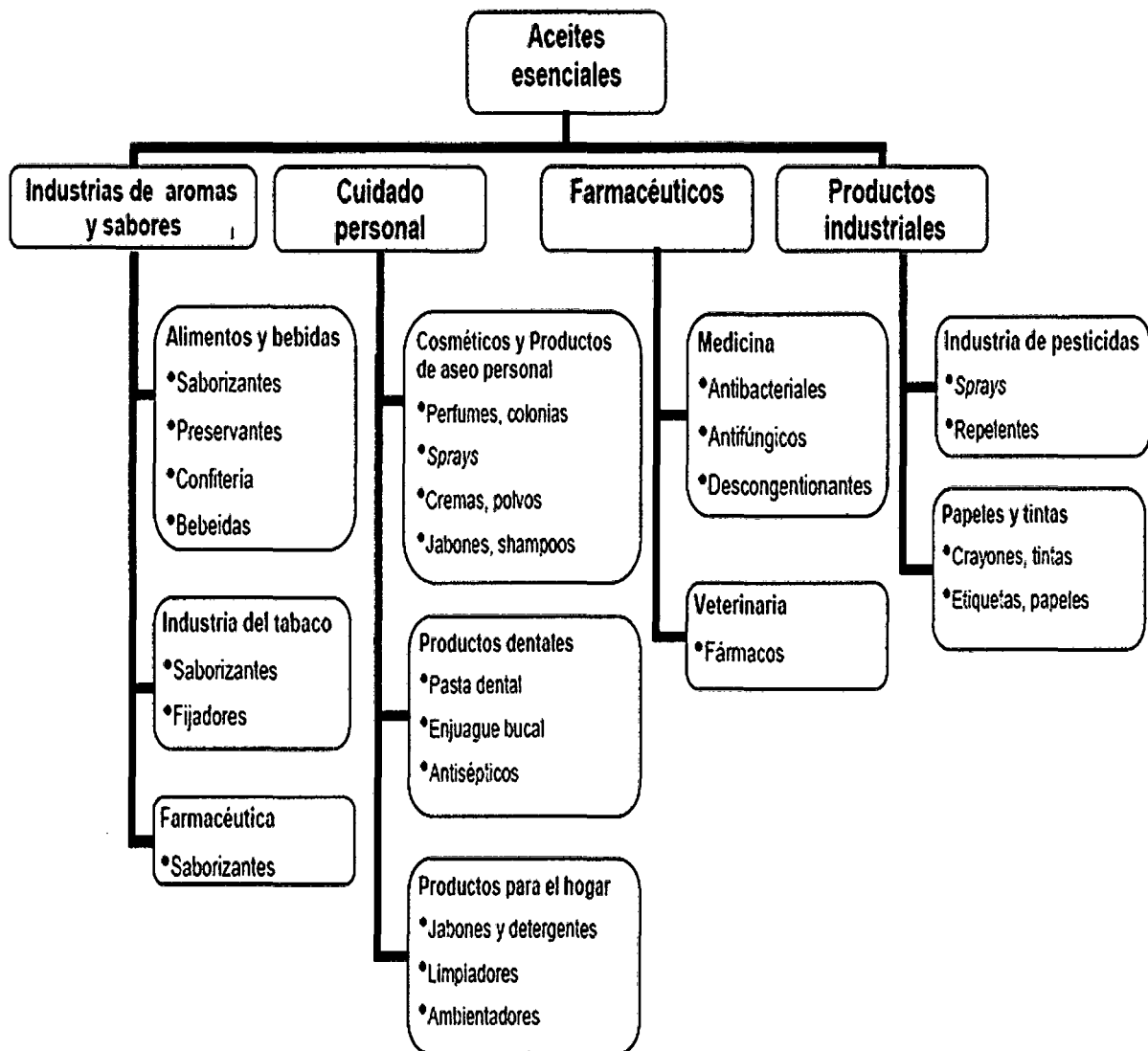


Figura 14: Aplicacion de los aceites esenciales (Vargas y Bottia, 2008).

Las aplicaciones industriales y terapéuticas de los aceites esenciales dependen principalmente de su composición química, calidad, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica y propiedades organolépticas, así como del grado de refinamiento de la esencia. Por tal motivo, resulta de vital importancia realizar controles de calidad a los AE y estudiar su composición en función de condiciones geobotánicas de su cultivo (Vargas y Bottia, 2008).

Desde la antigüedad, las especies aromáticas y sus aceites esenciales se han empleado en preparaciones culinarias no sólo como agentes saborizantes y aromatizantes, sino también como conservantes naturales. Como conservantes en alimentos y otros productos, los aceites esenciales pueden detener, prevenir o inhibir el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros microorganismos (Vargas y Bottia, 2008).

De esta manera, y debido a la creciente presión de los consumidores, actualmente, las industrias de alimentos y cosméticos han disminuido el uso de conservantes sintéticos en sus productos, reemplazándolos por sustancias de origen natural. Por tal motivo, el conocimiento de las actividades antimicrobianas, antioxidantes y citotóxicas son importantes para la aplicación de los aceites esenciales en las diferentes industrias (Vargas y Bottia, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

En la obtención de aceite esencial se utilizó *Salvia officinalis* variedad *alba*, proveniente de la zona de Socllaccasa, ubicada a 3900 msnm, en la provincia de Abancay departamento de Apurímac; esta materia prima crece de forma silvestre y fue cosechada en el mes de marzo como planta florecida, secada en la sombra y sin raíz.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Análisis químico proximal de *Salvia officinalis* variedad *alba*.

3.2.1.1 Equipo utilizado

- Estufa eléctrica; Marca Memmert; Tipo U2S.
- Mufla; Marca Thermolyne; Modelo FB1810M.
- Equipo soxhlet.
- Equipo kjeldahl.

3.2.1.2. Materiales

- Matraz erlenmeyer.
- Vaso precipitado.
- Tubos de ensayo.
- Fiolas.
- Pinzas.
- Papel filtro.

3.2.1.3. Reactivos:

- Ácido bórico.
- Ácido clorhídrico.
- Indicador rojo de metilo.
- Hexano.

- Agua destilada.

3.2.2. Extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

3.2.2.1 Equipo utilizado

- Unidad de destilación discontinua por corriente de vapor, automatizada, para la extracción de aceites esenciales de yerbas officinalis. Mod. UDCA-2/EV (Ver Figura 16)

3.2.2.2. Materiales

- Vaso precipitado
- Pera decantadora.
- Frasco color ámbar.
- Jarra medidor.
- Papel aluminio.

3.2.2.3. Reactivos:

- Sulfato de sodio.

3.2.3. Análisis fisicoquímico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

3.2.3.1 Equipo utilizado

- Refractómetro ABBE; Marca Warszawa; Modelo PZO.
- Balanza analítica; Marca Denver Instrument Company; Modelo AA-200.

3.2.3.2. Materiales

- Vaso precipitado.
- Matraz Erlenmeyer.
- Fiolas.
- Picnómetro.

3.2.3.3. Reactivos:

- Solución indicadora de fenolftaleína.
- Solución de hidróxido de sodio a 0.1 N.

3.2.4. Análisis cromatográfico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

3.2.4.1 Equipo utilizado

- Cromatógrafo de Gas Shimadzu; Modelo 2010: Con detector de 53 ión de flama (GC-FID), equipada con columna capilar de sílice fundida PAG, de carácter multipolar, con las siguientes dimensiones: (Stabilwax 30m de largo x 0.25mm de diámetro interno x 0.50 um de espesor de film). Fue usado helio como gas de arrastre, también hidrógeno y aire, todos ellos con alto grado de pureza (99.999%), grado cromatográfico.

3.2.4.2. Materiales

- Fiolas.
- Pipetas.
- Micropipetas.
- Viales.

3.2.4.3. Reactivos:

- Hexano grado cromatográfico.

3.2.5. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

3.2.5.1 Equipo utilizado

- Incubadora microbiológica; Marca MRC; Modelo DP-600WT/RS232.
- Cámara de bioseguridad; Marca ISR; Tipo A2; Clase II.
- Autoclave eléctrica; Marca selecta; Modelo S-477MED.
- Refrigerador; Marca BOSH; Modelo KSU44.

3.2.5.2. Materiales

- Tubos con tapa rosca.
- Placas petri.
- Vaso precipitado.
- Matraz Erlenmeyer.
- Pipetas.
- Micropipetas.
- Gradilla.
- Mechero Bunsen.
- Aza de siembra.
- Hisopos de algodón.
- Papel aluminio.
- Regla.

3.2.5.3. Medios de cultivo y reactivos necesarios para la prueba

- Agar Mueller Hinton.
- Agar nutritivo.
- Solución salina estéril.
- Discos de sensibilidad antibiótica (papel filtro Whatman N°4), con 6mm de diámetro según OMS y NCCLS.
- Estándar 0.5. Mc. Farland.

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1. Extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

La extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* se realizó por el método mixto (agua – vapor).

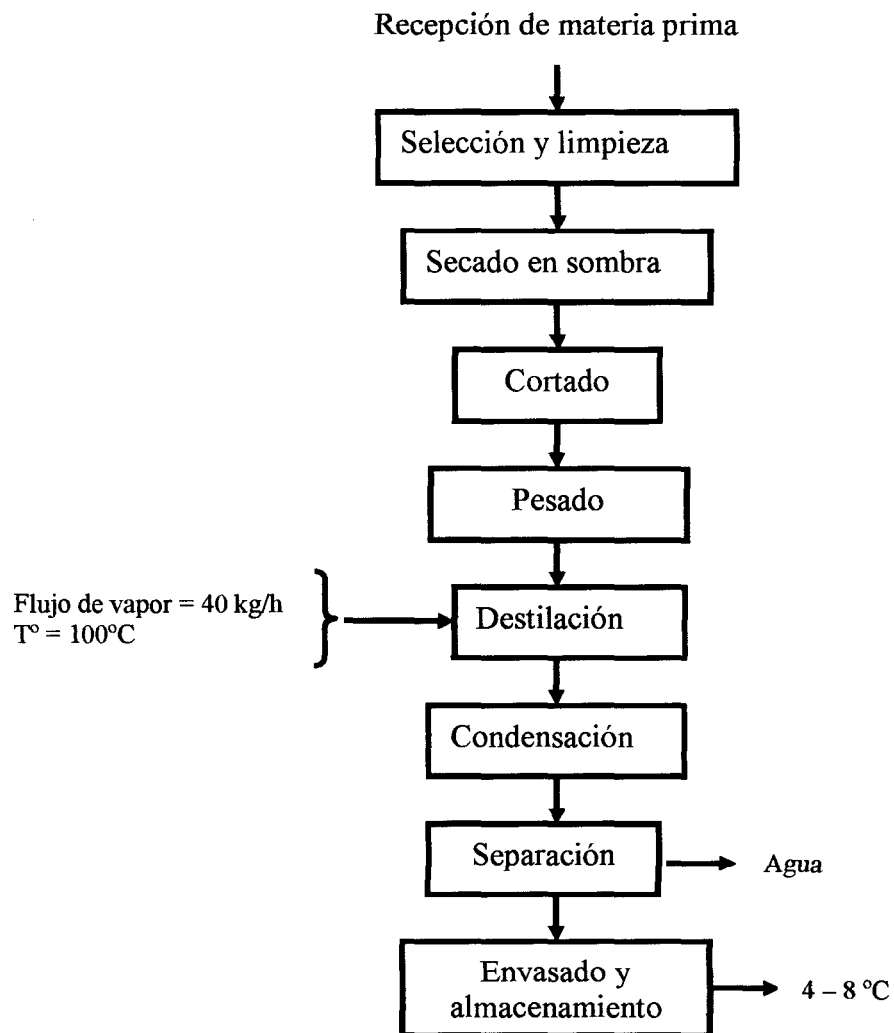


Figura 15: Diagrama de flujo para la extracción de aceite esencial.

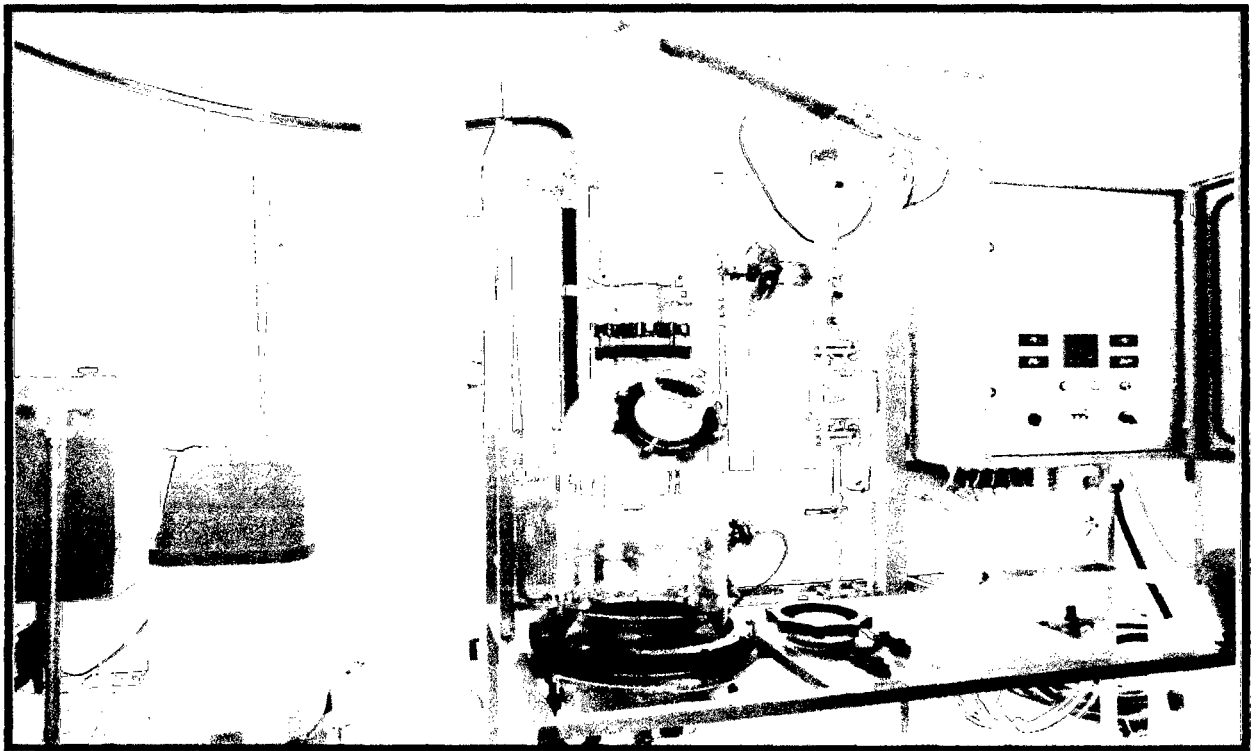


Figura 16: Equipo de extracción de aceites esenciales de yerbas officinalis. Mod.

UDCA-2/EV.

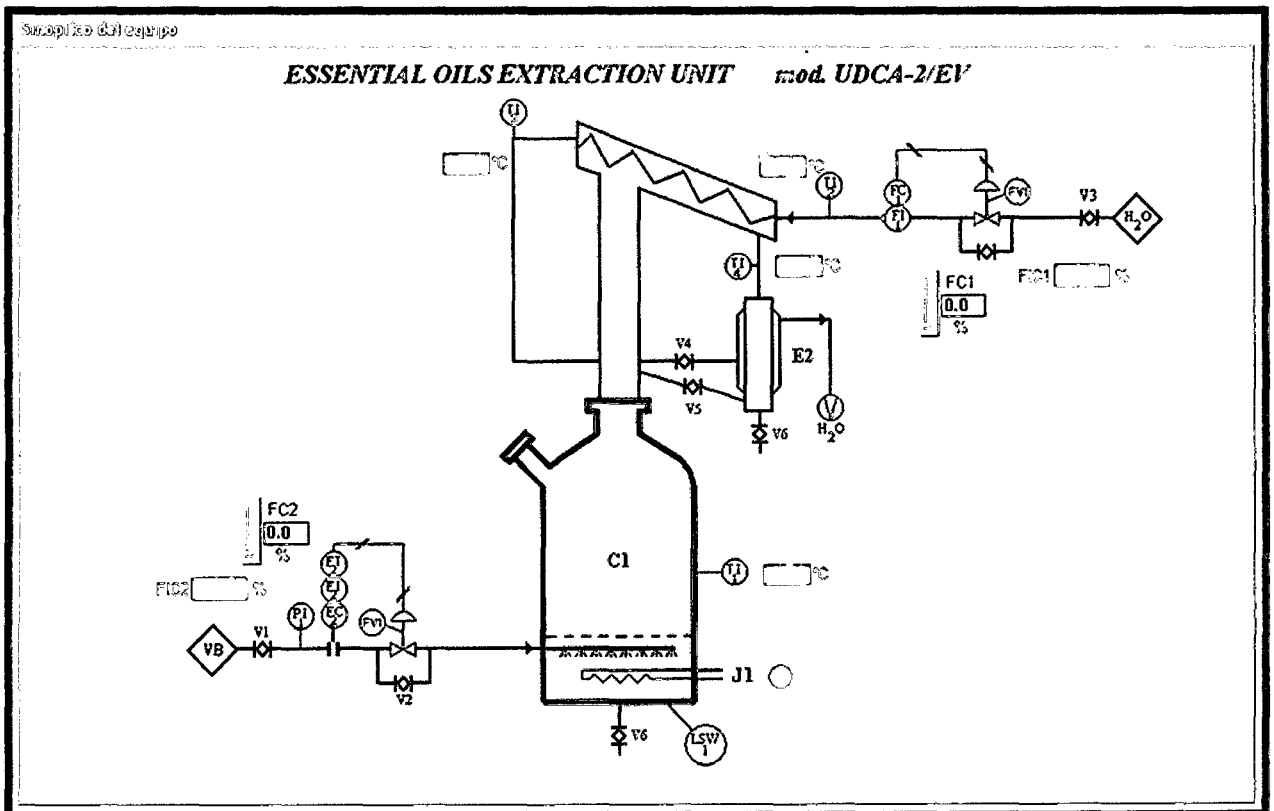


Figura 17: Diagrama de programación de los parámetros de trabajo.

Cuadro 08: Parámetros de extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*.

Nomenclatura	Nombre	Unidad	Parámetros de trabajo
FIC1	Abertura de válvula neumática para el caudal de agua que va hacia el condensador.	%	17.7
FIC2	Porcentaje de abertura de válvula neumática para el caudal de vapor que va del calderín.	%	40
TI1	Temperatura del calderín	°C	99.5 - 100
TI2	Temperatura de agua que entra al condensador	°C	22
TI3	Temperatura de agua que sale del condensador	°C	40.3
TI4	Temperatura de la mezcla del condensado o hidrolado y aceite esencial que sale del condensador	°C	40
FC1	Punto de referencia o set point (abertura del agua refrigerante al condensador)	kg/h	100
FC2	Punto de referencia o set point (abertura del caudal de	kg/h	40

	vapor hacia el calderín)		
I2	Encendido y apagado de la resistencia		
Tp	Tiempo de proceso	minutos	45

3.3.1.1. Recepción de Materia Prima

La materia prima (*Salvia officinalis* variedad *alba*) proveniente de la zona de Socclaccasa ubicada a 3900 msnm, en la provincia de Abancay departamento de Apurímac fue transportada en cajas de cartón hasta el lugar donde se seleccionaron para su posterior secado.

3.3.1.2. Selección y limpieza

Se realizó con el objeto de separar cualquier impureza o restos de tierra adherida a la materia prima para asegurar un óptimo rendimiento del proceso y la calidad del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*, la selección consiste en separar todas aquellas plantas que presentan signos de degradación (podrida o seca), esta operación se realizó en forma manual y la limpieza consiste en eliminar basurillas impregnadas.

3.3.1.3. Secado en sombra

El secado se realizó en sombra por un tiempo total de 30 días a temperatura ambiente, este secado indirecto se hizo con el fin de no perder sus componentes volátiles de la *Salvia officinalis* variedad *alba*, y para evitar el crecimiento de mohos y putrefacción e incluso un secado uniforme de la materia prima se procedió a realizar rotaciones cada 6 días.

3.3.1.4. Cortado

Esta operación es muy importante para las materias primas que serán deshidratadas por lo que la salvia previamente secada, fue cortada, para obtener un mejor rendimiento de aceite esencial.

3.3.1.5. Pesado

Para este efecto se contó con una balanza analítica que permitió determinar la cantidad de materia prima seca-cortada que se obtuvo. Debido a los niveles de rendimiento el pesaje debe ser muy exacto, de acuerdo a su uniformidad y a su estadio de madurez.

3.3.1.6. Destilación

La salvia previamente cortada es introducida en el alambique de la unidad de destilación automatizada Mod. UDCA-2/EV, una cantidad de 1kg ya que el espesor del material vegetal fue la tercera parte del volumen del alambique, cantidad recomendable con el fin de aprovechar al máximo la capacidad del equipo en cuanto a rendimiento. El equipo está provisto de inyectores de vapor directo que posee aditamentos de seguridad y control para este tipo de operaciones, donde se inyectó vapor del caldero y se prendió la resistencia que contenía agua blanda, y consecuentemente producir la condensación.

El aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* es obtenida por arrastre de vapor aprovechando las diferencias de temperaturas de volatilización de sus componentes.

Durante la destilación se condensa agua dentro del tanque.

3.3.1.7. Condensación

En esta operación se logra condensar los vapores del destilador. El producto resultante es una emulsión constituida por agua y aceite esencial. En esta operación se requiere de un intercambiador de calor que permite el cambio de estado físico de los

vapores producto de la destilación. El refrigerante empleado en esta operación es agua impulsado por un electro bomba que se alimentara de agua fría del grifo provista por el equipo para acondicionar la temperatura de la misma mediante el uso de una boquilla de rocío. Esta etapa se realiza de manera automática en la unidad de destilación automatizada Mod. UDCA-2/EV.

3.3.1.8. Separación

La temperatura óptima de separación debe estar en el rango de 25 a 30 °C con la finalidad de evitar pérdidas de aceite esencial por volatilización y cuidar la calidad del producto. El agua y el aceite son recepcionados en vasos florentinos, donde se logra la separación física por el principio de diferencia de densidades, donde el agua por ser más denso que el aceite va a descansar en el fondo del vaso.

Posteriormente el aceite que se obtuvo pasó a un vaso precipitado y se agregó sulfato de sodio en una relación de (10g de sulfato de sodio / 100 ml de aceite esencial), para eliminar por completo el agua restante del aceite esencial de salvia, y se calculó el rendimiento utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{kg. aceite obtenido}}{\text{kg. carga vegetal}} * 100$$

3.3.1.9. Envasado y almacenamiento

El aceite esencial obtenido se envasó en recipientes herméticos de vidrio oscuro para evitar degradaciones químicas por acción de la luz, el calor y el aire. El almacenamiento se llevó a cabo en refrigeración a una temperatura de 4 – 8 °C.

3.3.2. Análisis químico proximal de *Salvia officinalis* variedad *alba* .

Para el análisis químico proximal de la materia prima secada en sombra (*Salvia officinalis* variedad *alba*), se realizó los siguientes procedimientos.

3.3.2.1. Determinación de la humedad

Se determinó mediante el método de secado de estufa, utilizando el método planteado por la AOAC, 930.15 (1990), [Anexo 1.A.1].

3.3.2.2. Determinación de proteínas

Se determinó mediante el método kjeldahl recomendado por AOAC, 930.19 (1990). [Anexo 1.A.2].

3.3.2.3. Determinación de grasas

Se determinó utilizando el método de Soxhlet, recomendado por AOAC, 930.19 (1990). [Anexo 1.A.3].

3.3.2.4. Determinación de cenizas

Se determinó utilizando la incineración en mufla, utilizando el método de la AOAC, 7009.14 (1984), [Anexo 1.A.4].

3.3.3. Análisis fisicoquímico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

3.3.3.1. Determinación de la densidad

Según NTP 319.081:1974, que establece el método para determinar la densidad de los aceites esenciales, líquidos a la temperatura de 20 °C, [Anexo 1.B.1].

3.3.3.2. Determinación del índice de refracción

Según NTP 319.075:1974, establece el método para determinar el índice de refracción de los aceites esenciales, [Anexo 1.B.2].

3.3.3.3. Determinación del índice de acidez

Según NTP 319.085:1974, establece el método de determinación del índice de acidez de los aceites esenciales. Este método no es aplicable a aquellos aceites esenciales que contengan lactona en proporciones apreciables, [Anexo 1.B.3].

3.1.5.4. Determinación del índice de ester

Según NTP 319.088:1974, establece el método de determinación del índice de éster de los aceites esenciales. Este método no es aplicable a los aceites esenciales que contienen elevada proporción de aldehídos, [Anexo 1.B.4].

3.3.3.5. Determinación del índice de saponificación

Se puede calcular sumando el índice de éster y el índice de acidez, Según NTP 319.089:1974, [Anexo 1.B.5].

3.3.3.6. Determinación de solubilidad en etanol

Según la Norma TINTEC 18510, [Anexo 1.B.6].

3.3.4. Análisis cromatográfico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

Las características químicas del aceite esencial se determinaron mediante cromatografía gaseosa. Los análisis se realizaron en un Cromatógrafo de Gas Shimadzu; Modelo 2010: Con detector de 63 ión de flama (GC-FID), equipada con columna capilar de sílice fundida PAG, de carácter multipolar, con las siguientes dimensiones: (Stabilwax 30m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.50µm de espesor de film). Fue usado helio como gas de arrastre, también hidrógeno y aire, todos ellos con alto grado de pureza (99.999%), grado cromatográfico.

3.3.4.1. Preparación de la muestra

Se tomó 0.5 ml de aceite esencial de salvia con una micropipeta, el cual se agregó a una fiola de 10 ml, enrazando con hexano grado cromatógrafo, posteriormente se agitó. La muestra preparada se agregó en un vial color ámbar, una cantidad de 2 ml.

3.3.4.1. Corrida de la muestra

Se tomó 3 viales, el primer vial no contenía ninguna solución, ya que es para eliminar la soluciones que se succionan; el segundo vial contiene hexano grado cromatógrafo para realizar el lavado del equipo antes y después de cada corrida; el tercer vial contiene la muestra preparada (aceite esencial + hexano). Los tres viales se colocan en el inyector en el orden mencionado.

Se inyectó 1 ml de la muestra preparada en el modo Splitless. La temperatura del inyector fue de 230 °C. Se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo de 1ml/min y una presión de 7.52 Psi.

El programa de operación, o los parámetros del método del aceite esencial con el cual se corrió la muestra es de; temperatura inicial 50 °C durante 1 minuto, rampa de calentamiento 10°C/min, temperatura final de 250 °C durante 3 minutos, temperatura del detector 280 °C en modo scam. Tiempo total de la corrida 14 minutos.

El reconocimiento de los compuestos individuales se realizó mediante la comparación de patrones cineol, limoneno y citral.

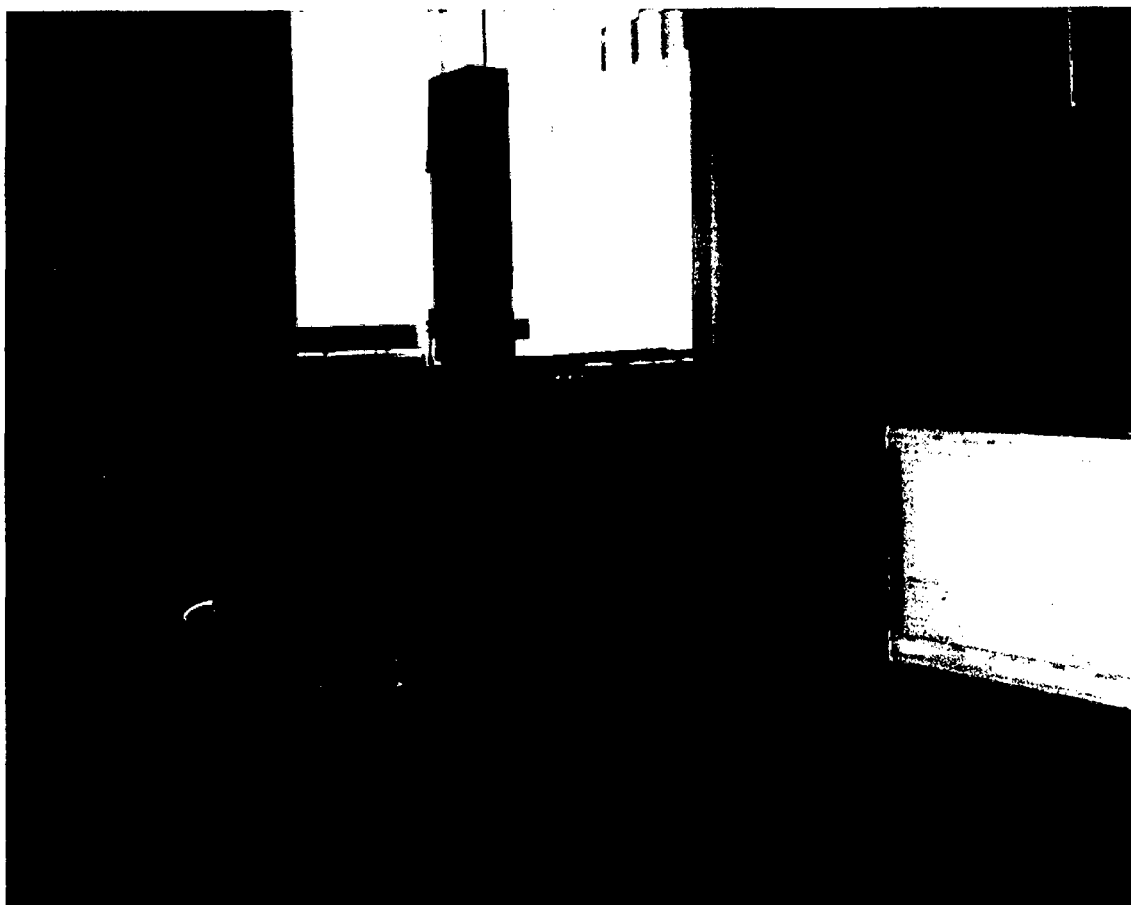


Figura 18: Cromatógrafo de Gas Shimadzu; Modelo 2010.

3.3.5. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

Para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; se empleó el método de discos de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards y la Organización Mundial de la Salud; basada en el método de Kirby – Bauer.

3.3.5.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas para comprobar la actividad antibacteriana del aceite esencial de salvia fueron, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, suministradas por el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa.

Las cuatro bacterias fueron cultivadas y mantenidas en agar nutritivo a una temperatura de 4 °C bajo refrigeración, hasta el momento de su utilización.

Todas las cepas fueron activadas previas a su utilización, cultivándolos por 24 horas a 37°C en una incubadora.

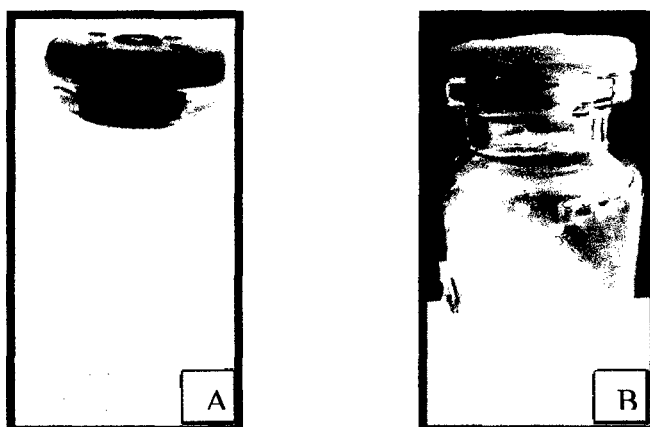


Figura 19: (A) Cepa bacteriana *E. coli*; (B) Cepa bacteriana de *S. aureus* conservada en refrigeración.

3.3.5.2. Preparación de Agar Mueller Hinton

Preparamos el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se autoclavó a 121 °C/15 lb de presión por 15 minutos y se dejó enfriar hasta la temperatura de 45 – 50 °C, posteriormente se agregó a placas petri esterilizadas un aproximado de 20 ml de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.

3.3.5.3. Preparación del inóculo

El aislamiento bacteriano que fue analizado, fue cultivado en condiciones óptimas previo a la preparación del inóculo. Cada bacteria fue cultivada en un medio de cultivo apropiado (agar nutritivo) por 24 horas a 37 °C. A partir de este cultivo fresco se preparó una suspensión en solución salina estéril en un tubo de ensayo a una turbidez equivalente a la del estándar 0.5 McFarland. Esta suspensión contiene aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml. El estándar 0.5 McFarland es una solución que fue preparada mediante la adición de 0.5 ml de BaCl₂ a 0.048 M y 99.5 ml de H₂SO₄ a 0.36N. Una vez preparada la suspensión fue utilizada antes de que transcurran los 15 minutos.

3.3.5.4. Inoculación en las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de colocar los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos, para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

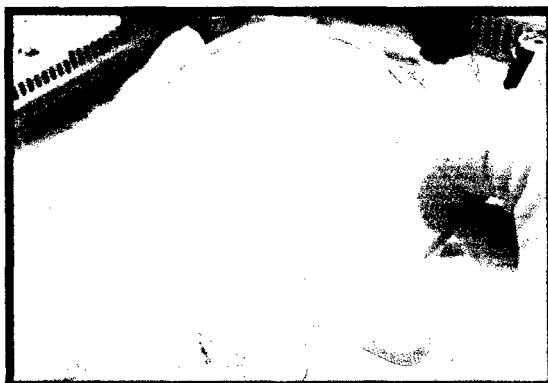


Figura 20: Siembra por estrías en tres direcciones.

3.3.5.5. Aplicación de los discos

3.3.5.5.1. Aceite esencial puro

Se preparó discos de sensibilidad con papel filtro Whatman N°4 de 6 mm (según NCCLS, 2002 y OMS, 2002) de diámetro, previamente esterilizados. Posteriormente se colocó los discos de doble capa sobre la superficie del agar Mueller Hinton con la ayuda de una pinza estéril, los cuales contenían diferentes cantidades de aceite esencial 10 μ l, 5 μ l y 2.5 μ l usando la micro pipeta estéril, se presionó suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

El disco no se removió una vez que tomo contacto con la superficie del agar ya que podría extenderse rápidamente el aceite esencial de salvia.

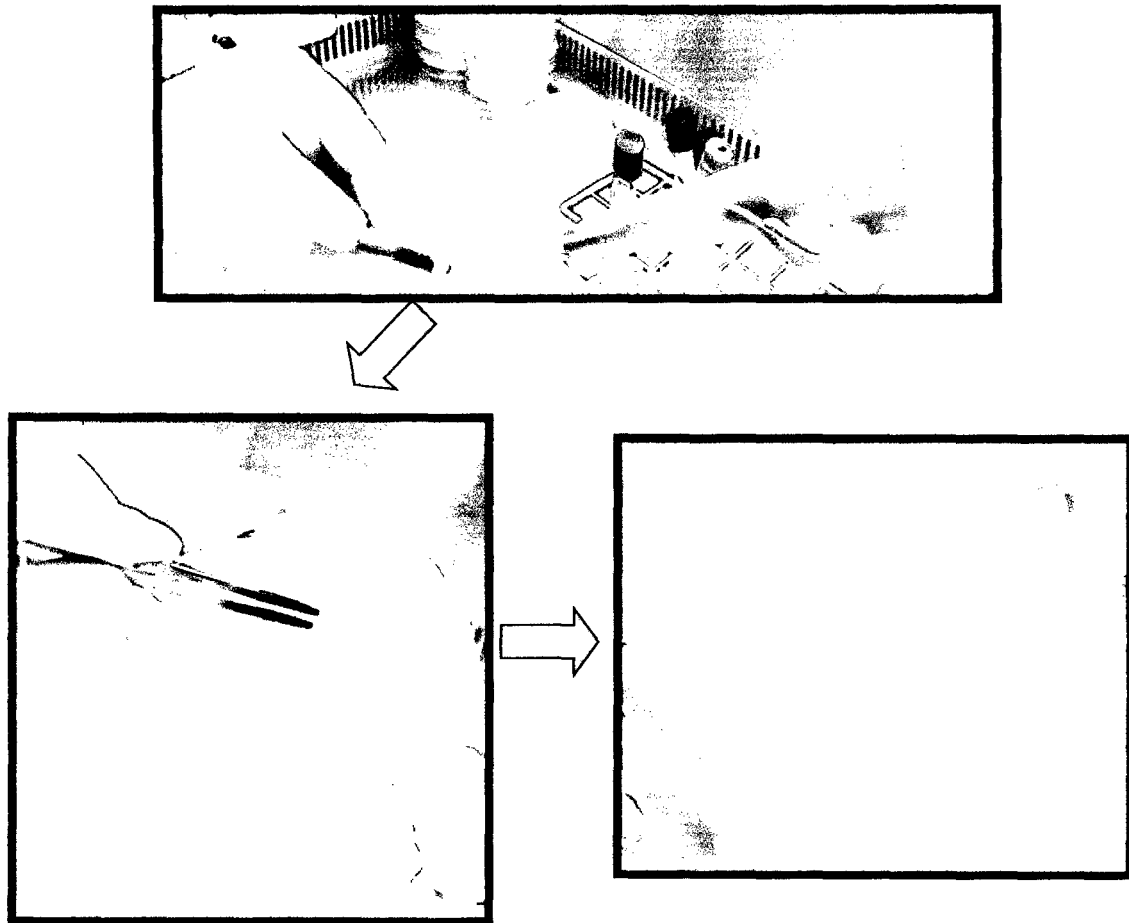


Figura 21: Colocación de discos de sensibilidad.

3.3.5.5.2. Aceite esencial mas encapsulante

Los discos de sensibilidad fueron una porción de 0.72g de maltodextrina que es un equivalente al peso de papel filtro Whatman N°4 de 6 mm de diámetro. La porción de maltodextrina se mezcló con el aceite esencial de salvia, se dejó secar durante 2 horas, el cual se colocó sobre la superficie del Agar Mueller Hington con la ayuda de una pinza estéril, previamente se realizó un orificio de 6 mm de diámetro que fue el equivalente del papel filtro a los cuales se le agregó las diferentes mezclas de aceite esencial 10 μ l, 5 μ l y 2.5 μ l, se homogenizó suavemente sobre cada orificio para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

El orificio de 6 mm de diámetro mas el aceite encapsulado no se removió una vez que se homogenizó y tomo contacto con la superficie del agar ya que podría extenderse rápidamente el aceite esencial de salvia.

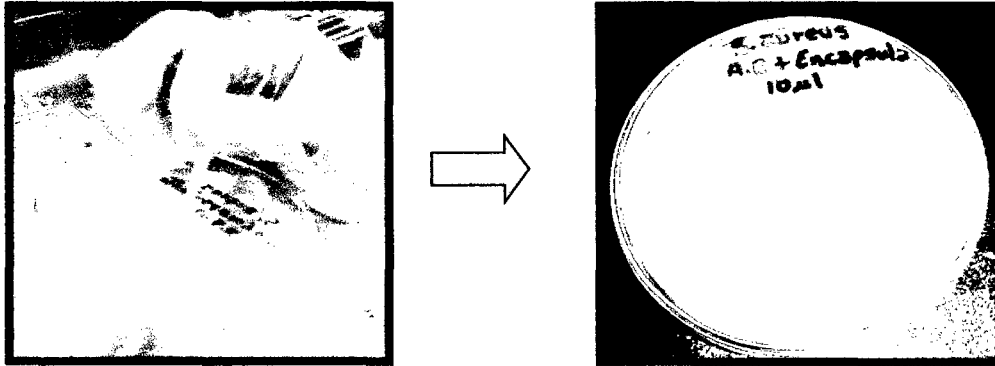


Figura 22: Colocación de aceite esencial encapsulado en maltodextrina en el orificio de 6 mm.

3.3.5.6. Condiciones de incubación

Se llevó a incubar las placas en posición invertida a 37 °C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos durante 24 horas para una buena detección de sensibilidad.

3.3.5.7. Lectura de placas

Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El análisis estadístico se realizó en un diseño factorial de $4 \times 3 \times 2$, que consiste en 24 tratamientos o puntos experimentales, cada tratamiento se realizó por triplicado con un total de 72 observaciones, cuyos resultados fueron evaluados estadísticamente a fin de determinar las diferencias significativas entre ellos.

Modelo estadístico

El diseño factorial $a*b*c$ se describe mediante el comportamiento de la respuesta Y .

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl};$$

$$i = 1, 2, \dots, a;$$

$$j = 1, 2, \dots, b;$$

$$k = 1, 2, \dots, c;$$

$$l = 1, 2, \dots, n$$

Donde:

Y_{ijkl} : Observación individual.

μ : Media general.

A_i : Efecto del nivel i -ésimo del factor A.

B_j : Efecto del nivel j del factor B.

C_k : Efecto del nivel k en el factor C.

$(AB)_{ij}$, $(AC)_{ik}$, $(BC)_{jk}$: Efectos de interacciones dobles (de dos factores) en los niveles ij , ik , jk , respectivamente.

$(ABC)_{ijk}$: Efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk .

ε_{ijkl} : Error aleatorio en la combinación $ijkl$.

l : Repeticiones o replicas del experimento.

Todos los efectos cumplen la restricción de sumar cero, es decir, son desviaciones respecto a la medida general μ .

A_i : Bacterias: (4 niveles; i = 1, 2, 3, 4)

$$A_1 = E. aureus$$

$$A_2 = B. cereus$$

$$A_3 = Salmonella spp.$$

$$A_4 = E. coli$$

B_j : Concentración de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*:

(3 niveles; j = 1, 2, 3)

$$B_1 = 10 \mu l$$

$$B_2 = 5 \mu l$$

$$B_3 = 2.5 \mu l$$

C_k : Tipo de aceite esencial: (2 niveles; k = 1,2)

$$C_1 = \text{Aceite esencial de salvia}$$

$$C_2 = \text{Aceite esencial de salvia + Encapsulante (maltodextrina)}$$

Cuadro 09: Operacionalización de variables.

Aceite esencial	Cepas bacterianas											
	<i>S. aureus</i>			<i>B. Cereus</i>			<i>Salmonella spp.</i>			<i>E. Coli</i>		
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración		
	(μl)			(μl)			(μl)			(μl)		
	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)											
	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5
Aceite esencial puro	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
Aceite esencial + encapsulante	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇	T ₁₈	T ₁₉	T ₂₀	T ₂₁	T ₂₂	T ₂₃	T ₂₄

Donde:

T_{1,2,2,.....,24}: Son los tratamientos realizados.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Análisis químico proximal de *Salvia officinalis* variedad *alba*

La materia prima (*Salvia officinalis* variedad *alba*), la cual consta de tallos, hojas, y flores secas, presentó la siguiente composición.

Cuadro 10: Composición de *Salvia officinalis* variedad *alba* secada a la sombra.

Componentes	Cantidad (%)
Humedad	69.8
Proteínas	0.7
Grasas	3.2
Cenizas	1.8
Carbohidratos	24.5 (*)

(*) Por diferencia

4.2. Extracción de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

En el presente trabajo se realizó la extracción de aceite esencial de salvia en la Unidad de destilación Mod. UDCA-2/EV utilizando el método mixto (agua - vapor); con los siguientes parámetros constantes. Abertura de válvula neumática para el caudal de agua que va hacia el condensador (FIC1) de 17.7%, Porcentaje de abertura de válvula neumática para el caudal de vapor que va del calderín (FIC2) de 40%, Temperatura del calderín (TI1) de 99.5 – 100°C, Punto de referencia o set point (abertura del agua refrigerante al condensador) (FC1) de 100 kg/h, Punto de referencia o set point (abertura del caudal de vapor hacia el calderín) (FC2) de 40 kg/h, cantidad de agua adicionada a la resistencia (4L), manteniendo la resistencia prendida, se trabajó con un total de materia prima secado en sombra de 1000g que consta de tallos, hojas y flores secas.

Después de los 45 minutos de extracción en la unidad de destilación Mod. UDCA-2/EV (Figura 16), el rendimiento obtenido fue de 1.61%, valor mayor en 44% a lo relatado por (Mizrahi et al., 1992), quienes obtuvieron valores entre 0.7 a 0.9 %, siguiendo el método de arrastre de vapor, y semejante a los valores obtenidos por (Sánchez et al., 2005), que relataron valores de 1 a 2,5%, siguiendo el método de arrastre de vapor. Las diferencias en el rendimiento del aceite esencial posiblemente fueron afectados por el método de extracción, proceso de secado, pérdida de aceite esencial debido a su alta volatilidad e incluso ruptura de células, adicionalmente a ello se suman el área de cultivo, especie, edad de la planta y factores genéticos (Pierozan et al., 2009).

4.3. Análisis fisicoquímico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

El aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* que fue extraído por el método mixto (agua - vapor), presentó las siguientes características físicas.

Cuadro 11: Características físicas de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* extraído por el método mixto (agua - vapor).

Características	Valores	Unidades	Referencia
Densidad a 20°C	0.9166	g/ml	0.8973 – 0.9310
Índice de refracción	1.4800	-	1.4450 – 1.4837
Índice de acidez	1.2332	mg KOH/g	-
Índice de éster	147.2625	mg KOH/g	-
Índice de saponificación	148.4957	mg KOH/g	-
Solubilidad en etanol	Absoluto, 90, 80, 70	(%v/v)	Absoluto, 90

Los valores de las características evaluadas del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* proveniente de las alturas de Socclaccasa coinciden con los

valores relatados en la literatura (Mizrahi et al., 1992), estos resultados indican la presencia de monoterpenos, alcoholes y cetonas en los aceites esenciales (Domínguez, 1998).

El índice de acidez permite definir la calidad del aceite, valor que es reducido en los aceites finos, este se ve incrementando en forma notable en los productos que han tenido su origen en materia prima de mala calidad, materia prima con presencia de mohos, aplicación de temperaturas elevadas en la extracción, conservación inadecuada (Fennema, 2000). La esencia de salvia presentó un índice de acidez de 1.2332 g/ml, semejante a los valores relatados por (Mizrahi et al., 1992).

La solubilidad del aceite esencial de salvia en etanol a diferentes % de pureza, indica el contenido de monoterpenos, cuanto mayor sea el contenido de estos en la esencia mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles (Monsalve, 2007), este relato indicaría presencia de compuestos oxigenados en el aceite esencial de salvia obtenido, ya que es soluble en etanol absoluto al 90, 80 y 70 % v/v.

Doyle et al. (2001), menciona que los esteroides y los ácidos influyen en la síntesis de la pared celular de los organismos procariotas o que interfieren significativamente en la síntesis proteica o con los mecanismos genéticos, el índice de éster de la salvia estudiada fue de 147.2625 mg KOH/g, lo cual indicaría que el aceite esencial de salvia tiene actividad antibacteriana.

4.4. Análisis cromatográfico del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

Cuadro 12: Componentes del aceite esencial de Salvia.

Sustancia	Tiempo de retención	Porcentaje
Cineol	9,68	20%
Limoneno	9,56	9%
Citral	11,23	1.2%

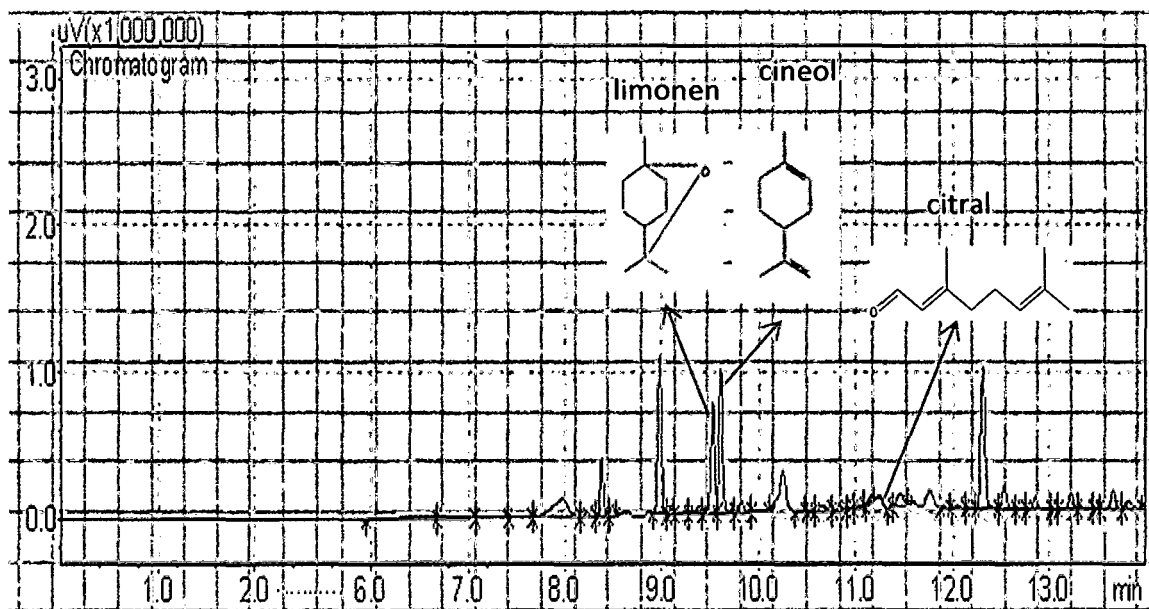


Figura 23: Espectro, presente en el aceite esencial de *Salvia Officinalis* variedad *alba*.

El cuadro 11 muestra los componentes identificados en el aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*.

A pesar de que sólo fue identificado tres componentes, en función de los patrones utilizados, que son indicadores de actividad antibacteriana del aceite esencial extraído de salvia se percibe, como era de esperarse la presencia dominante de monoterpenos siendo notoria la predominancia de cineol con un porcentaje de 20%, limoneno con un porcentaje de 9%.

Se han efectuado estudios acerca de la composición química de aceites esenciales *Salvia officinalis*, encontrándose como constituyentes principalmente monoterpenoides. Estos trabajos coinciden con la presencia de cineol como uno de los

componentes mayoritarios. Misrahi et al. (1994) y Saldarriaga et al. (2009); informaron que uno de los constituyentes principales del aceite esencial de *Salvia Officinalis* es el 1,8-cineol encontrándose en un rango de 7 a 22 % de la composición total, valores semejantes a lo obtenido en el presente estudio.

Las discrepancias relacionadas a la composición del aceite, en cuanto al contenido de cineol y la abundancia relativa de otros componentes como α , β – tuyonas, alcanfor, pineno , además de componentes minoritarios, puede explicarse considerando que variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta; así como las condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima), pueden producir en el aceite cambios cualitativos y cuantitativos (Saldarriaga et al., 2009).

4.5. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*

Cuadro 13: Diámetro de los halos de inhibición obtenido para cada tratamiento

Aceite esencial	Cepas bacterianas											
	<i>S. aureus</i>			<i>B. Cereus</i>			<i>Salmonella spp.</i>			<i>E. Coli</i>		
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración		
	(μl)			(μl)			(μl)			(μl)		
	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)											
10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	
Aceite esencial puro	22	15	12	14	12	11	0	0	0	0	0	0
	19	18	13	14	11	12	0	0	0	0	0	0
	21	20	12	15	11	11	0	0	0	0	0	0
\bar{X}	20.7	17.7	12.3	14.3	11.3	11.3	0	0	0	0	0	0
Aceite esencial + encapsulante	20	20	13	21	19	18	0	0	0	0	0	0
	23	18	12	24	16	16	0	0	0	0	0	0
	22	15	15	19	18	15	0	0	0	0	0	0
\bar{X}	21.7	17.7	13.3	21.3	17.7	16.3	0	0	0	0	0	0

Cuadro 14: Promedio de halos de inhibición presentadas en las diferentes bacterias.

Aceite esencial	Especies bacterianas											
	<i>S. aureus</i>			<i>B. Cereus</i>			<i>Salmonella spp.</i>			<i>E. Coli</i>		
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración		
	(μl)			(μl)			(μl)			(μl)		
	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)											
10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	
Aceite esencial puro	20.7	17.7	12.3	14.3	11.3	11.3	0	0	0	0	0	0
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
Aceite esencial + encapsulante	21.7	17.7	13.3	21.3	17.7	16.3	0	0	0	0	0	0
	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇	T ₁₈	T ₁₉	T ₂₀	T ₂₁	T ₂₂	T ₂₃	T ₂₄

Donde:

T_{1,2,2,.....24}: Son los tratamientos realizados.

Cuadro 15: Análisis de varianza (ANVA) para el modelo matemático que evalúa la concentración del aceite esencial en la cepa bacteriana.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadros	Medias de Cuadrados	F _{calculada} (F _o)	F _{tabular}	Significancia
Tratamiento	23	5255,31	228,49	171,79	1,80	**
Bacteria (A)	3	4815,93	1605,31	1203,98	2,81	**
Concentración (B)	2	114,53	57,26	42,95	3,198	**
Aceite esencial (C)	1	51,68	51,68	38,76	4,048	**
Bacteria x Concentración (AxB)	6	150,69	25,12	18,84	2,304	**
Bacteria x Aceite esencial (AxC)	3	118,37	39,46	29,59	2,81	**
Concentración x Aceite esencial (BxC)	2	0,86	0,43	0,32	3,198	N.S
Bacteria x Concentración x Aceite esencial (AxBxC)	6	3,25	0,54	0,41	2,304	N.S
Error	48	64,00	1,33			
total	71	5319,32	74,92			

Donde:

A: Cepa bacteriana.

** : Significativo.

B: Concentración de aceite esencial.

N.S: No significativo.

C: Aceite esencial.

Del análisis estadístico mostrado en el cuadro anterior, se tiene que el valor F del modelo es 171,79 indicando que el modelo es estadísticamente significativo, a un nivel de error del 5%, así mismo los valores de $F_0 > F_{tabular}$, muestran que los términos son significativos, de lo contrario muestran que no existe significancia; siendo los términos significativos para el modelo A, B, C, AxB, AxC.

Así mismo del cuadro 15 se obtiene que $R^2 = 0,9879$, el cual indica que el modelo o efecto de tratamientos es aceptable para determinar una respuesta de significancia.

Prueba de TUKEY

Cuadro 16: Síntesis del análisis estadístico de Tukey.

Orden de	Tratamiento	Tamaño de Halo de Inhibición	5%
I	T ₁₃	21.7	
II	T ₁	21.3	
III	T ₁₆	20.7	
IV	T ₂	17.7	
V	T ₁₄	17.7	
VI	T ₁₇	17.3	
VII	T ₁₈	16.3	
VIII	T ₄	14.3	
IX	T ₁₅	13.3	
X	T ₃	12.3	
XI	T ₅	11.3	
XII	T ₆	11.3	

En el primer grupo de comparaciones, se observa que el tratamiento T₁₃ y T₁₆ no presentan diferencias significativas, pero T₁₃ es el diámetro de halo presente en *Staphylococcus aureus* y T₁₆ es el diámetro de halo presente en *Bacillus cereus*, dichos tratamientos son realizados con aceite esencial encapsulado en maltodextrina a una concentración de 10µl; por lo tanto los tratamientos T₁₃ y T₁₆ muestran sensibilidad al aceite esencial de salvia encapsulado en maltodextrina.

En segundo grupo de comparaciones, donde hemos contrastado el promedio que ocupa el primer lugar en orden de méritos es el tratamiento ($T_{13} = 21.7$ mm de Halo) con otros promedios; en los tratamientos T_{16} , T_1 , T_2 , y T_{14} no existe diferencia significativa, los cuales indican sensibilidad de las bacterias hacia el aceite esencial de salvia por presentar diámetro de halo mayores o iguales a 15 mm (NCCLS, 2002).

En el tercer grupo de comparaciones, los tratamientos T_2 , T_{14} , y T_{17} no presentan diferencias significativas, siendo T_2 y T_{14} diámetro de halo para *Staphylococcus aureus* a una concentración de $5\mu\text{l}$ y T_{17} diámetro de halo para *Bacillus cereus* a una concentración de $5\mu\text{l}$, estos tratamientos muestran sensibilidad hacia el aceite esencial de salvia ya que su diámetro de halo es mayor o igual a 15 mm, (NCCLS, 2002).

En el cuarto y quinto grupo de comparaciones se observa que T_{14} , T_{17} , T_{18} son sensibles al aceite esencial de salvia, siendo mayores a los tratamientos (T_4 , T_{15} , T_3 , T_5 , T_6) los cuales muestran sensibilidad intermedia por estar en el rango de diámetro de halo de 11 – 14 mm; los mismos tratamientos no muestran diferencias significativas

Por lo tanto; el mejor tratamiento según el análisis de ANVA y Tukey es el tratamiento T_{13} para *Staphylococcus aureus*, y T_{16} para *Bacillus cereus*, ambos presentan aceite esencial encapsulado en maltodextrina con una concentración de $10\mu\text{l}$, el cual se demuestra con una seguridad del 95% y 5% de probabilidad de error.

Realizando una comparación entre el análisis estadístico y la NCCLS (2002); se obtiene que aplicado en alimentos, el tratamiento óptimo es T_{14} (aceite esencial encapsulado en maltodextrina a una concentración de $5\mu\text{l}$), para *Staphylococcus aureus* y T_{17} (aceite esencial encapsulado en maltodextrina a una concentración de $10\mu\text{l}$) para *Bacillus cereus*, estos diámetros de halos indican sensibilidad hacia el aceite esencial de salvia teniendo el mismo efecto que los tratamientos T_{13} (aceite esencial encapsulado en maltodextrina a una concentración de $5\mu\text{l}$) y T_{16} (aceite esencial encapsulado en

maltodextrina a una concentración de 5µl) respectivamente, por presentar diámetro de halo mayores a 15 mm.

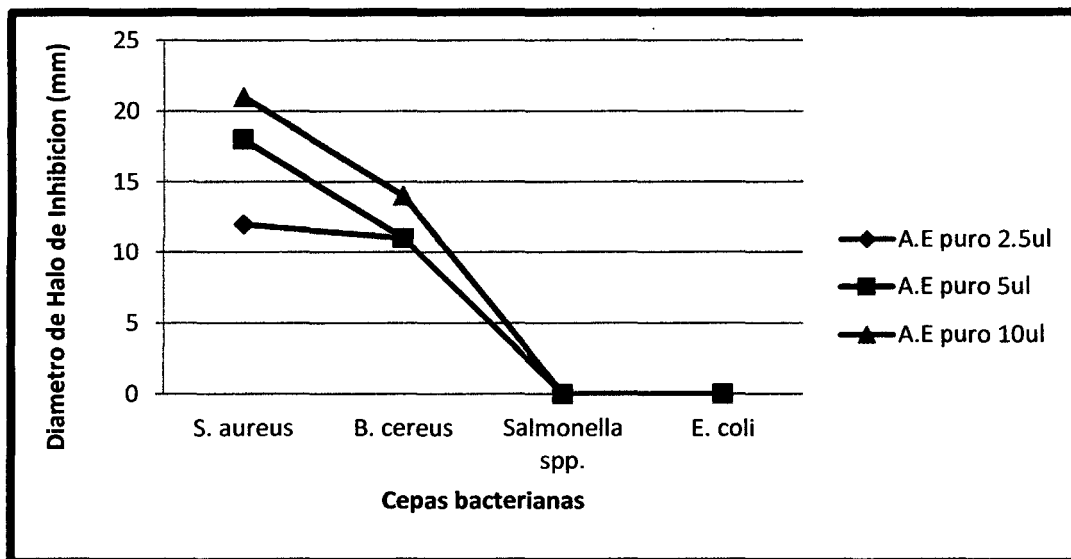


Figura 24: Perfiles de halos de inhibición de bacterias a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*.

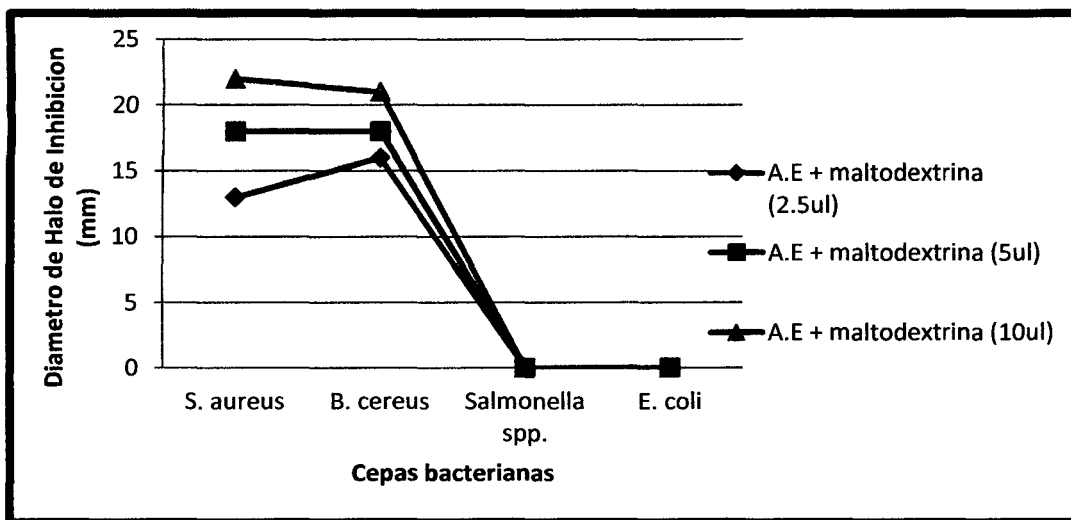


Figura 25: Perfiles de halos de inhibición de bacterias a diferentes concentraciones de aceite esencial encapsulado en maltodextrina.

En la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* var. “Alba” frente a las bacterias estudiadas, se usaron aceite puro y aceite encapsulado en maltodextrina, observándose una inhibición alrededor del disco para *S. aureus* y *B. cereus* mas no para *Salmonella spp.* y *E. coli* en las tres concentraciones de

aceite esencial empleadas. En la figura 21 y 22 se aprecia que a una concentración de 10µl de aceite, el halo de Inhibición para *S. aureus* y *B. cereus* es mayor que a concentraciones de 5µl y 2.5µl respectivamente, en *Salmonella spp.* y *E. coli* no se evidencian formación de halo.

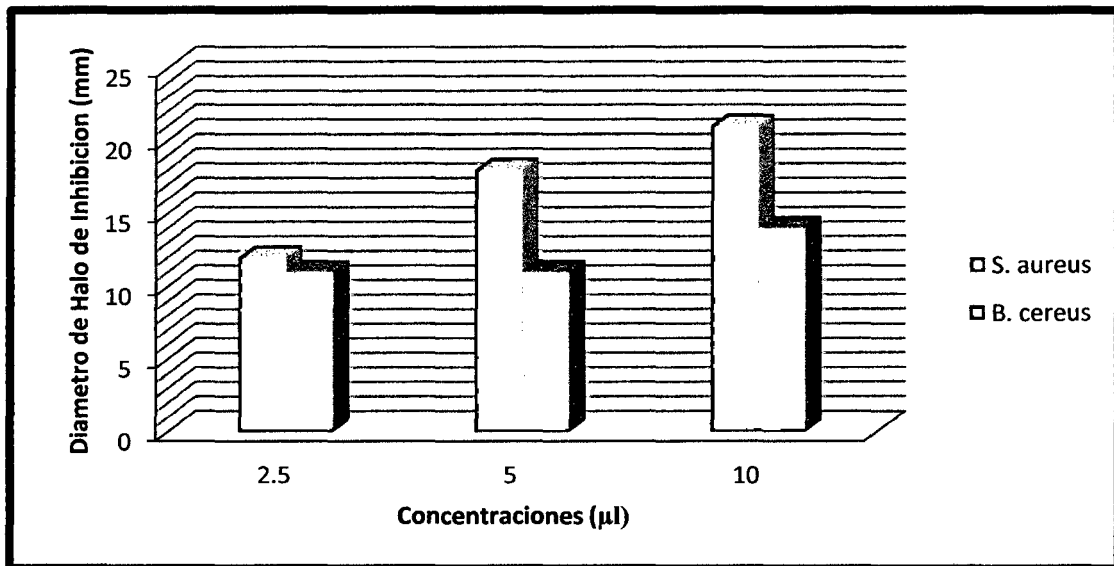


Figura 26: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* puro a diferentes concentraciones sobre *S. aureus* y *B. cereus*.

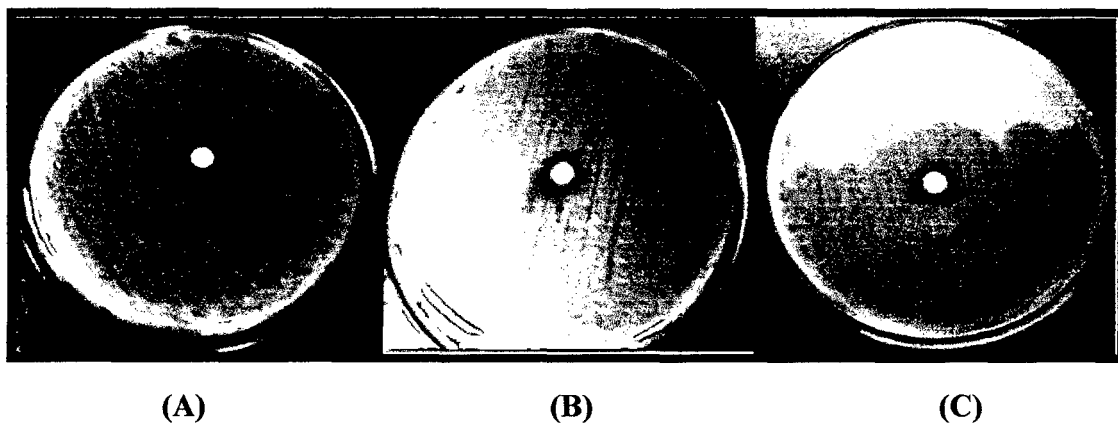


Figura 27: Halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *S. aureus* provocado por el aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; (A) Concentración de 10µl; (B) Concentración de 5µl; (C) Concentración de 2.5µl.



(A*)

(B*)

(C*)

Figura 28: Inhibición del crecimiento bacteriano de *B. cereus* provocado por el aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; (A*) Concentración de 10 μ l; (B*) Concentración de 5 μ l; (C*) Concentración de 2.5 μ l .

La Figura 26 muestra la actividad antibacteriana del aceite esencial de salvia. En las cepas bacterianas de *S. aureus* y *B. cereus*, presentaron Halos de Inhibición mayor a 19 mm y de 14 mm respectivamente para una concentración de 10 μ l; a concentraciones de 5 μ l, 2.5 μ l los halos fueron inferiores.

Según el Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud Lima (2002) y NCCLS (2002), la medida de los halos de inhibición de sensibilidad y resistencia a los antibióticos es: Resistente si el halo es ≤ 10 mm; Intermedio de 11 – 14 mm y Sensible ≥ 15 mm de diámetro.

En la presente investigación el aceite aplicado con una concentración de 10 μ l presentó mejor efectividad inhibitoria frente a *S. aureus* con un halo de 22 mm de diámetro considerándose por lo tanto sensible al aceite de salvia puro; mientras que *B. cereus* presenta un halo promedio de 14 mm y se considera de sensibilidad Intermedia, contrastándose de esta manera estos resultados con la información relatada por el INS.

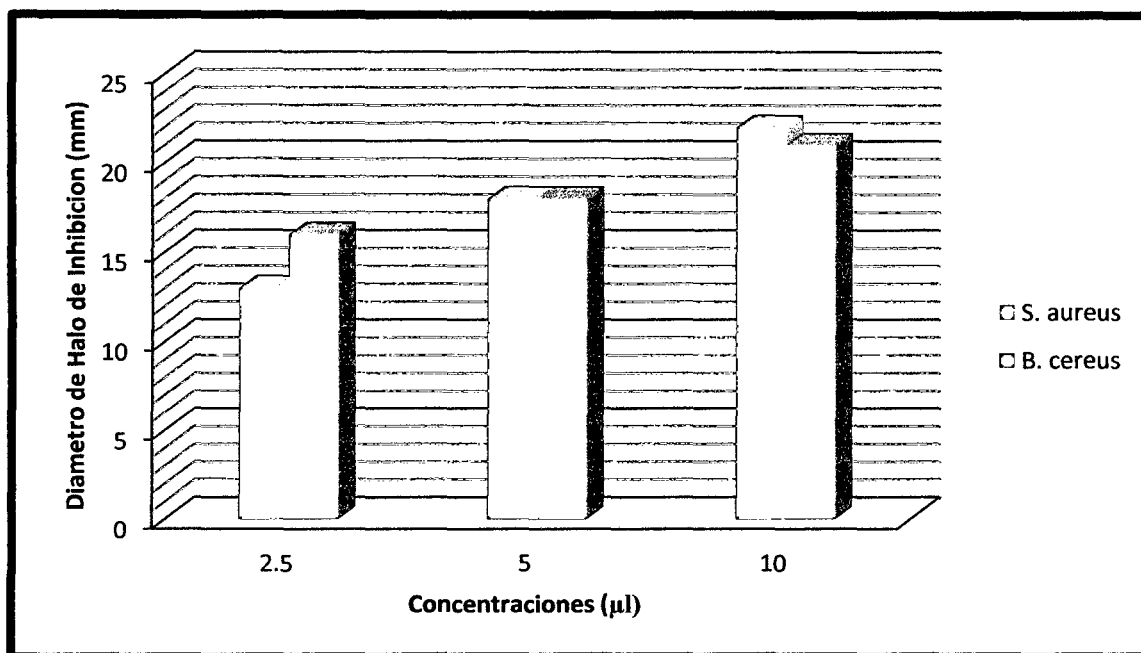


Figura 29: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones.



(a)

(b)

(c)

Figura 30. Halos de inhibición de *S. aureus* frente al aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones: (a) Concentración de 10µl; (b) Concentración de 5µl; (c) y Concentración de 2.5µl.

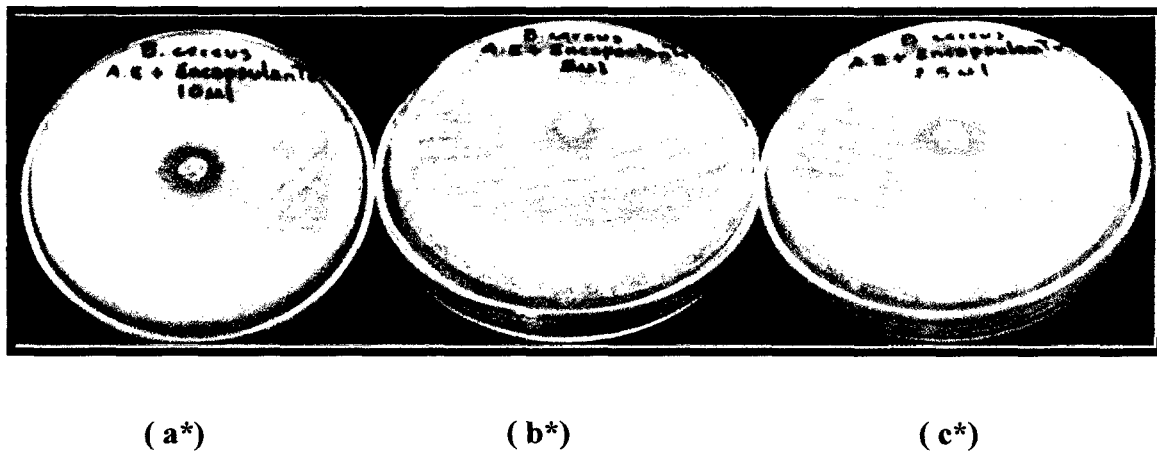


Figura 31: Halos de inhibición de *B. cereus* frente al aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba* encapsulado en maltodextrina a diferentes concentraciones: (a*) Concentración de 10µl; (b*) Concentración de 5µl; (c*) Concentración de 2.5µl.

La Figura 30 muestra la actividad antibacteriana del aceite esencial de salvia encapsulado en maltodextrina. El aceite encapsulado frente a *S. aureus* y *B. cereus* muestra un halo de 21 mm para una concentración de 10µl aceite encapsulado y de 18 mm para una concentración de 5µl, por lo tanto ambas bacterias son Sensibles a ambas concentraciones de aceite encapsulado en maltodextrina.

Shahidi y Han, (1993) mencionan que la encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se liberará gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado. Por lo tanto mencionamos que el aceite esencial encapsulado presenta mayor diámetro de halo de Inhibición, debido que durante el periodo de incubación de las bacterias, éste tiende a liberarse gradualmente de tal manera que no

se volatilice fácilmente por acción de la temperatura aplicada durante la incubación, que es de 37 °C.

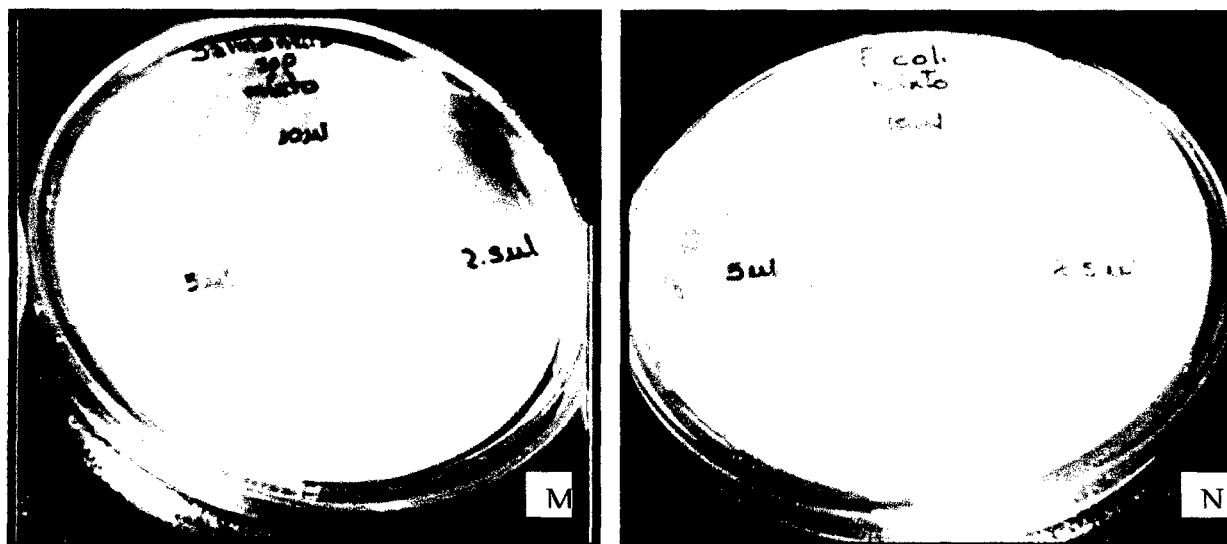


Figura 32: Halos de inhibición de bacterias Gram negativas provocado por el aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*; (M) *Salmonella spp.*; (N) *E. coli*.

La figura 32 no muestra formación de halos de inhibición del aceite de salvia frente a *Salmonella spp.* y *E. coli*, por lo tanto las bacterias evaluadas son Resistentes al aceite.

La acción antimicrobiana de los componentes de los aceites esenciales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto hidrocarbonado y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales. La actividad de los componentes de los aceites esenciales en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos, (Kalemba y Kunicka, 2003 citado por Concepción et al., 2010).

Las medidas de la zona de inhibición se presentan en el Cuadro 13 y 14. En ella se observa *S. aureus* y *B. cereus* son las que presentan mayor sensibilidad al aceite esencial de salvia además las que muestran zonas de inhibición más grandes, en cambio *Salmonella spp.* y *E. coli* manifiestan Resistencia.

Patiño, (2003) menciona que, los antibióticos que actúan en un sector restringido (en grupos selectos de microorganismos), se les denomina de espectro limitado, por lo tanto el aceite esencial de *Salvia officinalis* variedad *alba*, es de espectro limitado.

Esto se puede fundamentar por lo mencionado por (Patiño, 2003), de que uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la destrucción de la membrana celular bacteriana mediante 3 posibles vías: Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica; Acción a través de la membrana, aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y; inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos, que impiden que una bacteria sea capaz de producir los componentes fundamentales de su material genético como el ADN que son los genes encargados de transmitir las características propias de cada especie bacteriana. Cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana.

Algunos autores como (Davidson, 1996; Nychas, 1995; Conner y Beuchat, 1984) han citado que la mayoría de los compuestos fenólicos atraviesan la membrana celular para interactuar con las enzimas y proteínas estructurales, afectando las actividades intracelulares. Los aceites esenciales pueden interferir en la producción de energía y en la síntesis de componentes esenciales.

Brooks, et al., (1999); menciona que la pared celular de las bacterias Gram positivas contiene un polímero complejo químicamente distinto “mucopéptido” (“mureina”, “peptidoglucano”) que consta de polisacáridos y un polipéptido con múltiples enlaces cruzados. Los polisacáridos regularmente contienen aminoazúcares N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico, este último solo se encuentra en las bacterias. Los aminoazúcares se encuentran adheridos a cortas cadenas de péptidos, por ello la acción de un antimicrobiano, la etapa inicial consiste en su enlace a receptores

probablemente de diferencias estructurales en su pared celular (por ejemplo, cantidad de peptidoglucano, presencia de receptores y lípidos, naturaleza de los enlaces cruzados, actividad de las enzimas autolíticas) las cuales determinan la penetración, el enlace y la actividad de estos antimicrobianos y la resistencia a estos puede ser determinada por la producción en el microorganismo de enzimas destructoras de los antimicrobianos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El rendimiento de aceite esencial de *Salvia Officinalis* variedad *alba* fue de 1,61%, usando la técnica de extracción por el método mixto (agua – vapor), el cual es similar al rendimiento citado por Sánchez et al., 2005, que relato valores de 1 – 2,5% siguiendo el método de arrastre de vapor.

El aceite esencial de salvia presentó; densidad, (0.9166g/ml); índice de refracción, (1.48); índice de acidez, (1.2332); índice de éster, (147.2625); índice de saponificación, (148.4957); solubilidad en etanol absoluto, 90, 80, 70%v/v, y como compuestos químicos activos que indican actividad antibacteriana a, cineol,(20%); limoneno,(9%); citral,(1.2%), los cuales determinan la calidad y pureza del aceite esencial.

Las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (gram positivas) fueron Sensibles al aceite esencial de *Salvia Officinalis* variedad *alba* en comparación con las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, (gram negativas) los cuales mostraron Resistencia.

Estadísticamente ($p < 0.05$) se obtuvo mejores resultados para el aceite esencial, 10 μ l, encapsulado en maltodextrina frente a *S. aureus* y *B. cereus*; presentando un Halo de Inhibición de 21.7 mm (T₁₃) y 21.3 mm (T₁₆) respectivamente, lo cual indicaría que estas bacterias son Sensibles al aceite de salvia; en tanto, no se evidenció formación de Halo en *Salmonella spp.* y *E. coli* que indicarían Resistencia frente al aceite esencial.

5.2. Recomendaciones

Es necesario realizar evaluaciones de mezclas de agentes antimicrobianos debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un sólo agente antimicrobiano, pero al exponerlo a una mezcla de estos aditivos se puede aumentar la actividad antibacteriana; ya que hay mayor probabilidad de que algunas colonias desarrollen resistencia a algunos antibacterianos cuando se usan de forma individual pero que no lo pueden desarrollar cuando se utilizan mezclas, y la capacidad de sinergismo que se ha encontrado en algunos estudios con diferentes microorganismos.

Se recomienda realizar investigaciones del aceite esencial de salvia en incorporaciones como películas comestibles combinado con encapsulantes (goma arábica, maltodextrinas, β - ciclodextrinas), CMC (carboximetilcelulosa), en frutas y hortalizas para prolongar la vida útil del producto, de la misma manera trabajar en incorporaciones en envases inteligentes, el cual contenga aceite de salvia encapsulado, que evite el deterioro de alimentos envasados, ya que este tiene capacidad antimicrobiano y antioxidante.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Albarracín y Gallo, 2003. Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad nacional de colombia. Trabajo de grado.

Bandoni, 2000. Los recursos vegetales en Latinoamérica. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. 410 p.

Boletín Epidemiológico – DIRESA (2011).

Calderón y Ponce, 2005. Microbiología de Aguas y Alimentos. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Perú.

Cantón, et al., 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología accesado en <http://www.seimc.org>

Cárdenas, et al., 2004. Estudio del Efecto de picado, la densidad de carga y el tiempo de extracción por arrastre con vapor sobre la composición y el rendimiento del aceite esencial de *Salvia officinalis*. Universidad Nacional de Santander. Congreso Latinoamericano de Química.

Cardona y Mejía, 2009. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *origanum vulgare* y *thymus vulgaris*. Universidad de Caldas. Colombia.

Chen, et al., 2003. Shikonin, a component of shinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* pág. 47.

Concepcion, et al., 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Universidad Autónoma Chapingo.

Domínguez, 1988. Métodos de investigación fotoquímica. México, pag. 229 – 281.

Doyle, et al., 2001. Microbiología de los alimentos; Fundamentos y Fronteras; Edit. Acribia; España

Escudero, A, 1999. Las Plantas de Extractos. Madrid.

Etherton, et al., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and shines.

Guenther, 1948. History – Origen in plants, Production – Analysis. La Florida, Pág. 236-263.

Guisado, et al., 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Pontificia universidad javeriana. Bogotá. Trabajo de grado.

Maguna, et al., 2006. Comunicaciones científicas y tecnológicas. ; Universidad nacional del nordeste. Argentina.

Mizrahi, Juárez y Bandoni, 1994. Contribución al estudio de la esencia de salvia (*Salvia officinalis*) de Argentina. Anales de SAIPA 9 – 10: 75 – 82.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar Volumen 22; número 1.

Risch y Reineccius, 1998. Flavor encapsulation. American Chemical Society, Washington, p180.

Pierozan, et al., 2009. Caracterización química y actividad antimicrobiana de aceites esenciales de distintas especies de salvia L. Ciencia y tecnología de alimentos. Universidad de Campiñas, Brasil.

Richardson, et al., 2008. «A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity.» accedido en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/18356528?dopt=Abstract&holding=f1000.f1000m.isrctn>. Consultado el 11 de julio de 2008.

Sánchez, et al., 2005. Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L. Revista Cubana Plantas Medicinales.

Santander, 2007. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia. Universidad industrial de Santander. Trabajo de grado.

Shahidi y Han, 1993. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

Vargas y Bottia, 2008. Estudio de la composición química de los Aceites esenciales de seis especies Vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón Colombia.

Yáñez, et al., 2005. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación, accesado en, info@mundoyalimentario.com

VII. ANEXOS

ANEXO 1:

A) Metodología para el análisis químico proximal de *Salvia Officinalis* variedad *alba*.

A.1. Determinación de la humedad

Descripción del método: Según AOAC, 930.15 (1990).

- Pesar la muestra en una placa petri limpia y seca, previamente tarada (2.1051g de salvia).
- Colocar en una estufa por 3h a 105 °C.
- Enfriar en el desecador por 30 minutos y pesar.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = ((P1 - P2)/M) * 100$$

Donde:

P1: Peso de la placa mas la muestra húmeda, en gramos.

P2: Peso de la placa mas la muestra seca, en gramos.

M: Peso de la muestra en gramos.

A.2. Determinación de proteínas

Descripción del método kjeldahl recomendado por AOAC, 930.19 (1990).

Digestión:

- Pese exactamente 0.15g de muestra en un matraz de micro-Kjeldahl cuidando que la muestra no se adhiera a las paredes o al cuello del matraz.
- Añada 2.5ml. de H₂SO₄, dos perlas de ebullición y aproximadamente 1.0g de mezcla catalizadora.
- Someta a digestión la muestra en el aparato de microKjeldahl bajo una campana de extracción, con el matraz ligeramente inclinado usando baja temperatura al

inicio y aumentando el calor a medida que procede la digestión, rotando los matraces de vez en cuando para asegurarse de que se digiera toda la muestra. La digestión terminará cuando el color de la muestra sea azul- verde claro. El proceso tomará aproximadamente 90 minutos.

- Enfríe el matraz durante unos 4 minutos para que no se endurezca al solidificarse la muestra.
- Añada 7 ml. de H₂O cuidadosamente, poco a poco, a la muestra digerida. Mezcle y permítale enfriarse.

Destilación:

- Encienda la unidad destiladora.
- Si es posible ajuste la velocidad de destilación a aproximadamente 5 ml. por minuto
- Abra la llave del agua para tener H₂O circulando por el refrigerante todo el tiempo.
- Añada la muestra a la cámara de ebullición por medio de un embudo (para recuperar las perlas de ebullición) y enjuague el matraz con aproximadamente 5ml. de H₂O destilada.
- Coloque 1 frasco Erlenmeyer con 10 ml de ácido bórico y 2 gotas de indicador bajo la salida de destilación.
- Añada aproximadamente 10 ml. de la solución de NaOH a la cámara de ebullición lentamente. La mezcla digerida se tornará oscura (azul-grís o café oscuro). Si no cambia de color añada más NaOH.
- Deje un poco de NaOH en la copita superior del destilador.
- Colecte aproximadamente 20 ml. del destilado (4-5 minutos). El destilado estará listo para ser titulado cuando se torna verde en el matraz receptor.

- Retire el matraz de Erlenmeyer y limpie la unidad destiladora enjuagando la cámara de ebullición varias veces con agua destilada. Cada vez que se añada agua destilada hasta llenar la copita superior de la unidad destiladora para el enjuague deje que ésta hierva primero. Luego abra la llave de la parte que permite salir las muestras hacia fuera de la unidad destiladora. Una vez vacía la parte en donde se procesa la muestra asegúrese de que esté bien vacía. Si queda todavía un poco de agua en el fondo permita que hierva para que se vaya toda hacia esa segunda parte de la unidad destiladora. El matraz estará listo para recibir la segunda cantidad de agua destilada para lavar la unidad destiladora. Esta operación se repite al menos unas 4 veces.

Titulación:

- Titule la muestra con 0.1N de HCl. Un color violeta indica el punto final de la titulación. Compárese este color con el del blanco. Cada equivalente del HCl usado corresponde a un equivalente de NH_3 o a un equivalente de N en la muestra original. El peso del N en mg está dado por miliequivalentes del ácido $\times 14$ (el peso equivalente del N).

Recuperación del amoníaco:

- Una posible fuente de variación en este método es la pérdida del gas amoníaco o una falla en atrapar el amoníaco en el ácido bórico. Esto puede ocurrir en diferentes pasos del proceso. Una técnica para buscar la recuperación del amoníaco consiste en destilar cantidades conocidas de amoníaco líquido y titularlo con HCl. Se obtendrá otra vez el color púrpura en el ácido bórico.
- Mientras se digieren las muestras, se puede destilar una solución de sulfato de amonio. Añada 5, 10 ó 15 ml (mediante una pipeta) de solución de sulfato de amonio a la cámara de ebullición de la unidad destiladora. Enjuáguela después

con agua destilada y, si es posible, desionizada. Coloque inmediatamente la punta de la unidad destiladora en 10 ml de ácido bórico + indicador. Colecte aproximadamente 20 ml. de destilado.

- Titule la muestra con el HCl estandarizado, registre los ml. de HCl empleados y calcule el peso del nitrógeno en el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Cálculos

$$\% \text{ Proteínas} = ((V - VB)/M) * 1,4007 * N * F * 100$$

Donde:

V: Volumen de ácido consumido durante la valoración de la muestra, (mililitros)

VB: Volumen de ácido consumido durante la valoración del blanco, (mililitros).

N: Normalidad del ácido titulante.

M: masa de la muestra (gramos).

F: Factor de proteína igual a 5,70.

A.3. Determinación de grasas

Descripción del método de Soxhlet, recomendado por AOAC, 930.19 (1990).

- Moler la muestra.
- Pesar en duplicado 2 a 5 gramos de muestra preparada en el dedal de extracción o papel filtro previamente pesado y tapado con algodón desgrasado. Registrar "m", peso inicial de la muestra.
- Secar el matraz de extracción por 30 min a 103°C.
- Pesar el matraz de extracción Registrar "m1".
- Poner el matraz de extracción en el sistema soxhlet el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz.
- Extraer la muestra con el solvente por 4 a 5 horas a una velocidad de

condensación de 3-6 gotas/seg.

- Una vez terminada la extracción eliminar el solvente por evaporación en rotavapor o baño María bajo campana. Hasta que no se detecte olor a éter.
- Secar el matraz con la grasa en estufa a 103± 2°C por 10 min, enfriar en desecados y pesar. Registrar "m2".

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa} = ((m1 - m2)/m) * 100$$

Donde:

m: Peso de la muestra

m1: Tara del matraz solo

m2: Peso matraz con grasa.

A.4. Determinación de cenizas

Descripción del método: Según AOAC, 7009.14 (1984).

- Pesar el crisol, previamente secado en la estufa y enfriar en el secador.
- Pesar en el crisol 1g de muestra e incinerar en la cocinilla eléctrica hasta total carbonización.
- Colocar la muestra en la mufla y calcinar a 550 – 600°C por 3 a 5 horas.
- Retirar el crisol de la mufla y colocar en el desecador, enfriar 30 minutos a temperatura ambiente y pesar el residuo.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = ((P1 - P2)/M) * 100$$

Donde:

P1: Peso del crisol vacío en gramos.

P2: Peso del crisol mas ceniza en gramos.

M: Peso de muestra en gramos.

B) Métodos de análisis físicos del aceite esencial de *Salvia Officinalis* variedad *alba*.

B.1. Determinación de la densidad

Descripción del método: Según NTP 319.081:1974.

Antes de utilizar el picnómetro debe ser lavado cuidadosamente con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, luego enjuagarlo meticulosamente con agua corriente y después agua destilada. Finalmente se debe secar en la estufa, enfriado en un desecador conteniendo material deshidratante.

- Pesar el picnómetro limpio y seco (W1).
- Llenar el picnómetro con agua destilada recientemente hervida (libre de aire) y enfriada 2 a 3 grados por debajo de la temperatura a la cual se va determinar la gravedad específica.
- Colocar la tapa del picnómetro y colocarlo en baño maría mantenida a la temperatura deseada (20 °C).
- Parte del agua saldrá por el capilar de la tapa, esto permite asegurar el llenado.
- Después que el picnómetro y su contenido han alcanzado su temperatura de baño, el agua que rebalsa a través de la tapa debe ser limpiado rápidamente con el papel filtro, evitando que el papel absorba parte del agua del picnómetro.
- Retirar el picnómetro del baño maría y secarlo con una toallita.
- Colocar la cubierta o capuchón sobre la tapa tan pronto se retire el picnómetro del baño para evitar la evaporación.

- Después que el exterior del picnómetro ha sido secado, pesar el picnómetro conteniendo el agua de inmediato (W2).
- Proceder de la misma manera con el aceite esencial cuya densidad específica se desee determinar.

Cálculos:

$$\text{Densidad específica} = (W3 - W1) / (W2 - W1)$$

Donde:

W1: Peso del picnómetro vacío en gramos.

W2: Peso del picnómetro mas agua destilada en gramos.

W3: Peso del picnómetro mas el aceite esencial a una temperatura de 20 ° C.

B.2. Determinación del índice de refracción

Descripción del método: Según NTP 319.075:1974,

- Colocar el refractómetro ABBE de mesa y manual en un lugar iluminado con luz difusa o frente a una fuente de luz artificial.
- Ajustar el instrumento colocando unas gotas de agua destilada entre los prismas. El índice de refracción deberá ser 1,3330; si no es así corregir adecuadamente la lectura.
- Con la ayuda de un gotero colocar la muestra sobre el prisma del refractómetro.
- Medir y registrar la concentración de azúcar de la muestra (°Brix), y el índice de refracción, a 20 °C de temperatura.
- Lavar bien el prisma del refractómetro ABBE.

B.3. Determinación del índice de acidez

Descripción del método: Según NTP 319.085:1974.

- Pesar 4g de muestra debidamente homogenizada en un erlenmeyer de 250ml.
- Añadir 50ml de alcohol neutralizado calentar en baño maría agitando y agregar unas gotas de indicador de fenolftaleína.
- Titular con NaOH 0.1N hasta un ligero color rosa.
- Anotar el gasto de álcali y calcular el índice de acidez.

Cálculos:

$$\text{Índice de acidez} = (G \times N \times 56.1) / W$$

$$\% \text{ A.G.L} = (G \times N \times 28.2) / W$$

Donde:

A.G.L: Ácidos grasos libres.

G: Gasto de hidróxido de sodio a 0.1N.

N: Normalidad.

W: Peso de la muestra.

B.4. Determinación del índice de éster

Descripción del método: Según NTP 319.088:1974.

- Colocar 2g de muestra de aceite esencial en un matraz de saponificación y añadir 5 ml de etanol al 90% y 5 gotas de indicador de fenolftaleína.
- Titular la acidez libre con solución de KOH 0.1 molar, hasta que vire a color rosa (T1).
- Añadir 20 ml de solución alcohólica de KOH 0.5 molar al líquido neutralizado y hervir a reflujo durante 1 hora.
- Añadir 5 gotas de fenolftaleína y titular con HCl a 0.5 molar (T2), hasta que vire de color blanco.

- Realizar otra determinación pero sin considerar la muestra (T3).

Cálculos:

$$\text{Índice de éster} = (T3 - T2) \times 28.05 / W$$

Donde:

T1: Gasto de hidróxido de sodio a 0.1 N para determinar la acidez.

T2: Gasto de HCl a 0.5 molar considerando la muestra.

T3: Gasto de HCl a 0.5 molar sin considerar la muestra (blanco).

W: Peso de muestra.

B.4. Determinación del índice de saponificación

Se puede calcular sumando el índice de éster y el índice de acidez; Según NTP 319.089:1974.

$$\text{Índice de saponificación} = \text{Índice de éster} + \text{Índice de acidez}$$

ANEXO 2:

PROCESAMIENTO DE DATOS

A continuación se presentan la tabla de los datos, que se obtuvo durante las corridas realizadas.

Cuadro 17: Tamaño de Halos de Inhibición para cada tratamiento.

Aceite esencial	Cepas bacterianas											
	<i>S. aureus</i>			<i>B. Cereus</i>			<i>Salmonella spp.</i>			<i>E. Coli</i>		
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración		
	(μl)			(μl)			(μl)			(μl)		
	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)											
	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5
Aceite esencial	22	15	12	14	12	11	0	0	0	0	0	0
puro	19	18	13	14	11	12	0	0	0	0	0	0
	21	20	12	15	11	11	0	0	0	0	0	0
\bar{X}	20.7	17.7	12.3	14.3	11.3	11.3	0	0	0	0	0	0
Aceite esencial +	20	20	13	21	19	18	0	0	0	0	0	0
encapsulante	23	18	12	24	16	16	0	0	0	0	0	0
	22	15	15	19	18	15	0	0	0	0	0	0
\bar{X}	21.7	17.7	13.3	21.3	17.7	16.3	0	0	0	0	0	0

Cuadro 18: Promedio de Halos de Inhibición para cada tratamiento, codificados.

Aceite esencial	Especies bacterianas											
	<i>S. aureus</i>			<i>B. Cereus</i>			<i>Salmonella spp.</i>			<i>E. Coli</i>		
	Concentración			Concentración			Concentración			Concentración		
	(μl)			(μl)			(μl)			(μl)		
	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)											
	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5	10	5	2.5
Aceite esencial	20.7	17.7	12.3	14.3	11.3	11.3	0	0	0	0	0	0
puro	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
	21.7	17.7	13.3	21.3	17.7	16.3	0	0	0	0	0	0
Aceite esencial +	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆	T ₁₇	T ₁₈	T ₁₉	T ₂₀	T ₂₁	T ₂₂	T ₂₃	T ₂₄
encapsulante												

Donde:

A: Tipo de bacteria

B: Concentración

C: Aceite esencial

Desarrollo del ANVA

1. Factor de Corrección:

$$FC = \frac{(\sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j \sum_{k=1}^k \sum_{l=1}^l Y_{ijkl})^2}{abcn}$$

$$FC = \frac{(22 + 19 + \dots 0 + 0)^2}{4 * 3 * 2 * 3}$$

$$FC = 4785,68$$

2. Suma de Cuadrados Totales:

$$SC_T = \sum_{l=1}^4 \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^3 Y_{ijkl}^2 - FC$$

$$SC_T = 22^2 + 19^2 + 21^2 + \dots \dots \dots + 0^2 + 0^2 - 4785,68$$

$$SC_T = 5319,32$$

3. Suma de cuadrados de bacterias:

$$SC_A = \sum_{i=1}^4 \frac{y_{i\dots}^2}{bcn} - FC$$

$$SC_A = \frac{310^2}{18} + \frac{277^2}{18} + \frac{0^2}{18} + \frac{0^2}{18} - 4785,68$$

$$SC_A = 4815,93$$

4. Suma de cuadrados de la concentración:

$$SC_B = \sum_{j=1}^3 \frac{y_{i\dots}^2}{acn} - FC$$

$$SC_B = \frac{(127 + 107 + 0 + 0)^2}{24} + \frac{(106 + 87 + 0 + 0)^2}{24} + \frac{(77 + 83 + 0 + 0)^2}{24} - 4785,68$$

$$SC_B = 114,53$$

5. Suma de cuadrados de Aceite Esencial:

$$SC_C = \sum_{k=1}^2 \frac{y_{i...}^2}{abn} - FC$$

$$SC_C = \frac{263^2}{36} + \frac{324^2}{36} - 4785,68$$

$$SC_C = 51,68$$

6. Suma de Cuadrados de interacción de microorganismo y concentración (AB)

$$SC_{AB} = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^3 \frac{y_{n...}^2}{cn} - FC - SC_A - SC_B$$

$$SC_{AB} = \frac{127^2}{6} + \frac{106^2}{6} + \frac{77^2}{6} + \frac{107^2}{6} + \frac{87^2}{6} + \frac{83^2}{6} + \frac{0^2}{6} + \frac{0^2}{6} + \frac{0^2}{6} + \frac{0^2}{6} + \frac{0^2}{6} + \frac{0^2}{6} - 4785,68 - 4815,93 - 114,53$$

$$SC_{AB} = 150,69$$

7. Suma de cuadrados de interacción de microorganismo y aceite esencial (AC)

$$SC_{AC} = \sum_{i=1}^2 \sum_{k=1}^2 \frac{y_{n...}^2}{bn} - FC - SC_A - SC_C$$

$$SC_{AC} = \frac{152^2}{9} + \frac{158^2}{9} + \frac{111^2}{9} + \frac{166^2}{9} + \frac{0^2}{9} + \frac{0^2}{9} + \frac{0^2}{9} + \frac{0^2}{9} - 4785,68 - 4815,93 - 51,68$$

$$SC_{AC} = 118,38$$

8. Suma de cuadrados de interacción concentración y aceite esencial (BC)

$$SC_{BC} = \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^2 \frac{y_{n...}^2}{an} - FC - SC_B - SC_C$$

$$SC_{BC} = \frac{105^2}{12} + \frac{87^2}{12} + \frac{71^2}{12} + \frac{129^2}{12} + \frac{106^2}{12} + \frac{89^2}{12} + \frac{0^2}{12} + \frac{0^2}{12} + \frac{0^2}{12} + \frac{0^2}{12} + \frac{0^2}{12} + \frac{0^2}{12}$$

$$- 4785,68 - 114,53 - 51,68$$

$$SC_{BC} = 0,86$$

9. Suma de cuadrados de la interacción de microorganismo, concentración y aceite esencial (ABC)

$$SC_{ABC} = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^2 \frac{y_{i...}^2}{n} - FC - SC_A - SC_B - SC_C - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC}$$

$$SC_{ABC} = \frac{62^2}{3} + \frac{53^2}{3} + \frac{37^2}{3} + \frac{43^2}{3} + \frac{34^2}{3} + \frac{34^2}{3} + \frac{65^2}{3} + \frac{53^2}{3} + \frac{40^2}{3} + \frac{64^2}{3} + \frac{53^2}{3}$$

$$+ \frac{49^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3} + \frac{0^2}{3}$$

$$- 4785,68 - 4815,93 - 114,53 - 51,68 - 150,69 - 118,38 - 0,86$$

$$SC_{ABC} = 3,25$$

10. Suma de cuadrados del error

$$SC_E = SC_T - SC_A - SC_B - SC_C - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC} - SC_{ABC}$$

$$SC_E = 5319,32 - 4815,93 - 114,53 - 51,68 - 150,69 - 118,38 - 0,86 - 3,25$$

$$SC_E = 64$$

11. A continuación se presenta la tabla de análisis de varianza obtenida mediante los cálculos realizados anteriormente.

Cuadro 19: Tabla de Análisis de Varianza (ANVA)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadros	Medias de Cuadrados	F_{calculada} (F_o)	F_{tabular}	Significancia
Bacteria (A)	3	4815,93	1605,31	1203,98	2,81	**
Concentración (B)	2	114,53	57,26	42,95	3,198	**
Aceite esencial (C)	1	51,68	51,68	38,76	4,048	**
Bacteria x Concentración (AxB)	6	150,69	25,12	18,84	2,304	**
Bacteria x Aceite esencial (AxC)	3	118,37	39,46	29,59	2,81	**
Concentración x Aceite esencial (BxC)	2	0,86	0,43	0,32	3,198	N.S
Bacteria x Concentración x Aceite esencial (AxBxC)	6	3,25	0,54	0,41	2,304	N.S
Error	48	64,00	1,33			
total	71	5319,32	74,92			

Prueba de TUKEY

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{CME}{r}}$$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1.33}{3}} = 0.67$$

Valores de “q” en las tablas respectivas al valor de 5%:

q (5%) con 24 Tratamientos y 48 Grados de libertad = 5.46

Como ya se tiene entendido, el nivel de significación a detectar por la prueba de Tukey (DSH), esta dado por el valor hallado en la tabla respectiva. Así el producto de (q) al 5% con la desviación estándar de los promedios nos dará DSH para detectar diferencias con un nivel de significación del 5%.

$$DSH_{(T)5\%} = 5.46 * 0.67 = 3.66, \text{aproximadamente, } 4$$

Cuadro 20: Ordenando promedios.

Orden de merito	Tratamiento	Tamaño de Halo de Inhibición
I	T ₁₃	21.7
II	T ₁₆	21.3
III	T ₁	20.7
IV	T ₂	17.7
V	T ₁₄	17.7
VI	T ₁₇	17.7
VII	T ₁₈	16.3
VIII	T ₄	14.3
IX	T ₁₅	13.3
X	T ₃	12.3
XI	T ₅	11.3
XII	T ₆	11.3
XIII	T ₇	0
XIV	T ₈	0
XV	T ₉	0
XVI	T ₁₀	0
XVII	T ₁₁	0
XVIII	T ₁₂	0

XIX	T ₁₉	0
XX	T ₂₀	0
XXI	T ₂₁	0
XXII	T ₂₂	0
XXIII	T ₂₃	0
XXIV	T ₂₄	0

Se establece el grupo de comparaciones: En esta comparación observamos que la diferencia de los promedios de los Halos de Inhibición de I – XXIV, sobrepasa el límite (DHS) establecido para el 5%, se le asigna con doble asterisco.

Conclusión: En la presente comparación concluimos que el tratamiento T₁₃ contiene mayor Halo de Inhibición.

Siguiendo con las comparaciones tendremos el siguiente panorama:

I – XXIV:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XXIII:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XXII:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XXI:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XX:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XIX:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XVIII:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XVII:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XVI:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XV:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XIV:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I – XIII:	$(21.7 - 0) = 21.7$, mayor a 3.66	**
I - XII :	$(21.7 - 11.3) = 10.4$, mayor a 3.66	**
I – XI :	$(21.7 - 11.3) = 10.4$, mayor a 3.66	**
I – X :	$(21.7 - 12.3) = 9.4$, mayor a 3.66	**

I – IX :	$(21.7 - 13.3) = 8.4$, mayor a 3.66	**
I – VIII:	$(21.7 - 14.3) = 7.4$, mayor a 3.66	**
I – VII :	$(21.7 - 16.3) = 5.4$, mayor a 3.66	**
I – VI :	$(21.7 - 17.3) = 4.4$, mayor a 3.66	**
I – V :	$(21.7 - 17.7) = 4.0$, mayor a 3.66	**
I – IV :	$(21.7 - 17.7) = 4.0$, mayor a 3.66	**
I – III :	$(21.7 - 20.7) = 1.0$, menor a 3.66	N.S
I – II :	$(21.7 - 21.3) = 0.4$, menor a 3.66	N.S

Conclusión: En este grupo de comparaciones, donde hemos contrastado el promedio que ocupa el primer lugar en orden de meritos es el tratamiento ($T_{13} = 21.7$ mm de Halo) con otros promedios, encontramos que dicho tratamientos es superior estadísticamente y con un 95% de seguridad y 5% de probabilidad de error. El mismo tratamiento ($T_{13} = 21.7$ mm de Halo), tiene igual tamaño de Halo de Inhibición que el tratamiento ($T_1 = 20.7$ mm de Halo), para *S. aureus*, ($T_{16} = 21.3$ mm de Halo) para *B. cereus* y (T_2, T_{14}, T_{17}). La diferencia numérica en los tamaños de Halo de Inhibición se atribuye a un error experimental.

Del mismo modo podemos establecer otro grupo de comparaciones e indicar la superioridad o igualdad del tamaño de Halo de Inhibición con los tratamientos que le sigue.

II – XXIV:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XXIII:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XXII:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XXI:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XX:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XIX:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**

II – XVIII:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XVII:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XVI:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XV:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XIV:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II – XIII:	$(21.3 - 0) = 21.3$, mayor a 3.66	**
II - XII:	$(21.3 - 11.3) = 10.0$, mayor a 3.66	**
II – XI :	$(21.3 - 11.3) = 10.0$, mayor a 3.66	**
II – X :	$(21.3 - 12.3) = 9.0$, mayor a 3.66	**
II – IX :	$(21.3 - 13.3) = 8.0$, mayor a 3.66	**
II – VIII:	$(21.3 - 14.3) = 7.0$, mayor a 3.66	**
II – VII:	$(21.3 - 16.3) = 5.0$, mayor a 3.66	**
II – VI :	$(21.3 - 17.3) = 4.0$, mayor a 3.66	**
II – V :	$(21.3 - 17.7) = 3.60$, menor a 3.66	N.S
II – IV :	$(21.3 - 17.7) = 3.60$, menor a 3.66	N.S
II – III :	$(21.3 - 20.7) = 0.60$, menor a 3.66	N.S

Conclusiones: De este grupo de comparaciones deducimos que; el tratamiento ($T_1 = 21.3$ mm de Halo), para *S. aureus* y ($T_{16} = 20.7$ mm de Halo) para *B. cereus*), tiene mayor tamaño de Halo de Inhibición que los tratamientos ($T_6, T_5, T_3, T_{15}, T_4, T_{18}$), y los tratamientos que dieron como resultado cero, con una seguridad del 95% y un error del 5%. Sin embargo tiene igual tamaño de Halo de Inhibición que los tratamientos (T_2, T_{14}, T_{17}) por cuanto las diferencias con estos promedios no sobrepasan el valor DSH.

Del mismo modo podemos establecer otro grupo de comparaciones e indicar la superioridad o igualdad del tamaño de Halo de Inhibición con los tratamientos que le sigue.

III – XXIV:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XXIII:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XXII:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XXI:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XX:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XIX:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XVIII:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XVII:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XVI:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XV:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XIV:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XIII:	$(20.7 - 0) = 20.7$, mayor a 3.66	**
III – XII:	$(20.7 - 11.3) = 9.4$, mayor a 3.66	**
III – XI:	$(20.7 - 11.3) = 9.4$, mayor a 3.66	**
III – X:	$(20.7 - 12.3) = 8.4$, mayor a 3.66	**
III – IX:	$(20.7 - 13.3) = 7.4$, mayor a 3.66	**
III – VIII:	$(20.7 - 14.3) = 6.4$, mayor a 3.66	**
III – VII:	$(20.7 - 16.3) = 4.4$, mayor a 3.66	**
III – VI:	$(20.7 - 17.3) = 3.4$, menor a 3.66	N.S
III – V:	$(20.7 - 17.7) = 3.0$, menor a 3.66	N.S
III – IV:	$(20.7 - 17.7) = 3.0$, menor a 3.66	N.S

En forma sintética, podemos presentarlo de la siguiente manera:

Cuadro 21: Síntesis del análisis estadístico de Tukey.

Orden de	Tratamiento	Tamaño de Halo de Inhibición	5%
I	T ₁₃	21.7	
II	T ₁	21.3	
III	T ₁₆	20.7	
IV	T ₂	17.7	
V	T ₁₄	17.7	
VI	T ₁₇	17.3	
VII	T ₁₈	16.3	
VIII	T ₄	14.3	
IX	T ₁₅	13.3	
X	T ₃	12.3	
XI	T ₅	11.3	
XII	T ₆	11.3	

Conclusión General: El mejor tratamiento según el análisis de ANVA y Tukey el tratamiento adecuado es T₁₃ para el caso de *S. aureus*, y T₁₆ para *B. cereus* que es un aceite esencial encapsulado en maltodextrina con una concentración de 10µl, el cual se selecciona según los resultados de comparación de medias de Tukey ya que demuestra una seguridad al 95% y 5% de probabilidad de error.