

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC.**

Facultad de Ingeniería

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE LOS
ACEITES ESENCIALES DE ANÍS (*Pimpinella Anisum L*) ECOTIPO
CURAHUASI Y ECOTIPO BOLIVIANO EN TRES CEPAS DE INTERÉS
ALIMENTARIO**

TESIS:

Presentado por:

Bach. Jhon Henry Sierra Yopez

Para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial

Abancay – Perú

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA

AGROINDUSTRIAL



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE LOS
ACEITES ESENCIALES DE ANÍS (*Pimpinella Anisum L*) ECOTIPO
CURAHUASI Y ECOTIPO BOLIVIANO EN TRES CEPAS DE INTERÉS
ALIMENTARIO**

Tesis para optar el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presentado por:

JHON HENRRY SIERRA YEPEZ

Sustentado y aprobado por el honorable jurado, conformado por:

M.Sc Fulgencio Vilcanqui Pérez
Presidente

Blgo. Prifon Oros Huayhua
Primer Miembro

Ing. Lourdes Salcedo Sucasaca
Segundo Miembro



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecimiento especial a mis padres Demetrio Sierra Oyola y Clara Yopez Cuellar por ser fuente de mi inspiración, a mis hermanos que me enseñaron que nada es imposible lograr si uno se propone.

A mi asesora de tesis la Mg. Ing. Guadalupe Chaquilla Quilca, por su constante apoyo y asesoramiento en el desarrollo de la investigación y al Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres por todo el apoyo prestado.

Así mismo quiero agradecer a todos los docentes y personal administrativo de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, que siempre me apoyaron desinteresadamente con sus ideas y facilitando los ambientes adecuados haciendo que mi trabajo de tesis resulte fácil e interesante.



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de anís (*Pimpinella anisum* L.) de los ecotipos Curahuasi y Boliviano, el cual se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua; posteriormente fue sometido a un análisis para la determinación de su composición química por medio del Cromatógrafo de gases (EM/CG) y por el método de difusión en agar se evaluó la actividad antimicrobiana frente al *E. coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp*; bajo el diseño experimental fue de los factores de ecotipo y concentración.

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L.) ecotipos Curahuasi y Boliviano fueron evaluados *in vitro*, con las pruebas de inhibición del crecimiento de los microorganismos de *E Coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp*, después de las 24 horas de incubación se midió los halos de inhibición para cada microorganismo.

En resumen también es necesario mencionar que las características del aceite esencial de anís, donde el mejor halo de inhibición contra *E Coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp*, fue el tratamiento T3 con un halo de inhibición de 13 mm, 12 mm y 13 mm respectivamente para cada microorganismo que corresponde al Ecotipo Curahuasi con la concentración de 10000 ppm para cada mejor tratamiento.

Haciendo una comparación de la variable ecotipo donde los dos ecotipos tuvieron efecto antimicrobiano a mayor concentración siendo el mejor el aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the in vitro antimicrobial activity of essential oils of anise (*Pimpinella anisum* L.) of Bolivian Curahuasi and ecotypes, which was obtained by the method by steam distillation of water; was subsequently subjected to an analysis to determine their chemical composition through the gas chromatograph (EM / CG) and by the agar diffusion method was evaluated for antimicrobial activity against *E. coli*, *Salmonella typhi* and *Penicillium* sp; under the design with factors ecotype (2 levels) and concentration (3 levels).

The antimicrobial effect of the essential oil of anise (*Pimpinella anisum* L.) ecotypes Boliviano Curahuasi and were evaluated in vitro, with evidence of inhibition of growth of microorganisms in *E coli*, *Salmonella typhi* and *Penicillium* sp, after 24 hours of incubation the zones of inhibition for each microorganism, generally the best antimicrobial effect was conducted at concentrations of 10,000 ppm, 5000 ppm and 3000 ppm in both cases, making a comparison of the variable ecotype where the two ecotypes were antimicrobial effect greater measured concentration remains the best essential oil of anise Curahuasi ecotype.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO REFERENCIAL	3
2.1.	Antecedentes	3
2.2.	Bases teóricas.....	4
2.2.1.	Anís	4
2.2.2.	Clasificación taxonómica.....	6
2.2.3.	Características botánicas.....	7
2.2.3.1.	La raíz.....	7
2.2.3.2.	El tallo	7
2.2.3.3.	Las hojas.....	7
2.2.3.4.	La inflorescencia	7
2.2.3.5.	La flor	8
2.2.3.6.	El fruto.....	8
2.2.4.	Composición química del fruto del anís.....	8
2.2.5.	Descripción genérica de los dos cultivares de anís presentes en Curahuasi	9
2.2.5.1.	Ecotipo Curahuasi	9
2.2.5.2.	El ecotipo Boliviano.....	9
2.2.6.	Niveles de rendimiento	10
2.2.7.	Aceites esenciales.....	11
2.2.8.	Composición química.....	12
2.2.9.	Propiedades físicas de los aceites esenciales.....	14
2.2.10.	Deterioro de alimentos por microorganismos	15
2.2.11.	Microorganismos responsables del deterioro de alimentos	16
2.2.11.1.	<i>Escherichia coli</i>	16
2.2.11.1.1.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	17
2.2.11.1.2.	Asociación con alimentos	18
2.2.11.1.3.	Enfermedades producidas por el <i>E. coli</i>	19
2.2.11.2.	<i>Salmonella</i>	19
2.2.11.2.1.	Aislamiento e identificación <i>Salmonella</i>	21
2.2.11.2.3.	Enfermedades causadas por las salmonellas.....	25
2.2.11.3.	<i>Penicillium sp</i>	26
2.2.12.	Microorganismos y alimentos.....	26
2.2.13.	Constituyentes antimicrobianos	27
2.2.14.	Conservadores químicos.....	27

2.2.14.1.	Conservadores naturales de los alimentos	28
2.2.14.2.	Dióxido de azufre.....	28
2.2.14.3.	Nitrito	29
2.2.14.4.	Ácidos orgánicos y esteres.....	29
2.2.15.	Espicias como agentes antimicrobianos.....	30
2.3.	Marco conceptual.....	30
III.	MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1.	Materiales	31
3.1.1.	Lugar de desarrollo experimental	31
3.1.2.	Semilla de anís.....	31
3.1.3.	Cepas microbianas	32
3.1.4.	Equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo.....	32
3.1.4.1.	Equipos.....	32
3.1.4.2.	Materiales.....	33
3.1.4.3.	Reactivos.....	34
3.1.4.4.	Medio de cultivo.....	34
3.2.	Método de investigación	34
3.2.1.	Tipo y nivel de investigación.....	34
3.2.2.	Diseño de la investigación	35
3.2.3.	Población y muestra.....	36
3.2.3.1.	Población.....	36
3.2.3.2.	Muestra.....	36
3.2.4.	Procedimiento de recojo de datos	36
3.2.4.1.	Extracción del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano 36	
3.2.4.2.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano, método de difusión en discos.....	39
3.2.4.3.	Preparación de inóculos bacterianos y procedimiento	40
3.2.5.	Tratamiento de datos	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
4.1.	Resultados.....	43
4.1.1.	Componentes químicos del aceite esencial	43
4.1.2.	Evaluación de efectos de los tratamientos.....	45
4.1.2.1.	Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano sobre <i>E.coli</i>	45
4.1.2.2.	Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano sobre <i>Salmonella typhi</i>	49

4.1.2.3. Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano sobre <i>Penicillium sp.</i>	53
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
5.1. Conclusiones.....	57
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	59



I. INTRODUCCIÓN

Muchas especies vegetales producen aceites esenciales los cuales juegan un papel importante como mecanismo de defensa contra diferentes microorganismos, ya que presentan diversos compuestos a quienes se les atribuye actividad antimicrobiana. La necesidad de reducir el deterioro de alimentos por causa de microorganismos, así como aumentar el tiempo de vida útil ha incrementado el interés por la posible aplicación de aceites esenciales y sus compuestos como conservadores y/o preservantes naturales.

Curahuasi es el principal valle productor de anís (*Pimpinella anisum L.*) en el Perú, ya que representa el 96 % de la producción nacional, se encuentran adaptados dos ecotipos, el ecotipo Curahuasi variedad rey que fue introducido entre los años 1650 y 1655 por los religiosos españoles y el ecotipo Boliviano introducido recientemente entre 1993 y 1994 (Huacac, 2007).

El ecotipo Curahuasi, es una planta de porte bajo, que se adapta entre los 2500 a 2600 msnm; sin embargo por su mayor contenido de aceite esencial, tiene mayor fragancia y sabor (Huacac, 2007).

El poder antimicrobiano del aceite esencial de anís se deriva de terpenoides y compuestos fenólicos que determinan su actividad antimicrobiana, así mismo los productores aniceros por falta de conocimiento no le dan un debido uso ya que no existen estudios más amplios de esta planta, lo cual mejoraría la calidad de vida de los productores.

El aceite esencial del anís ecotipos Curahuasi y ecotipo Boliviano contiene propiedades antimicrobianas, su posterior evaluación y análisis en diferentes métodos, así como su aplicación en la conservación natural de los alimentos, permitirá darle

mayor utilidad y por ende valor agregado con el consecuente beneficio de los productores aniceros de la región de Apurímac.

Al determinar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y Boliviano contra tres cepas bacterianas se determinara la concentración mínima del aceite esencial capaz de inhibir a las bacterias y demostrar su efecto bactericida.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano en tres diferentes concentraciones sobre *E coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp.* con los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las características químicas mediante el perfil cromatográfico de los aceites esenciales del anís (*Pimpinella anisum* L.) ecotipo Curahuasi y Boliviano.
- Determinar la concentración optima del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L.) y ecotipos Curahuasi y Boliviano que mayor inhibe la actividad microbiana frente al *E coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp.*

II. MARCO REFERENCIAL

2.1. Antecedentes

Segovia y Suarez (2010), realizaron una investigación con la finalidad de determinar cualitativamente los componentes químicos, así como las actividades antimicrobiana, antifúngica y antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” frente a los siguientes microorganismos: *Saureus Atcc 25933*, *S epidermidis*, *E coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* y *C. albicans*, en cuyas pruebas el aceite esencial evidenció actividad antibacteriana frente a cinco cepas; llegando a la conclusión que el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antibacteriana significativa frente a los siguientes microorganismos: *staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomona aureoginosa*, así mismo presentó actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans*.

Carhuapoma y Lopez (2009), realizaron una investigación con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, para *S. dysenteriae* 21,41 mm; *H. pylori* 17,07 mm; *S. typhi* 14,25 mm y *P. aeruginosa* 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI).

Sanchez y Bedoya (2002), evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial extraído de *Aloysia tripilla* (Cedrón) sobre cepas bacterianas causantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las cepas susceptibles a la acción del aceite esencial fueron *S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, llegando a la conclusión que el aceite esencial de *aloyisia tripilla* conocida comúnmente como cedron, presenta

actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas típicas de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como *listeria monocytogenes*, *E coli*, *bacillus cereus* y *staphylococcus aureus*.

Alzamora, Morales , Armas , y Fernandez (2001), investigaron cualitativa de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú: *Eucalyptus globulus*, Labill .eucalipto.; *Cymbopogon citratus*, (D.C.) Staff .hierba luisa.; *Tagetes pusilla* Lag. .Anís serrano.; *Senecio tephrosioides*, Turcz .huamanripa. y *Lepechinia meyenii*, (Walp) Epling .salvia. se enfrentaron a *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P y *Candida albicans* ATCC 10231. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Anís

El anís (*Pimpinella anisum*L.) es originario de Asia menor y Egipto, es una de las primeras plantas aromáticas mencionadas en los documentos escritos. Era bien conocido por los hebreos, griegos y romanos fue muy estimado por su valor medicinal (Velásquez J. , 1999).

Fueron los españoles los que introdujeron este cultivo al Perú, entre los años de 1650 – 1655 donde se menciona la producción de este cultivo por la compañía de Jesús en la capilla de Curahuasi o “Ccoraguasi” de la provincia de Abancay, departamento de Apurímac, tratando de aclimatarlo encontraron que era el lugar ideal o adecuado por su clima semejante a las zonas aniceras de España, motivo por el que en el Perú solo existe

la variedad española. En la actualidad en el Perú se cultiva el anís en las regiones de Moquegua y Arequipa pero en pequeñas extensiones, y a nivel mundial se cultiva en más de 30 países, siendo los más importantes en producción: India, China, Marruecos, Siria, Egipto, Irán, Túnez y Turquía (Aréstegui, 2014).

El anís es importante por sus propiedades medicinales, se utiliza para dar sabor a pasteles, tortas, salsas y en confiterías. El aceite destilado del anís se usa en la medicina, en perfumería para jabones y bebidas (Velásquez J. , 1999).

En el valle de Curahuasi el 70% de la población se dedica a la producción de este cultivo, la superficie sembrada de anís representa el 95.2% de la superficie sembrada a nivel nacional, anualmente se cultivan de 400 a 600 Has., la producción media es de 400 TN / año, la demanda nacional del anís es de 500 TN/año y el 80% es atendido por la producción de Curahuasi (Velásquez H. , 2011).

La dinámica económica de Curahuasi está en función de la producción de anís, esta actividad involucra a más de 1,000 agricultores y sus familias que trabajan en las labores productivas, post cosecha y comercialización. El anís de Curahuasi es reconocido y muy solicitado por su calidad, que tiene que ver con el contenido de aceites esenciales con compuestos de anetol (70-90 %), y en menor cantidad estragol, anisona, p-metoxifenol, eugenol, anisaldehído y vainillina. Este grado aceptable de aceites esenciales se debe a la adaptación del cultivo a las condiciones climáticas del valle, principalmente radiación y temperatura (Velásquez H. , 2011).



Figura 1. Planta y semilla del anís (*Pimpinella anisum L.*)

2.2.2. Clasificación taxonómica

Según la clasificación filogenético propuesta por Arthur Cronquist, el anís pertenece a:

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	Vegetal
Subreino	Embriophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Genero	Pimpinella
Especie	PimpinellaanisumL.
Nombre común	Anís

Fuente: Velásquez (1999)

2.2.3. Características botánicas

Es una planta herbácea anual, con la siguiente característica botánica.

2.2.3.1. La raíz

Raíz estrecha y alargada, fusiforme, ocupa un espacio radical de 36 cm² de superficie y una profundidad de 8 a 15 cm. Lo que hace que se desprenda con facilidad en el momento de la cosecha (Collura, 1964).

2.2.3.2. El tallo

El tallo es erecto y cilíndrico, de color verde grisáceo de 30 a 50 cm. De largo, ramificado en umbelas compuestas, situado en el tercio superior, que tiene de 7 a 14 radios, entrenudos cortos con disposición alterna de las ramas (Collura, 1964).

2.2.3.3. Las hojas

Las hojas inferiores tienen el borde dentado, las hojas de la parte media son atribulados con lóbulos conformes o lanceolados, las hojas superiores son cortantes pecioladas opuestas, trifidas y con segmentos lineales (Collura, 1964).

2.2.3.4. La inflorescencia

Todo los pedicelos (tallos y flores) brotan del mismo punto del pedúnculo (uno de los tallos de la inflorescencia) y son de tal longitud que toda las flores quedan a la misma altura por encima del punto de inserción común, de modo que la cara superior de la umbela es plana. Las umbelas son nudos dobles ya que los pedúnculos se disponen a su vez de esta forma (Huacac, 2007).

2.2.3.5. La flor

Las flores son de color blancas, pequeñas, dispuestas en umbelas compuestas, de 3.0 a 3.5 mm de radio, igualmente de altura. Las flores son, pentámeras (formadas por cinco piezas) en su mayoría (Velásquez J. , 1999).

2.2.3.6. El fruto

Es un diaquenio periforme invertido, algo comprimido lateralmente, formando cinco costillas en relieve, por cada medio fruto, los frutos alcanzan de 3 a 4 mm de largo, de forma oval alargado, son de color verde grisáceo, presentan una corta pilocidad, cada aquenio presenta 5 costillas en relieve y el sabor de esta semilla es agradable dulzaino (Huacac, 2007).

2.2.4. Composición química del fruto del anís

Los frutos maduros y secos, posee un aroma especial; de sabor ardiente, dulce y picante. Contiene azúcares, goma, esencia, aceite fijo, oxalato de calcio, sustancias proteicas, ácido málico. La esencia se halla localizada en numerosos canales secretores del fruto (de 18 a 25 en cada pericarpio). El aceite esencial es un líquido incoloro, cuyo principal componente es el anetol, hasta un 90%, estragol, metil-chavicol, aldehído anisinico, cimeno (Collura, 1964).

Tabla 2. Composición química de la semilla del anís

Componente	Contenido en %
Agua	12.23
Materia prima	17.23
Aceite de éter	2.24
Grasa	9.18

Esencia	2 a 3
Azúcar	4.27
Féculas	5.13
Materias extractivas no nitrogenadas	25.18
Materia fibrosa	14.13
Cenizas	8.14

Fuente: ADEX (1980) citado por Huacac (2007)

2.2.5. Descripción genérica de los dos cultivares de anís presentes en Curahuasi

2.2.5.1. Ecotipo Curahuasi

El ecotipo curahuasi “variedad rey” es la única que se encuentra perfectamente adaptada al clima y ecología del valle, desde hace muchísimos años; en las décadas anteriores no se necesitaban fertilizantes químicos y otros productos industriales para producir bien. Hoy en día han crecido los niveles de deterioro de los ecosistemas comprendido entre los 2500 y 2800 metros de altura en donde se siembra tradicionalmente el anís (Huacac, 2007).

El ecotipo curahuasino, es una planta de porte bajo, que se adapta entre los 2500 a 2600 msnm, muy susceptible al ataque de “ranchar” (*Cercosporiasp.*), pero que sin embargo por su mayor contenido de aceite esencial (anetol), tiene el grano mayor fragancia y sabor (Velásquez H. , 2011).

2.2.5.2. El ecotipo Boliviano

Introducido en el distrito de Curahuasi en 1993, tiene las hojas basales simples redondeadas, las hojas medias compuestas con tres folíolos, y las superiores son también compuestas con pequeños folíolos partidos, tallo normal más o menos cilíndrico, alcanza una altura de 60 a 75 cm. con 12 a 16 ramas, la inflorescencia de

umbela compuesta, de 12 a 14 umbelas, cada umbela con 14 a 16 flores, presenta el fruto de color verde oscuro de 4 a 5 mm de tamaño.

Las flores son de color blanco pequeños actinomorfos, flor perfecta o bisexual pentámera, con 5 pétalos, carecen de sépalos, gineceo con ovario bicarpelar y su posición en el receptáculo es súpero, porque se encuentra independiente de las cubiertas florales, el receptáculo se presenta convexo, androceo con 5 estambres de apertura septal. Las producciones de las campañas de los años 1994 a 1997 mostraron una alta tolerancia al “polvillo negro” (*Puccinia pimpinillae*), sin embargo en la campaña de 1998 se han registrado campos de esta variedad fuertemente infestados por el hongo (Aréstegui, 2014).

El ecotipo convencional (también llamado Boliviano), es más resistente al ataque de *Cercosporasp.*, y con mayor rango de adaptación en cuanto a piso altitudinal, puede sembrarse desde los 2300 hasta los 2800 msnm., además los agricultores le refieren mayor rendimiento pero al mismo tiempo menos aroma y sabor (Velásquez H., 2011).

2.2.6. Niveles de rendimiento

Los mejores rendimientos del anís fue en los años de 1960 alcanzando hasta 37.5 quintales es decir 1725 kilos por hectárea, esto antes del incremento de enfermedades y el uso intensivo de agroquímicos, en la actualidad los productores que utilizan bajos insumos externos tienen rendimientos entre 13 a 12.5 quintales es decir 600 a 575 kilos por hectárea (Aréstegui, 2014).

El cultivo de anís en Curahuasi constituye la principal actividad productiva desarrollada entre los meses de diciembre a junio. Se estima que en Curahuasi se

produce El 96% del anís de todo el país, y la extensión de siembra fue de 1,031 Has. durante la campaña 2010-2011 (Velásquez H. , 2011).

Se pudo determinar que los rendimientos están relacionados directamente a la tecnología aplicada en cada una de las fincas tipo. En consecuencia, en promedio los agricultores que obtienen mayores rendimientos son los de la finca (tecnología media y alta); siempre y cuando que disponga del agua, en el momento preciso que requiera la planta. Sin embargo es relativo esta diferencia debido a que también existen algunos agricultores que son de finca de (tecnología baja) que obtienen buenos rendimientos. Los rendimientos promedios por hectárea y por tecnología son de; 600 - 750 - 920 Kg. Respectivamente (Huacac, 2007).

2.2.7. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles generalmente destilables por arrastre de vapor de agua que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (esencias, condimentos y saborizantes) y farmacéuticas (saborizantes y medicamentos). El rendimiento de la extracción es muy bajo variado entre 0.1 al 2% (Martinez, 2003).

Los aceites esenciales no son compuestos puros sino mezclas de multitud de sustancias que se encuentran en distintas proporciones y que en conjunto proporcionan al aceite esencial sus características (Ortuño, 2006).

Pueden estar ubicados en diferentes partes de la planta por ejemplo en las **confieras** que están en todo el tejido, en la rosa solo en el pétalo y las flores caso de manzanilla y lavanda; en el comino, anís, hinojo, clavo de olor brote o yema; en la lima, pimienta nuez moscada, frutos, menta, pelos glandulares de las ramas y hojas; costus y valeriana

en las raíces, albahaca, hierbabuena, menta, romero, salvia, se utilizan las hojas (Lock, 1994).

Dado que los aceites esenciales se encuentran en muy pequeñas concentraciones en la planta, generalmente son difíciles de obtener, por lo que es necesaria una gran cantidad de material vegetal (que hay que cosechar y recolectar) y si a esto añadimos su carácter volátil y susceptible de fácil alteración, comprenderemos el porqué de su elevado precio (Ortuño, 2006).

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta. El término aceite, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida. La palabra esencial fue derivada del latín “quinta essentia” que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra, el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos (Cano, 2007).

Químicamente están formados por monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos. Son biosintetizados a partir de los pirofosfatos de geraniol y de farnesilo respectivamente. Los aceites esenciales son obtenidos del material fresco principalmente por el procedimiento de destilación por arrastre de vapor. Otros métodos usuales son de: expresión, extracción con solventes lipofílicos y el enflorado; este último bastante usado en perfumería, consiste en que los pétalos de una flor, por ejemplo, se colocan y presionan entre dos láminas impregnadas de grasa en las cuales se absorbe el aceite, el que luego es extraído con alcohol (Cano, 2007).

2.2.8. Composición química

Entre los principales componentes de los aceites esenciales tenemos a los hidrocarburos y en su mayoría los terpenos, llegando a alcanzar elevadas

concentraciones de hasta 75% a 90% del peso total en aceites esenciales de cítricos (limón, naranja, lima, mandarina, bergamota y pomelo) (Martinez, 2003).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

Paradójicamente, los terpenos son inodoros o contribuyen muy poco al aroma global y constituyen la base diluyente del aceite esencial, proporcionado a este su carácter volátil e inflamable y sus propiedades físicas más fácilmente mensurables (densidad, viscosidad) (Martinez, 2003).

Los responsables del aroma de los aceites esenciales suelen ser sustancias que se encuentran en menor proporción aunque hay excepciones. Se trata de compuestos orgánicos con grupos funcionales del tipo: cetona, éster, alcohol, aldehído, éter. Cada una de estas sustancias, en su estado puro, presenta un aroma característico, pero es el conjunto de todas ellas, en una correcta proporción, lo que determina el aroma y en definitiva las propiedades más valiosas de los aceites esenciales (Martinez, 2003).

En cuanto a la aparición de los grupos funcionales, se sospecha que los alcoholes se forman en los cloroplastos así como los ésteres, procediendo generalmente los ácidos de la descomposición proteica o de oxidación glucosídicas (Martinez, 2003).

Son muchos los factores que influyen en la composición de los aceites esenciales, entre los más importantes tenemos el origen, la especie, el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, tierra de cultivo, etc.) así como la destilación y forma de destilamiento. Es importante asegurar la correcta concentración de los principios activos y que sean homogéneos en los diferentes lotes. Al ser volátiles, los aceites esenciales se han de estandarizar y proteger para asegurar su conservación (Martinez, 2003).

2.2.9. Propiedades físicas de los aceites esenciales

Propiedades generales de los aceites esenciales (Cano, 2007).

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos.
- Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)
- Insolubles en agua.
- Lipófilos.
- Solubles en disolventes orgánicos.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión.
- Poder rotatorio (quirales)

Tabla 3. Grupos funcionales del aceite esencial

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol	$\begin{array}{c} \\ -C-OH \\ \end{array}$	Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-H \end{array}$	Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona	$\begin{array}{c} O \\ \\ R_1-C-R_2 \end{array}$	Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster	$\begin{array}{c} O \\ // \\ R_1-C \\ \backslash \\ O-R_2 \end{array}$	Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	$-C-O-C-$	Cineol, ascaridol	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: Tello (2011)

2.2.10. Deterioro de alimentos por microorganismos

El deterioro microbiológico de alimentos es causado por microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) que pueden crecer en el alimento bajo ciertas condiciones. Los microorganismos consumen los nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y minerales) presentes en el alimento, multiplicándose en este y produciendo diversas sustancias como consecuencia de su metabolismo, algunas de las cuales pueden ser tóxicas al ser humano. Ello se manifiesta algunas veces por la generación de malos olores, sabores, cambios de color y textura. Los microorganismos no pueden ser observados a simple vista, con excepción de los hongos que crecen en ciertos alimentos. La contaminación y el deterioro microbiológico de los alimentos son de especial importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que ellos originan la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). No todos los alimentos deteriorados microbiológicamente son necesariamente dañinos a la salud, sin embargo,

cualquier alimento que se sospeche haya sufrido deterioro microbiológico debe ser desechado inmediatamente (Lendoza, Barreiro, & Sandoval, Higiene y saneamiento en la preparación y servicios de alimentos, 1994).

2.2.11. Microorganismos responsables del deterioro de alimentos

2.2.11.1. *Escherichia coli*

Escherichia es el género tipo de la familia enterobacteriaceae y *E. coli* es la especie tipo del género. Es un bacilo catalasa-positivo, oxidasa-negativo, fermentador, corto, gran-negativo, no esporogénico. Genéticamente, *E. coli* está íntimamente relacionado con el género *Shigella*, aunque característicamente fermenta el azúcar lactosa y por otra parte es bastante más activo bioquímicamente que *Shigella spp.* Las cepas de *E. coli* fermentadoras tardías de la lactosa, inmóviles y bioquímicamente inertes, pueden sin embargo resultar difíciles de diferenciar de *Shigella* (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

Tienen forma de bastoncillos, que miden 1.1-1.5x2.0-6.0 micrones o 0.4-0.7x1.0-3.0 micrones; existen aislados o en parejas y pueden tener flagelos, que les confieren motilidad, se desarrollan fácilmente sobre medios con nutrientes simples, las colonias pueden ser lisas, poco convexas, húmedas, de superficie brillante con el borde completo, o secas y ásperas (Ref, 1981).

Como fuentes de carbono pueden utilizar los acetatos, pero no los citratos exclusivamente. Fermentan la glucosa y otros carbohidratos, con producción de ácido piruvato y de ácido fórmico; parte de este último se descompone en anhídrido carbónico y agua.

E. coli puede ser diferenciado de otros representantes de las enterobacteriaceae en base al número de azúcares que fermenta y mediante otras pruebas bioquímicas.

Clásicamente, un grupo importante de pruebas que se utiliza con esta finalidad se conoce con la sigla IMViC. Estas pruebas se utilizan para ensayar la capacidad para:

- Producir indol del triptófano
- Producir el ácido suficiente para disminuir el pH del medio por debajo 4,4 punto de viraje del indicador rojo del metilo.
- Producir acetoina (acetilmetil carbinol)
- Utilizar el citrato. (Ref, 1981)

2.2.11.1.1. Aislamiento e identificación de *E. coli*

Las técnicas selectivas para *E. coli* aprovechan principalmente la capacidad de organismos para tolerar la bilis y otros agentes tensoactivos, como consecuencia de su hábitat natural, el intestino. Con agentes selectivos relativos también se utilizan colorantes de anilina y la capacidad de algunas cepas para crecer a temperaturas en torno a 44°C.

El primer medio selectivo y diferencial fue el ideado originalmente por MacConkey en 1905, desde entonces, ha sido modificado variamente por sus características esenciales han permanecido inalteradas. Las sales biliares (y a veces el colorante anilico cristal violeta) actual como inhibidores de las bacterias gram positivas y de algunas gram negativas exigentes. Como carbohidrato fermentescible se incluye la lactosa con un indicador del pH, habitualmente el rojo neutro. Los organismos productores potentes de ácido como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, producen colonias de color rojo, los no fermentadores de la lactosa como *Salmonella*, *Proteus* y *Edwardsiella* con raras excepciones, producen colonias incoloras. Sin embargo, el agar de MacConkey no es absolutamente selectivo, por lo que mantendrá el crecimiento de

algunos organismos que no son *Enterobacteriaceae* incluyendo los gram positivos, por ejemplo los *Enterococos* y *Staphylococos*.

En América del norte el agar Eosina/azul de metileno es un medio selectivo y diferencial muy utilizado. Los colorantes anilicos Eosina y Azul de metileno son agentes selectivos pero también actúan como indicadores de la fermentación de la lactosa por formar un precipitado en pH bajo. Los fermentadores potentes de la lactosa producen colonias de color verde-negro con un viso metálico.

Una característica bioquímica de *E. coli* que está siendo utilizada cada vez más es la actividad de la glucuronidasa, que posee en torno a 95% de las cepas de *E. coli* y solo un corto número de las demás bacterias (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.11.1.2. Asociación con alimentos

La contaminación fecal de las redes de abastecimiento de agua y los manipuladores de alimentos contaminados, han sido implicados muy frecuentemente en brotes de enfermedad causados por **EPEC**, **EIEC** y **ETEC**. Han sido implicados varios alimentos, entre los que se incluyen un nutriente del café en Rumania en 1951, las hortalizas, la ensalada de patatas. En los Estados Unidos, en 1971, los quesos blandos madurados por mohos han sido responsables de brotes relacionados con **EIEC** en los que resultaron afectadas más de 387 personas y en 1983 fueron causados por **ETEC**. No sería de esperar que *E. coli* sobreviviese favorablemente en un producto lácteo fermentado con un pH inferior a pero, en aquellos casos en los que la contaminación está asociada a la maduración por mohos, el aumento local del pH como consecuencia de la utilización del lactato y de la producción de aminas por el moho permitiría el crecimiento del organismo.

Un total de 600 personas enfermaron y 4 niños murieron en un brote importante ocurrido en Estados Unidos en 1993 causado por hamburguesas insuficientemente cocidas. Este brote causó un importante clamor público sobre la higiene de la carne y motivó, entre otras cosas, la implantación de normas nuevas relativas al etiquetado de las carnes. Las inspecciones han aislado el serotipo en el 3.7% (6/164) de las muestras de carne de vacuno que se venden al por menor y en un porcentaje importante (1-2%) de otros productos cárnicos frescos, por ejemplo en la carne de cerdo, en las canales de aves de corral y en la carne de cerdo. En un brote habido, un rollo de pavo frío fue implicado en terrenos epidemiológicos (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.11.1.3. Enfermedades producidas por el *E. coli*

El *E. coli* se utiliza mucho como prueba de la contaminación fecal, es decir, como microorganismo indicador, se sabe que ciertas cepas pertenecientes a varios tipos serológicos diferentes, por ejemplo 0,55, 0111, 0127, etc., causan diarreas, que pueden ser mortales para los niños. Algunas otras cepas segregan una potente enterotoxina, capaz de producir diarreas agudas. Otras producen toxinas termoestables y otras penetran en el epitelio intestinal y producen una inflamación. Los síntomas de la infección causadas por el *E. coli* pueden pues, parecerse a los de la intoxicación producidas por alimentos contaminados (Ref, 1981).

2.2.11.2. *Salmonella*

Las Salmonelas pertenecen a la familia enterobacteriaceae. Son bacilos (típicamente de 0.5 micrones por 1-3 micrones) gran negativos, asporogénicos que son facultativamente anaerobios, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y generalmente son móviles con flagelos peritricos (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

Tienen forma de bastoncillo, usualmente con flagelos peritricos que les confieren motilidad, aunque existen también mutantes que carecen de motilidad, y un tipo de (*S. gallinarum*) forma colonias de cerca de 1mm. Casi toda las cepas crecen en medios definidos, sin factores especiales de crecimiento y pueden usar como fuente los citratos, casi toda las cepas son aerogenas pero *S. Typhi*. Que es una excepción importante, no produce nunca gases. Existen también variantes anaerogeneas de serotipos que producen normalmente gases, lo que sucede corrientemente con la *S. dublin* (Ref, 1981)-

Ha sido registrado crecimiento desde temperaturas inmediatamente por debajo de 5°C hasta 47°C con un crecimiento óptimo de 37°C. Las Salmonelas son termosensibles y son destruidas fácilmente por las temperaturas de la pasteurización. *Salmonela Senftenberg 775W* es el serotipo más resistente a valores de a_w elevados y en la leche tiene un D_{72} de 0.09 minutos (D_{72} de *S. typhimurium* = 0.003 minutos). Se ha comprobado que la termorresistencia aumenta por el choque térmico subleal a 48°C durante 30 minutos y también puede aumentar notablemente en medio de a_w baja; *S. typhimurium*, por ejemplo, tiene un D_{70} de 11.3-17.5 horas en la salsa de chocolate. En los alimentos congelados, el número de salmonelas viables se reduce lentamente, disminuyendo la velocidad de esta reducción a medida que decrece la temperatura de almacenamiento.

La a_w mínima de crecimiento se halla en torno a 0.93 pero las células sobreviven perfectamente en los alimentos desecados, aumentando el índice de supervivencia a medida que se reduce la a_w . El pH mínimo de crecimiento varía con el acidulante desde 5.4 si se trata de ácido acético hasta 4.05 si el acidulante es el ácido clorhídrico o el ácido cítrico. El crecimiento óptimo tiene lugar a pH en torno a 7.

La técnica más importante para subdividir el género es el esquema de serotipado de Kauffman y White. Este esquema no proporciona una información completa de la estructura antigénica de cada salmonella. Pero utilizando antígenos de valor diagnóstico proporciona un esquema viable. En el caso de los serotipos más corrientes como son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, a efectos epidemiológicos, es necesario un esquema de clasificación más discriminante y este esquema lo proporciona el tipado con fagos (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

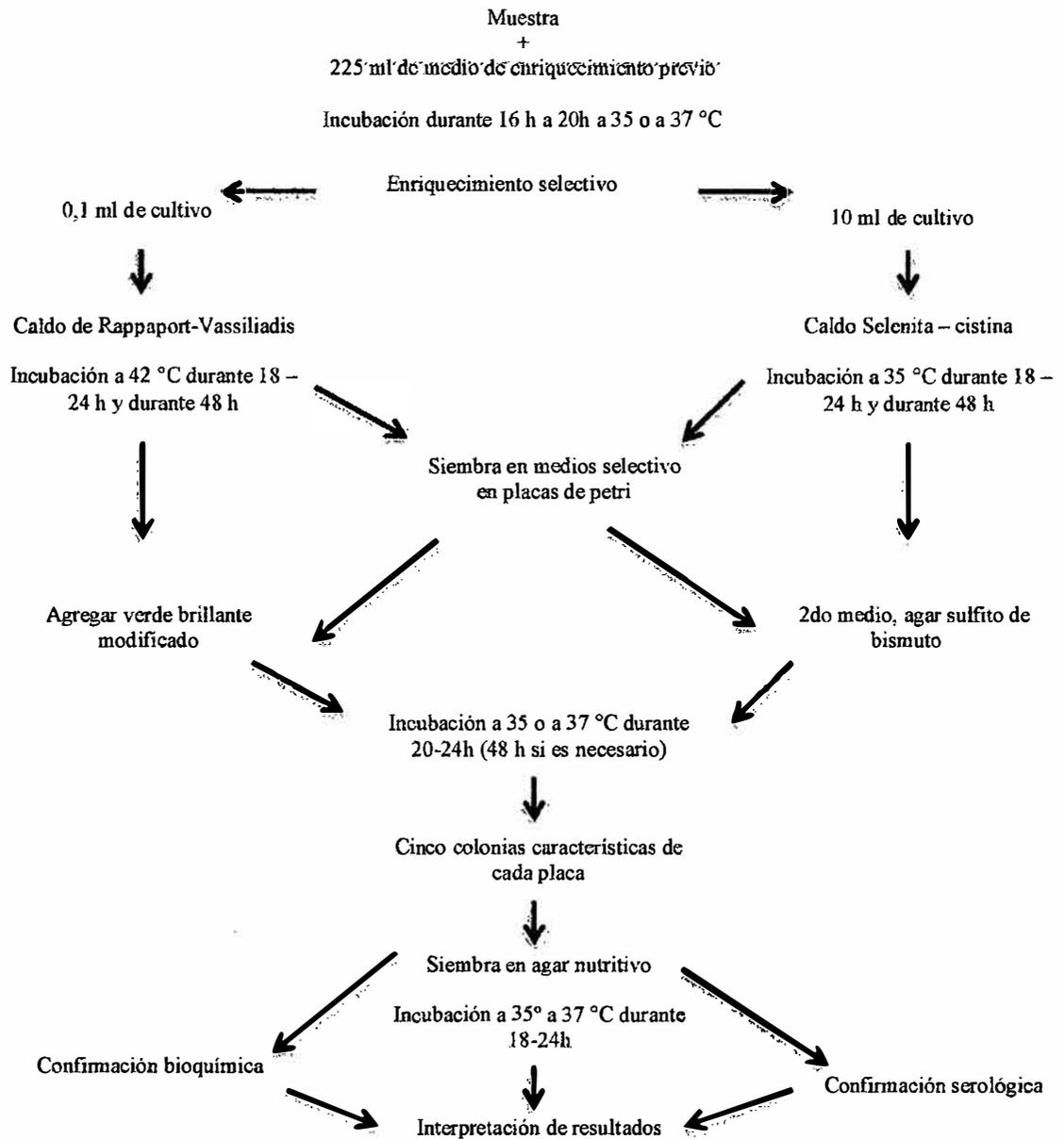
2.2.11.2.1. Aislamiento e identificación Salmonella

Lógicamente, los métodos de aislamiento e identificación de salmonelas en los alimentos han sido objeto de mayor cantidad de estudios que las correspondientes a cualquier organismo patógeno transmitido por los alimentos. Utilizando las técnicas de cultivo tradicionales, ha aparecido un procedimiento de 5 fases que ha sido aceptado como norma universal.

El enriquecimiento previo en un medio no selectivo incrementa el porcentaje de recuperación de *salmonelas* por permitir la reparación de las células que han sido dañadas subletalmente. Este daño puede ser consecuencia de cualquier exposición a las condiciones desfavorables que se pueden dar durante el tratamiento al que se someten los alimentos, por ejemplo durante la refrigeración, durante la congelación o durante la desecación, tratamiento que aumenta la sensibilidad de las células a los agentes selectivos que se utilizan en los medios en las fases subsiguientes del procedimiento del aislamiento. Por consiguiente, el hecho de no incluir una fase de resucitación podría dar como resultado que no se detectasen células que se pueden recuperar y causar infección si el alimento es manipulado incorrectamente.

La fase de enriquecimiento selectivo tiene como finalidad incrementar el porcentaje de células de *salmonela* en la micro flora total permitiéndoles que proliferen a la vez que se inhibe el crecimiento de los demás microorganismos existentes. A tal fin, ha sido propuesta una serie de medios selectivos diferentes que emplean agentes selectivos tales como bilis, verde brillante, verde malaquita, tetraciónato y selenita. Los más universalmente utilizados son el caldo selenita cistina, contiene cistina con el fin de estimular el crecimiento de las *salmonellas*; el caldo tetraciónato de Müller, que contiene tetraciónato, verde brillante y bilis; y el caldo de rapaport-vassiliadis, que contiene verde malaquita, cloruro magnésico y un pH ligeramente reducido como factores selectivos (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

Figura 2. Protocolo tradicional del cultivo para el aislamiento de salmonella en los alimentos



Fuente: Adams, Moss (1997)

2.2.11.2.2. Asociación de *Salmonella* con alimentos

La salmonelosis se define como una infección zoonótica puesto que la fuente principal de la enfermedad humana la contribuyen los animales infectados. La

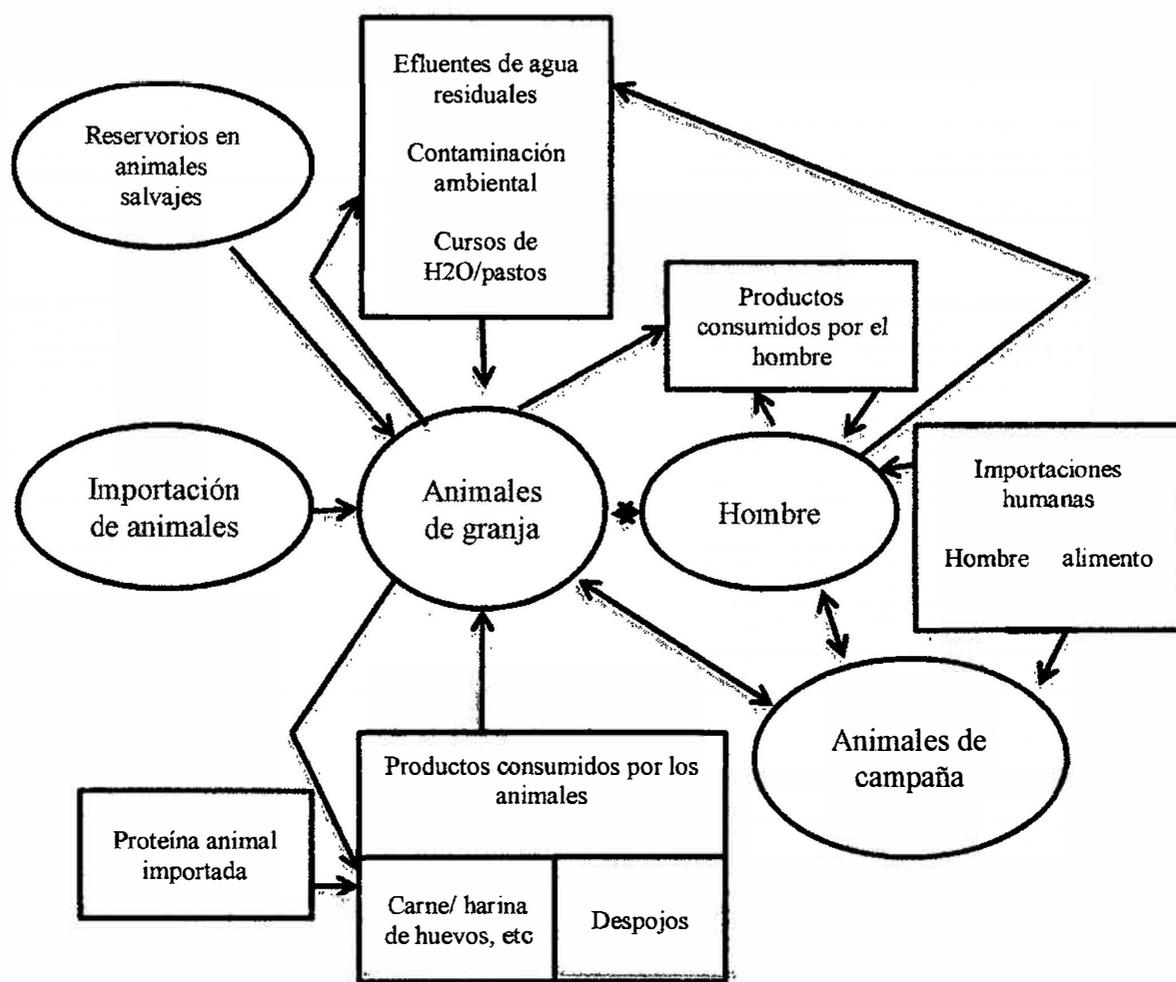
transmisión tiene lugar por la vía fecal-oral por medio de la cual el contenido intestinal de un animal infectado es ingerido con un alimento o con el agua. Un tiempo de uso incorrecto de la temperatura que permita crecer a las salmonelas en el alimento y un tratamiento terminal insuficiente o ausente, son factores comunes que cooperan en la aparición de los brotes.

La carne, la leche, las aves de corral y los huevos son los vehículos principales; pueden estar insuficientemente cocidos permitiendo que las salmonelas sobrevivan o puedan contaminar de modo cruzado a otros alimentos que son consumidos sin cocción posterior.

Los portadores humanos generalmente son menos importantes que los animales en la transmisión de la salmonelosis. Puede haber transmisión humana si las manos contaminadas fecalmente de un manipulador de alimentos tocan un alimento que posteriormente es consumido sin la acción adecuada, con preferencia después de un tiempo intermedio durante el cual tiene lugar el crecimiento microbiano.

Los animales de abasto pueden contraer la infección por salmonelas en la granja a partir de aves salvajes y roedores, pero las fuentes principalmente son los demás animales, que pueden ser excretores asintomáticos, y las materias primas de los piensos contaminados (figura 3.) (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

Figura 3. Ciclo de la infección por salmonella



Fuente: Adams y Moss (1997)

2.2.11.2.3. Enfermedades causadas por las salmonellas

La salmonelosis es una infección, transmisible por los alimentos, que se contrae cuando ingieren alimentos contaminados con bacterias vivas del grupo salmonella. Las bacterias del genero salmonella pueden producir fiebres entéricas y gastroenteritis (Ref, 1981)

2.2.11.3. *Penicillium sp*

Son hongos en las que sus colonias pueden tener matices de verde, azul verdoso, rosa, blanco u otro color y su superficie pueden ser aterciopelados o pulverulentos debido a la presencia de conidios. En el examen microscópico las hifas son hialinas y tabicadas y producen conidióforos con aspecto de cepillos (penicilios). Los conidióforos producen métulas en las que se originan fialides que producen cadenas de conidios (Bailey; Scott, 2009).

2.2.12. Microorganismos y alimentos

Los alimentos que consumimos, raramente por no decir nunca, son estériles si no que contienen asociaciones microbianas cuya composición depende de que organismos llegan al él y de cómo se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento con el transcurso del tiempo. Los microorganismos existentes en un alimento procederán tanto del micro flora de la materia prima como de los microorganismos introducidos durante las operaciones de recolección, tratamiento, almacenamiento y distribución. La proporción numérica entre los diversos tipos será determinada por las propiedades del alimento, por la atmosfera donde se almacena, por las propiedades de los propios organismos y por los efectos del tratamiento.

En la mayoría de los casos, esta micro flora no ejerce un efecto aparente por lo que el alimento es consumido sin reparo y sin consecuencias adversas (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

No obstante, algunas veces los microorganismos manifiestan su presencia en una de estas formas:

- Pueden causar alteración

- Causan una enfermedad transmitida por el alimento
- Pueden transformar las propiedades de una forma beneficiosa – fermentación de alimentos.

2.2.13. Constituyentes antimicrobianos

Todos los alimentos fueron en alguna fase parte de organismos vivos y, como tales, a lo largo del curso de evolución han sido dotados de medios con los cuales las infecciones microbianas potencialmente perjudiciales puedan ser evitadas o, por lo menos, limitadas.

El primero de estos medios es el tegumento: se trata de una barrera frente a la infección como por ejemplo la piel, la cascara, la vaina o la corteza de un producto, el tegumento suele estar formado por macromoléculas relativamente resistentes a la degradación y proporciona un medio para los microorganismos por tener una baja actividad de agua, una falta de nutrientes fácilmente asequibles y, con frecuencia, por contener componentes antimicrobianos tales como ácidos grasos de cadena corta (en la piel de los animales) o aceites esenciales (en la superficie de las plantas) (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.14. Conservadores químicos

La adición de compuestos químicos a los alimentos no constituye una innovación reciente sino que ha sido practicada a lo largo de toda la historia conocida. De igual modo, indudablemente ha existido un cierto nivel de abuso de los mismos aunque no ha debido ser posible detectarlo hasta tanto no se ha dispuesto de las modernas técnicas analíticas (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.14.1. Conservadores naturales de los alimentos

Ya se ha hecho referencia a los proclamados de modo ambiguo por el consumidor organizaciones y grupos de presión por el uso de aditivos alimentarios que incluyen los conservadores. Un procedimiento para tranquilizar al consumidor ha sido recurrir a métodos de conservación que pueden ser definidos como naturales. No obstante todo este tema está plagado de inconsistencia y contradicción; puede argumentar que cualquier forma de conservación que impide o retarda el reciclado de los elementos en las materias vegetal y animal es natural. Su efecto antimicrobiano es consecuencia de la desecación y de la actividad de componentes del humo de madera tales como los fenoles y el formaldehído que probablemente no estarían permitidos pero que tendrían que ser prepuestos como conservantes químicos en su sentido más estricto.

A este respecto ha llamado la atención el uso de componentes naturales de los alimentos que poseen actividad antimicrobiana tales como los aceites esenciales y el sistema lactoperoxidasa existente en la leche (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.14.2. Dióxido de azufre

El dióxido de azufre ha gozado de una cierta fama por sus propiedades desinfectantes y su primer uso en la industria alimentaria apareció en la época en la que se quemaban bujías de azufre para desinfectar los recipientes que se usaban para elaborar y almacenar el vino. En la actualidad, también se usa en algunos productos para inhibir las reacciones de pardeo enzimático y no enzimático.

El dióxido de azufre es un gas incoloro que se disuelve fácilmente en agua para establecer un equilibrio dependiente del pH parecido al que establece el CO_2 (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.14.3. Nitrito

La acción antibacteriana del nitrito fue descrita por primera en la década de los años 20 aunque anteriormente había sido utilizado inconscientemente en la preparación de carnes curadas en la que también es responsable de su color y sabor característicos. En los primeros tratamientos de curación, el nitrito era producido por la reducción bacteriana del nitrato existente como impureza en la sal bruta que se utilizaba pero, en la actualidad, el nitrato, o más corrientemente el nitrito, es añadido en forma de sal sódica o potásica.

El nitrito es inhibidor de una serie de bacterias. Los primeros investigadores demostraron que una concentración de 200 mg kg^{-1} a pH 6,0 era suficiente para inhibir las especies de *Escherichia*, de *Flavobacterium*, de *Micrococcus*, eran más resistentes. No obstante, es de mayor importancia práctica la capacidad del nitrito para inhibir el crecimiento de las bacterias esporógenas, como por ejemplo *Clostridium botulinum*, que sobrevivirán al tratamiento térmico al que se someten algunas carnes curadas (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.14.4. Ácidos orgánicos y ésteres

El efecto antimicrobiano de ácidos orgánicos tales como el ácido acético y el ácido láctico, ambos son producidos por microorganismos, si bien el ácido acético de grado alimentario obtenido petroquímicamente a veces también se utiliza como alternativa de vinagre. Pueden ser un ingrediente añadido en productos formulados tales como los encurtidos o las salsas, o pueden ser generados in situ en la larga lista de los productos obtenidos por fermentación láctica. Se diferencian de los demás ácidos y ésteres que aquí se describen en que habitualmente se hallan en cantidades suficientes para ejercer un efecto en el sabor y en el pH del producto, potenciando de este modo su propia

acción por aumentar la proporción de ácido no asociado presente (Adams, M.R.; Moss, M.O., 1997).

2.2.15. Especies como agentes antimicrobianos

La acción de los aceites esenciales contra bacterias Gram positivas y hongos es similar. Los componentes del aceite destruyen la pared y membrana celular fúngicas y bacterianas, lo que resulta en la liberación del citoplasma y su coagulación. Signos visibles de la acción del aceite pueden ser observados como cambios morfológicos, tanto bajo el microscopio como en sus colonias. Los aceites esenciales también inhiben la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en ambos tipos de células. En los hongos, esto evoca cambios similares a los efectos de una acción antibiótica (Kalemba, D.; Kunicka, A., 2003).

Varias especias, comúnmente utilizadas para condimentar alimentos, se están investigando para ver si muestran actividad inhibitoria en el crecimiento de microorganismos contaminantes de alimentos. El clavo, la canela, el orégano y el tomillo son las especias que muestran mayor actividad antimicrobiana (Davidson, 2001).

2.3. Marco conceptual

Ecotipo

Es una población genéticamente diferenciada que está restringida en un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales.

Halo de Inhibición

Zona alrededor de un disco de antibiótico que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen.

Antimicrobiano

Es una sustancia que elimina microorganismos o inhibe su crecimiento, tales como bacterias, hongos o paracitos.

Medio de cultivo

Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir en condiciones favorables de pH y temperatura el crecimiento de microorganismos.

Ruptura celular

Una gran cantidad de productos son intracelulares y para obtenerlos se precisa la desintegración de la célula para liberar su contenido al medio.

Terpenos

Son una vasta y diversa gama de compuestos orgánicos derivados del isopreno, tradicionalmente se han considerado derivadas del 2 – metil – butadieno más conocido como isopreno.

Aceite esencial

Son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, arboles, frutos, hiervas, semillas y a ciertos extractos de origen animal.

Microorganismos

Es un ser vivo que solo puede visualizarse con el microscopio y la ciencia que los estudia es la microbiología.

Bacteria

Son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrometros y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas, barras, sacacorchos y hélices.

Hongo

Reyno que pertenecen los organismos sin clorofila, provistos de talo, generalmente filamentosos y ramificados, mediante el cual absorben los principios orgánicos nutritivos del medio, de tamaño muy variado y reproducción preferentemente asexual.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Lugar de desarrollo experimental

La extracción del aceite esencial de anís eco tipo Curahuasi y Boliviano, se realizó en el laboratorio de la Dirección Regional de la Producción Abancay – Apurímac.

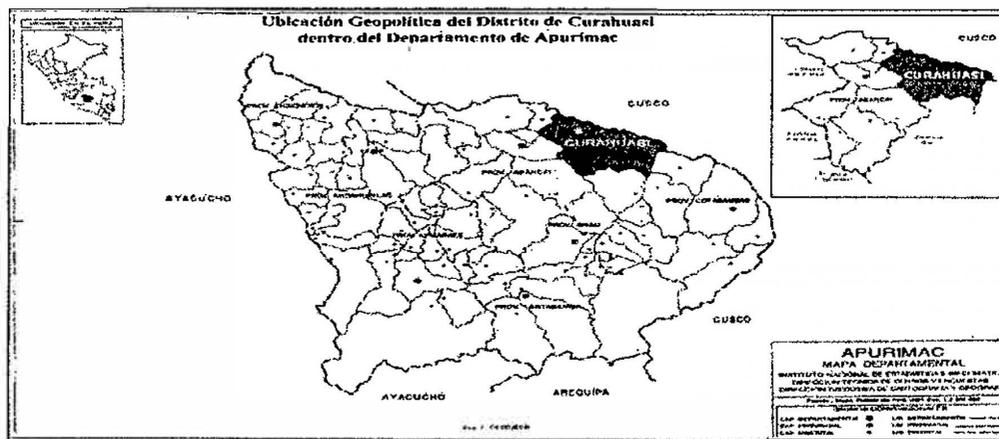
La evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.1.2. Semilla de anís

El anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano (*Pimpinella anisum L.*), de la cosecha agosto (2011) proveniente del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay, departamento de Apurímac.

El distrito de Curahuasi, se ubica en la parte norte del departamento de Apurímac y al noreste de la provincia de Abancay que se encuentra entre los 13°32'54" de latitud sur y 72°41'57" de longitud oeste.

Figura 4. Ubicación geopolítica del distrito de Curahuasi



Fuente: Plan desarrollo concertado - Curahuasi

3.1.3. Cepas microbianas

Las cepas microbianas utilizadas para comprobar la actividad antimicrobiana fueron *E. coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp* adquiridas en la Dirección Regional de Salud de provincia Abancay, Apurímac; a las que se les realizó un estudio de identificación basado en técnicas morfológicas y fisiológicas, consideradas como estudios básicos pero no definitivos, razón por lo cual no se ha optado por definir la especie a la que corresponden, sin embargo sirvió para confirmarlas.

3.1.4. Equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo

3.1.4.1. Equipos

- Hidrodestilador
- Autoclave
- Balanza analítica, marca: OHAUS, con sensibilidad de 0,0001 g; capacidad máximo de 210 g.

- Balanza electrónica de precisión 0.01g marca CITIZEN CT 602 capacidad máxima 600g
- Estufa, marca: Memmert, modelo: 200-800, rango de temperatura 30°C-250°C
- Incubadora
- Microscopio marca Revelatium 3, USA
- Refrigeradora marca LG
- Cromatografía de gases

3.1.4.2. Materiales

- Asa de Kolle
- Bureta semiautomática
- Fiolas de 250ml, 100ml, 500ml
- Gradilla
- Matraz Erlenmeyer de 50ml, 100ml y 250ml
- Mechero Bunsen
- Micropipetas de 10 uL, 100ul
- Pipetas de 0,5ml, 1ml, 2ml, 5ml y 10ml
- Pizeta
- baguetas
- Placas Petri
- Probetas volumétricas de 50ml, 100ml
- Termómetros rango de medición de -10°C a 132°C
- Tubos de ensayo de 15ml, 20ml
- Frascos de 15ml
- Guantes quirúrgicos

- Hisopos estériles
- Algodón
- Marcador indeleble
- Parafilm
- Discos en flanco

3.1.4.3.Reactivos

- Galactosa
- Dimetilsulfoxido
- Alcohol etílico de 70°C

3.1.4.4. Medio de cultivo

- Agar Saboraud (SMA)
- Agar Mueller – Hilton
- Agar tripticasa soya

3.2. Método de investigación

3.2.1. Tipo y nivel de investigación

Es de tipo de investigación tecnológica por tener propósitos prácticos inmediatos, es decir que la investigación tiene aplicación inmediata para consumo de productos alimentarios.

El nivel de investigación para la composición química es de carácter descriptivo y para los siguientes etapas, el nivel de investigación es de nivel experimental porque hay modificación de las variables independientes por las diferentes pruebas que se realizaran para la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L.) .

3.2.2. Diseño de la investigación

La presente investigación se basó en un diseño experimental cuantitativo que busca encontrar la mayor actividad antimicrobiana representada en halos de inhibición que tuvieran los aceites esenciales de los ecotipos Curahuasi y Boliviano y determinar cuál de ellos actuó mejor frente a los 3 microorganismos patógenos.

Siendo un diseño factorial de tres niveles de concentración de aceite esencial y dos ecotipos, siendo la variable que contribuirá a la determinación de aquellas especies que tienen propiedades antimicrobianas.

- **Dependiente:** Tamaño de Halos de inhibición medido en mm.
- **Independientes:** Tipo de microorganismo, concentración y tipo de extracto.

Tabla 4. Tratamientos en estudio

Microorganismo	Aceites esenciales ecotipos	Concentraciones ppm
<i>E.coli</i>	Curahuasi	3000
		5000
		10000
	Boliviano	3000
		5000
		10000
<i>Salmonella tiphy</i>	Curahuasi	3000
		5000
		10000
	Boliviano	3000
		5000
		10000
<i>Penicillium sp</i>	Curahuasi	3000
		5000
		10000
	Boliviano	3000
		5000
		10000

Fuente: Elaboración propia

3.2.3. Población y muestra

3.2.3.1. Población

La población estuvo constituida por las semillas de anís (*Pimpinella anisum* L.) estas tendrán que ser secas, enteras, sin ningún tipo de daño producido por insectos o daño mecánico.

La cosecha a utilizar fue la del mes de agosto (2011) del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay, departamento de Apurímac.

3.2.3.2. Muestra

La técnica de muestreo fue no probabilístico ya que las muestras que se tomaran de determinados productores.

Se usó una arroba de anís eco tipo Curahuasi y anís eco tipo Boliviano, respectivamente, para la extracción de los aceites esenciales.

Las semillas de anís ecotipos (Curahuasi, Boliviano) fueron tomados del distrito de Curahuasi, por ser zona productora en sus dos ecotipos ya mencionados.

3.2.4. Procedimiento de recojo de datos

3.2.4.1. Extracción del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano

La extracción del aceite esencial de los ecotipos Curahuasi y Boliviano se realizó en la Dirección Regional de la Producción – Abancay.

Para realizar la extracción del aceite esencial de anís, la semilla fue cargada en el hidroddestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua fue inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión

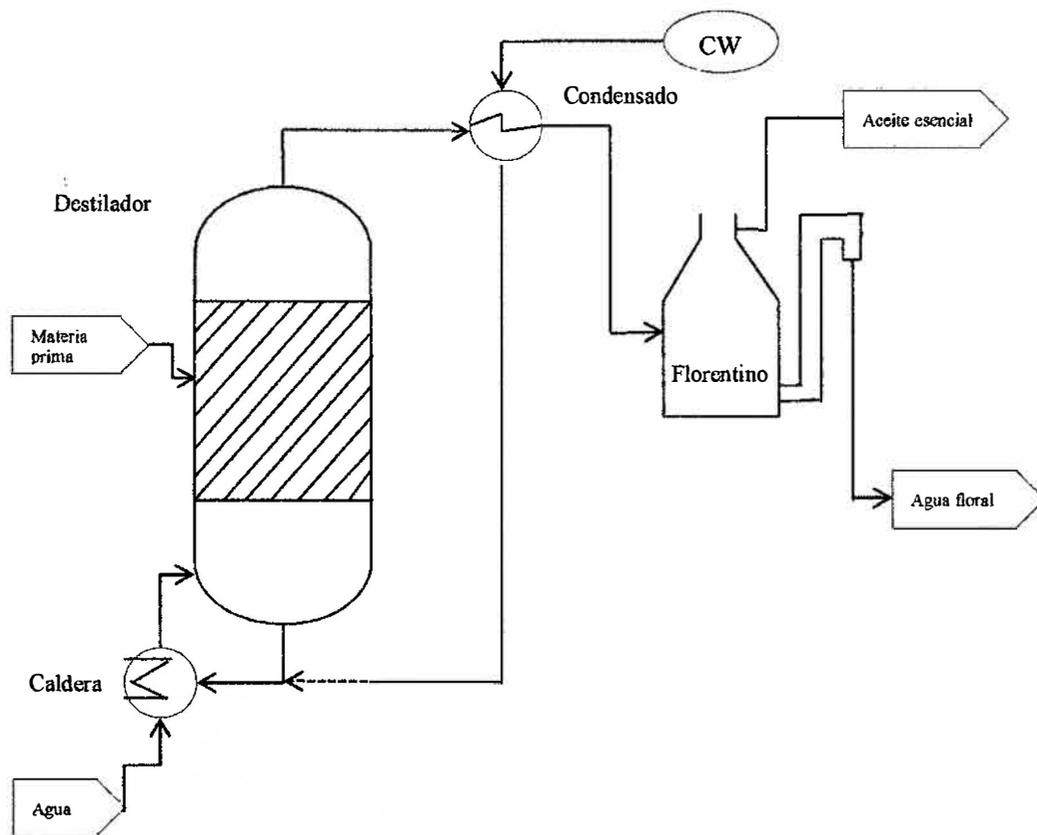
suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación se realizó en una cámara externa (Cerpa, 2007).

Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, las semillas de anís se calientan y van liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, llamado serpentín o prolongación curvada del conducto de salida del hidroddestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtuvo una emulsión líquida inestable. La cual, es separada por decantación (Cerpa, 2007).

El aceite se guardó en botellas de vidrio estériles color ámbar y herméticamente cerradas, transportándolas inmediatamente al laboratorio para su posterior almacenamiento en refrigeración (Cerpa, 2007).

El método usado para determinar los compuestos químicos de los aceites esenciales fue la cromatografía de gases realizada en el laboratorio de química de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

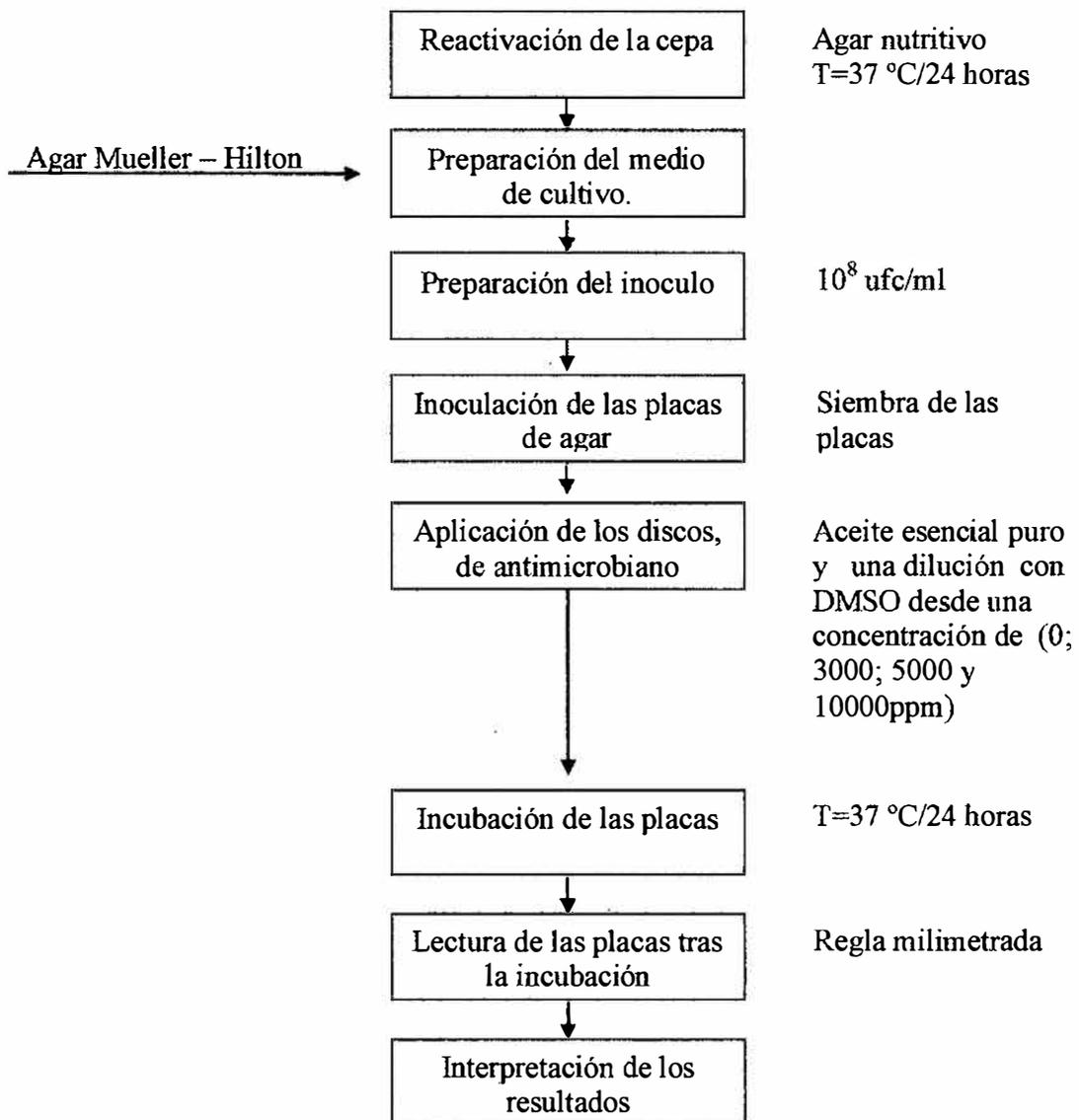
Figura 5. Esquema básico del proceso de extracción del aceite esencial por hidrodestilación



Fuente: Elaboración propia

3.2.4.2. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano, método de difusión en discos.

Figura 6. Diagrama del flujo general de la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Anís ecotipos Curahuasi y Boliviano por el método de difusión en discos.



Fuente: Elaboración propia

3.2.4.3.Preparación de inóculos bacterianos y procedimiento

La preparación de inóculos bacterianos se inicia con la siembra e incubación de las bacterias a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. En el cuadro 5 se muestra las condiciones de incubación y el medio de cultivo que se utiliza para reactivar las tres cepas bacterianas utilizadas

Tabla 5. Reactivación de cepas bacterianas para la difusión en agar

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Echerichia coli</i>	Agar Mueller – Hilton	37 °C durante 24 horas
<i>Salmonella typhi</i>	Agar Mueller – Hilton	37 °C durante 24 horas
<i>Penicillium sp</i>	Soya Saboraud (SMA)	24 °C durante 24 horas

Fuente: Elaboración propia

Se obtiene los cultivos a partir de cepas puras, se prepara una suspensión de cada uno de ellos tomando 3 – 4 colonias aisladas.

Procedimiento:

Se preparó 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.

Los inóculos bacterianos utilizados fueron del orden $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; las placas petri fueron del diámetro de 9 cm, la placa del medio de cultivo debe tener una profundidad de 4mm para evitar posteriores problemas de manipulación en inconvenientes de contaminación.

Después de 15 minutos de ajustado el inóculo ,se procedió a inocular a las placas de Mueller Hinton utilizando un hisopo estéril, presionando el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo y del líquido para evitar demasiada humedad, se siembra la superficie seca del Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa y homogénea distribución luego se dejó reposar durante 15 minutos.

A continuación se procedió a colocar los discos empapados de las concentraciones del aceite esencial sobre la superficie del agar, utilizando pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor de 24 mm del centro al otro.

Posteriormente se llevó las placas a incubar a la estufa dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos , incubando de forma invertida a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 horas y en ambiente aerobio.

Para la medida de zona de inhibición de crecimiento mediante la lectura de los halos se tuvo que tener en cuenta el área que no muestre el desarrollo obvio , la interpretación de resultados se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Valor inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{diámetro del disco}(6\text{mm})}{2}$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó cultivos control de cada cepa para comprobar su viabilidad (Tello, 2011).

3.2.5. Tratamiento de datos

El análisis estadístico se determinó mediante análisis de varianza ANOVA para determinar las diferencias significativas entre tratamientos y mediante una comparación de medias de Tukey para identificar los mejores tratamientos.

Prueba de hipótesis

Hipótesis nula: Ninguno de los aceites esenciales obtenidos del anís ecotipo Curahuasi y Boliviano presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados de referencia.

Hipótesis alterna: Todos los aceites esenciales obtenidos del anís ecotipo Curahuasi y Boliviano presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados de referencia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados

4.1.1. Componentes químicos del aceite esencial

Tabla 6. Compuestos encontrados en concordancia con la Biblioteca Flavor o NIST ,
aceite esencial de anís Ecotipo Curahuasi

Item	Compuesto	Contenido relative %
1	Estragol	1.05
2	Pulegona	0.19
3	Anetol	88.51
4	Benzaldehydo, 4 metoxy (Biblioteca Nist08)	1.01
5	2 propano,1-(4-metoxifenil)	0.09
6	S-(p-Methoxybenzoyl)thiohydroxylamine	0.07
7	Benzene,1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl (Biblioteca Nist08)	0.05
8	cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9- tetramethyl(1H)benzocyclohepte	0.94
9	6-Aminonicotinamide	0.17
10	1-(4-Methoxyphenyl)-1,4-butanediol	0.07
11	2-Quinolinecarboxylic acid, 4,8-dihydroxy	0.06
12	(-)-Spathulenol	0.14
13	Thujopsene-I3	0.05
14	Apiol	0.06
15	Iproniazid	0.06
16	Butanoic acid, 2-methyl-, 2-methox y-4-(2- propenyl)phenyl ester	2.54
17	Phthalic acid, isobutyl octyl este	3.15
18	Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methox	1.18
19	Phthalic acid, isobutyl 3-methylbutyl ester	0.59

En la tabla 06 se observa los componentes detectados del aceite esencial de anís Ecotipo Curahuasi, determinándose un total de 19 componentes, con un compuesto mayoritarios que es el anetol (88.51%) y demás componentes.

Tabla 7. Compuestos encontrados en concordancia con la Biblioteca Flavor o NIST , aceite esencial de anís Ecotipo Boliviano

Item	Compuesto	Contenido relative %
1	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methyl-ethyl)-, trans	0.09
2	Estragol	1.73
3	Pulegona	0.58
4	Anetol	85.73
5	Benzaldehyde, 4-methoxy	2.19
6	2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)	0.27
7	1-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)	0.07
8	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl	0.08
9	cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene	0.92
10	1-(4-Methoxyphenyl)-1,5-pentanedio	1.10
11	Benzene, 1,4-dimethoxy-2-methyl	0.41
12	1H-1,5-Benzodiazepine, 2,3,4,5-tetrahydro-2-methyl	0.15
13	(-)-Spathulenol	0.12
14	Alfa.-Copaene	0.08
15	Apiol	0.09
16	Butanoic acid, 2-methyl-, 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenyl ester	1.88
17	Phthalic acid, isobutyl 3-methylbut-3-enyl ester	3.34
18	Butanoic acid, 2-methyl-, 4-methoxy-2-(3-methoxyphenyl)phenyl ester	0.68
19	Phthalic acid, isobutyl 3-methylbutyl ester	0.32

En la tabla 07 se observa los componentes detectados del aceite esencial de anís Ecotipo Boliviano, determinándose un total de 20 componentes, con un compuesto mayoritarios que es el anetol (85.73%) y demás componentes.

4.1.2. Evaluación de efectos de los tratamientos

Los factores en estudio ecotipo (2 niveles), concentración (3 niveles) frente a las cepas bacterianas utilizadas, según la tabla 9 y 10 del análisis estadístico de varianza y tukey influye significativamente en la variación de inhibición en el crecimiento de los microorganismos, puesto que a concentraciones menores de 3000 ppm se observa inhibición menor, sin embargo a una concentración superior de 3000 ppm, es decir a 5000 ppm y del 10000 ppm, existe mayor inhibición.

(Reyes Jurado, 2012), Menciona que el modo de acción de los aceites esenciales se debe a que tiene la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que condice a rupturas o fugas citoplasmáticas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo,

4.1.2.1. Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano sobre *E.coli*.

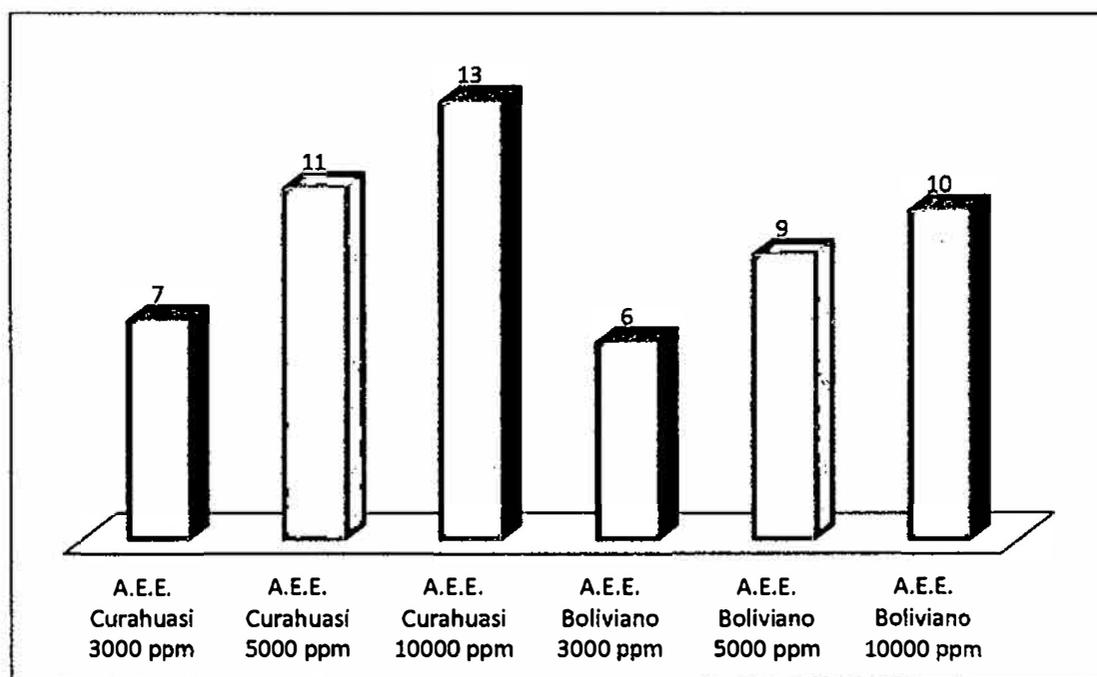
Tabla 8. Promedio de halos de inhibición en mm frente a *E.coli*.

Tratamiento	Ecotipo	Concentración ppm	Inhibición mm
1	Curahuasi	3000	7
2	Curahuasi	5000	11
3	Curahuasi	10000	13
4	Boliviano	3000	6

5	Boliviano	.5000	9
6	Boliviano	10000	10

En la tabla 8 se observa que existen diferencias entre los tratamientos de concentración utilizadas contra *E coli*, trabajada a nivel laboratorio observando mayor inhibición a 10000 ppm en el Ecotipo Curahuasi, el mismo presenta mayor inhibición así como se puede observar en la tabla 9 y 10 del análisis estadístico de varianza y tukey.

Figura 7. Promedio del halo de inhibición frente a la bacteria de *E coli* (mm)



En la figura 7 se ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de esencial ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano frente a *E Coli*, observándose que la mayor inhibición es con el aceite ecotipo Curahuasi a una concentración de 10000 ppm, respaldada por la tabla 9 y 10 del análisis estadístico de varianza y tukey.

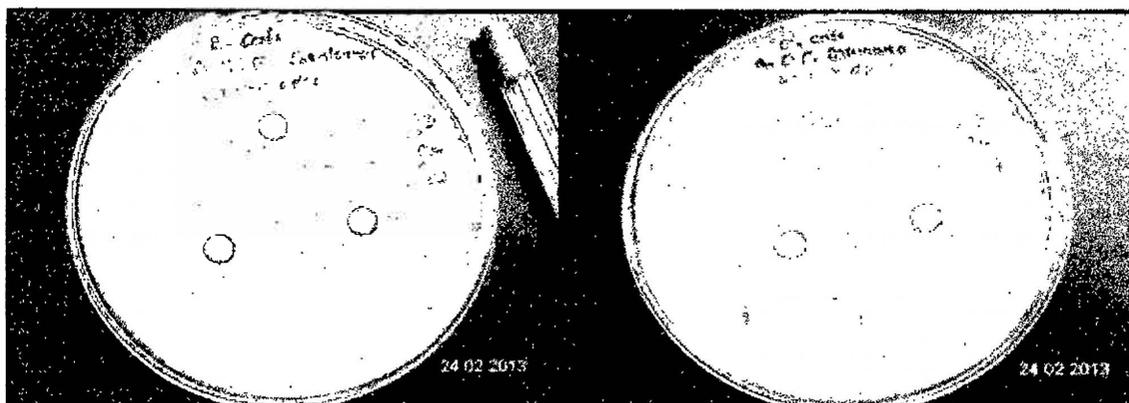


Figura 8. Halos de inhibición del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L) Ecotipo Curahuasi y Boliviano sobre *E coli*.

Tabla 9. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana frente a *E Coli*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	106.40	5	21.28	117.86	<0.0001
Ecotipo	17.01	1	17.01	94.23	<0.0001
Concentración ppm	84.69	2	42.35	234.54	<0.0001
Ecotipo* Concentración ppm	4.69	2	2.35	13.00	0.0010
Error	2.17	12	0.18		
Total	108.57	17			

CV :4.62 %

En la tabla 9 se muestra el resultado del análisis de varianza para probar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de anís de los dos ecotipos para *E. coli* el cual demuestra que los factores de concentración y ecotipo tienen una influencia altamente significativa sobre las medias de halos de inhibición ($p < 0.01$), lo que significa que el aceite esencial tiene actividad antimicrobiana.

La interacción de los dos factores (concentración y ecotipo), también muestran una influencia altamente significativa.

Tabla 10. Pruebas de tukey para tratamientos de la actividad antimicrobiana frente a *E Coli*

Ecotipo	Concentración ppm	Medias	n	E.E.	
Curahuasi	10000	13 mm	3	0.25	A
Curahuasi	5000	11 mm	3	0.25	B
Boliviano	10000	10 mm	3	0.25	B
Boliviano	5000	9 mm	3	0.25	C
Curahuasi	3000	7 mm	3	0.25	D
Boliviano	3000	6 mm	3	0.25	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Como se puede observar en la tabla 10 el valor de $\alpha = 0.05$ DMS=1.16536 con un Error: 0.1806 gl: 12; se observa también la diferencia de medias por Tukey donde se observa diferencias entre los tratamientos se observa cuatro grupos diferentes (A,B, C y D) siendo el mejor tratamiento el ecotipo Curahuasi a 10000 ppm, tratamiento que representa una diferencia significativa sobre el resto de tratamientos.

Maguna, Romero y Garro (2006), reportan que los aceites esenciales que contienen terpenos frente a *E Coli* tuvieron efecto antimicrobiano, esto puede ser a causa de la capa de sus paredes celulares que permiten el fácil ingreso de los aceites inhibiendo el crecimiento microbiano. Como se puede observar en la tabla 10 el aceite esencial presenta inhibición para *E coli*.

Segovia y Suarez (2010), concluyen que, el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antimicrobiana significativa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Así mismo presentó actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans*.

Sanchez y Bedoya (2002), ellos concluyen que el aceite esencial de *Aloysia triphylla* mostro la capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, observándose que a mayor volumen se presenta un mayor halo de inhibición, esto debido a que la mayor cantidad de aceite puede difundirse en una mayor área sobre la superficie del agar. Este resultado corrobora la actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano a concentraciones mayores presentan mayor halo de inhibición.

4.1.2.2. Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano sobre *Salmonella typhi*

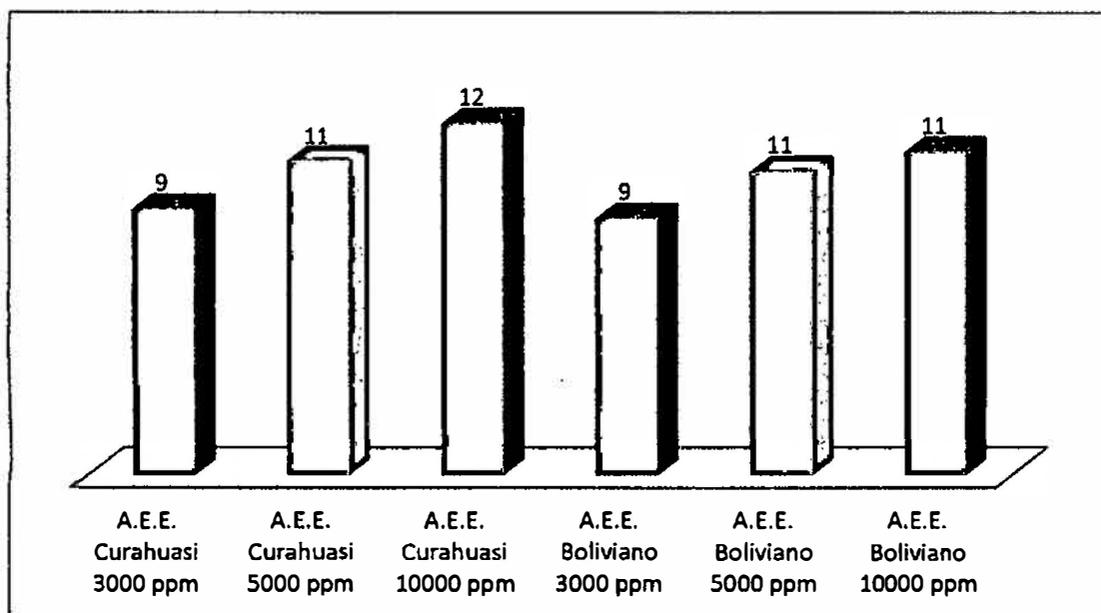
Tabla 11. Promedio de halos de inhibición en mm frente a *Salmonella typhi*

Tratamiento	Ecotipo	Concentración ppm	Inhibición mm
1	Curahuasi	3000	9
2	Curahuasi	5000	11
3	Curahuasi	10000	12
4	Boliviano	3000	9
5	Boliviano	5000	11
6	Boliviano	10000	11

En la tabla 11 se observan los resultados del nivel de inhibición contra *Salmonella typhi*, trabajada a nivel laboratorio mostrando mayor inhibición a 10000 ppm en ambos

ecotipos, siendo el más efectivo el aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi; así como se puede observar en la tabla 12 y 13 del análisis estadístico de varianza y tukey.

Figura 9. Promedio del halo de inhibición frente a la bacteria de *salmonella typhi*. (mm)



En la figura 09 ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de esencial ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano frente a *salmonella typhi*, observándose mayor inhibición a concentraciones de 10000 ppm.

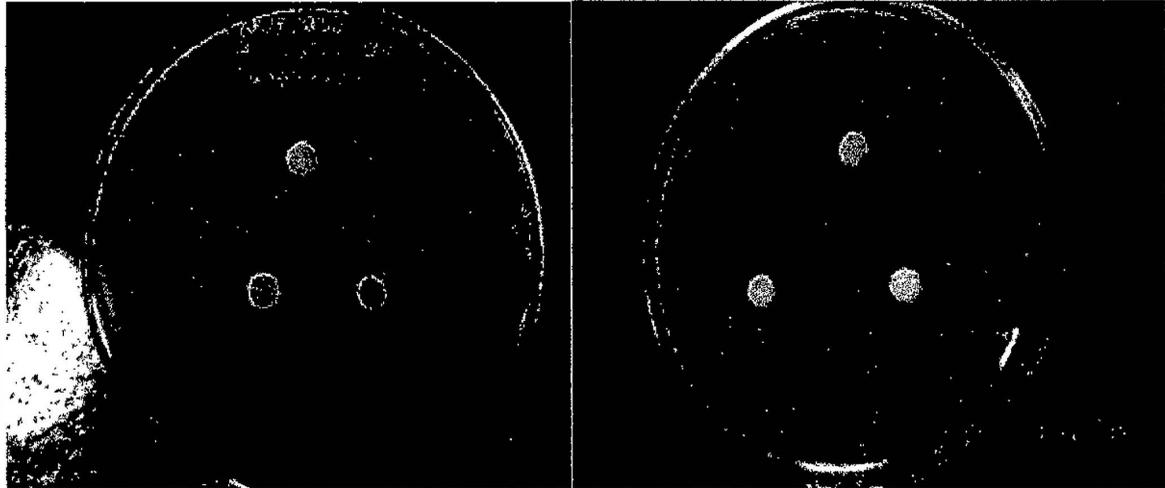


Figura 10. Halos de inhibición del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L) Ecotipo Curahuasi y Boliviano sobre *salmonella typhi*

Tabla 12. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhi*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23.61	5	4.72	5.31	<0.0084
Ecotipo	1.39	1	1.39	1.56	<0.2351
Concentración ppm	21.78	2	10.89	12.25	<0.0013
Ecotipo* Concentración ppm	0.44	2	0.22	0.25	0.7828
Error	10.67	12	0.89		
Total	34.28	17			

CV: 8.89 %

En la tabla 12 el resultado del análisis de varianza demuestra que el factor concentración tiene una influencia altamente significativa sobre las medidas de halos de inhibición, lo que significa que el aceite esencial tiene actividad antimicrobiana.

El factor ecotipo y la interacción de los dos factores (concentración y ecotipo), no muestran una influencia significativa ($p < 0.01$), sobre la variable de respuesta por lo que se puede afirmar que la interacción de concentración y Ecotipo influyen en la inhibición de microorganismos.

Tabla 13. Pruebas de Tukey para tratamientos de la actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhi*.

Ecotipo	Concentración ppm	Medias	N	E.E.		
Curahuasi	10000	12 mm	3	0.54	A	
Boliviano	10000	11 mm	3	0.54	A	B
Curahuasi	5000	11 mm	3	0.54	A	B
Boliviano	5000	11 mm	3	0.54	A	B
Curahuasi	3000	9 mm	3	0.54		B
Boliviano	3000	9 mm	3	0.54		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Como se puede observar en la tabla 13 el valor de $\alpha = 0.05$ DMS=0.58570 con un Error: 0.8889 gl: 12; se observa la diferencia de medias por Tukey donde se observa que al haber diferencias significativas en el tratamiento de concentración, se procede con la diferencia de medias en la que se observa 2 grupos diferentes (A y B) siendo los mejores tratamientos el Ecotipo Curahuasi a concentraciones de 10000 ppm seguida por el Ecotipo Boliviano a la misma concentración, tratamiento que representa una diferencia significativa sobre el resto de tratamientos.

De la misma forma Alzamora, Morales , Armas y Fernandez (2001) evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en la medicina tradicional en el Perú, como: eucalipto, anís serrano, salvia, huamanripa y hierba luisa frente a *Salmonella typhi* empleando discos de antibiótico en blanco dando resultados de inhibición frente a este microorganismo. Este resultado corrobora la actividad antimicrobiana del aceite esencial de anís.

Carhuapoma y Lopez, (2009) Concluyen que, el aceite esencial de *M. mollis* muestran actividad antimicrobiana en el siguiente orden de sensibilidad, para *S. dysenteriae* 21,41mm, *H. pylori* 17,07 mm, *S. typhi* 14,25 mm y *P. aeruginosa* 11,45 mm. Ellos atribuyen que dicha actividad se debe a la presencia de compuestos fenólicos, por nuestro resultado podemos afirmar que el aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi y Boliviano posee actividad a 3000 ppm, 5000 ppm y 10000 ppm frente a *Salmonella typhi*

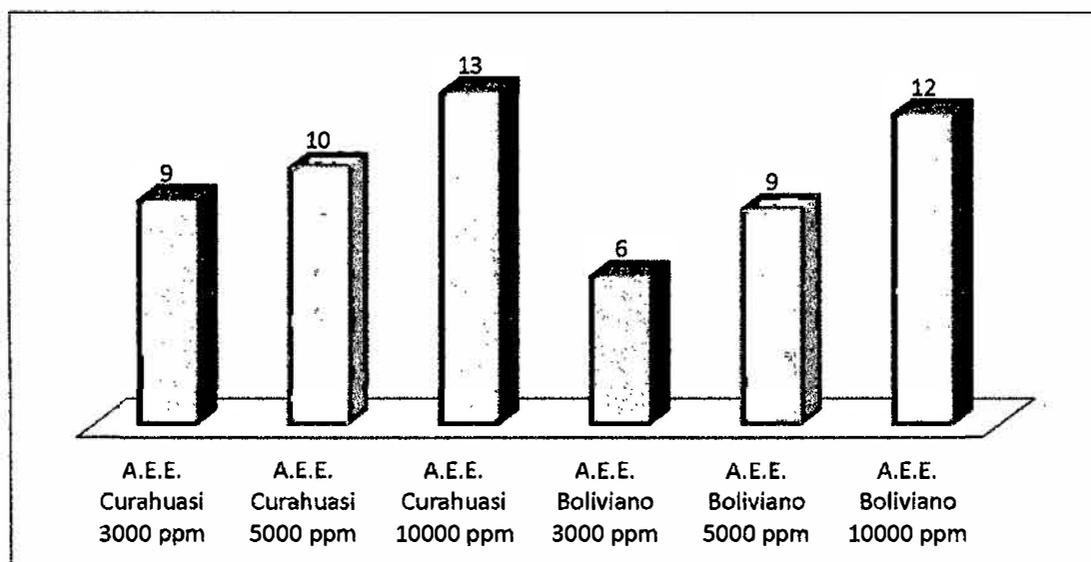
4.1.2.3. Efectos de la concentración del aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano sobre *Penicillium sp.*

Tabla 14. Promedio de halos de inhibición en mm frente a *Penicillium sp.*

Tratamiento	Ecotipo	Concentración ppm	Inhibición mm
1	Curahuasi	3000	9
2	Curahuasi	5000	10
3	Curahuasi	10000	13
4	Boliviano	3000	6
5	Boliviano	5000	9
6	Boliviano	10000	12

En la tabla 14 se observa los resultados de los halos de inhibición de los aceites esenciales de anís de los dos ecotipos contra *Penicillium sp*, donde la mayor inhibición es a 10000 ppm en ambos ecotipos, siendo el aceite esencial de anís ecotipo Curahuasi el de mayor inhibición; así como se puede observar en la tabla 15 y 16 del análisis estadístico de varianza y tukey.

Figura 11. Promedio del halo de inhibición frente al hongo *Penicillium sp* (mm)



En la figura 11 ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de esencial ecotipo Curahuasi frente a *Penicillium sp*. Observándose que la mayor inhibición es con el aceite ecotipo Curahuasi a una concentración de 10000 ppm.

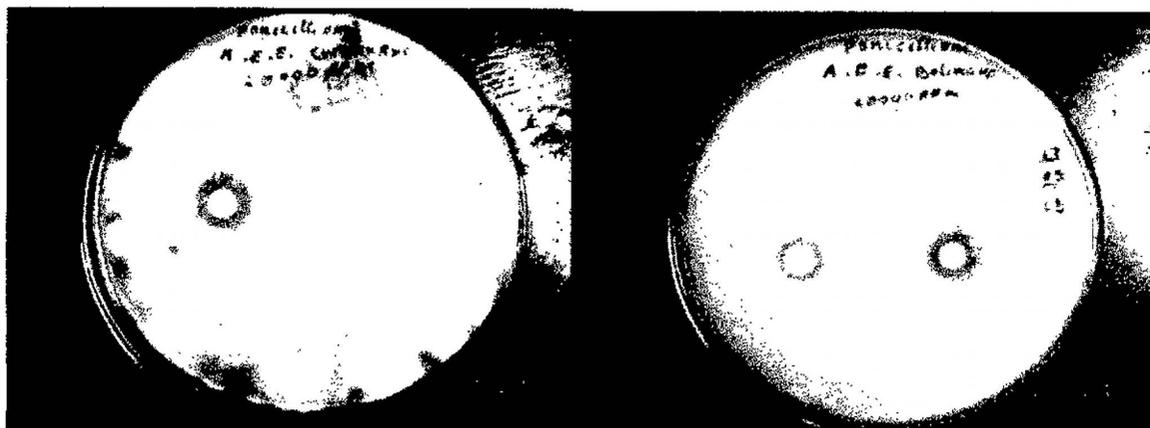


Figura 12. Halos de inhibición del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L) Ecotipo Curahuasi y Boliviano sobre *Penicillium* sp

Tabla 15. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana *Penicillium* sp.

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	106.28	5	21.26	38.26	<0.0001
Ecotipo	16.06	1	16.06	28.90	<0.0002
Concentración ppm	87.11	2	43.56	78.40	<0.0001
Ecotipo* Concentración ppm	3.11	2	1.56	2.80	0.1005
Error	6.67	12	0.56		
Total	112.94	17			

CV: 7.50 %

En la tabla 15 se muestra el resultado del análisis de varianza demuestra que los factores de concentración y ecotipo tienen una influencia altamente significativa sobre los valores de actividad antimicrobiana en forma independiente, al mismo tiempo interacción de los dos factores (concentración y ecotipo), no muestran una influencia altamente significativa sobre la variable de respuesta.

Tabla 16. Pruebas de tukey para tratamientos de la actividad antimicrobiana frente a *Penicillium sp*

Ecotipo	Concentración ppm	Medias	N	E.E.		
Curahuasi	10000	13 mm	3	0.43	A	
Boliviano	10000	12 mm	3	0.43	A	B
Curahuasi	5000	10 mm	3	0.43		B C
Curahuasi	3000	9 mm	3	0.43		C
Boliviano	5000	9 mm	3	0.43		C
Boliviano	3000	6 mm	3	0.43		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Como se puede observar en la tabla 16 el valor de $\alpha = 0.05$ DMS=2.04417 con un Error: 0.5556 gl: 12; En la tabla 16 se observa la diferencia de medias por Tukey donde se observa cuatro grupos diferentes (A, B, C) siendo los mejores tratamientos el ecotipo Curahuasi y ecotipo Boliviano a 10000 ppm respectivamente, siendo los tratamientos que mejor inhiben al hongo, presentando una diferencia significativa sobre el resto de tratamientos.

Barrera Necha y Garcia Barrera, (2008) estudio el efecto antifúngico de aceites esenciales que contenían compuestos de terpenos, estudiados en bioensayos de inhibición a 200, 250 y 300 $\mu\text{g/ml}$ frente al hongo *Fusarium sp*, los cuales exhibieron una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis al incrementarla.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los componentes químicos que se elucidaron del aceite esencial de anís Ecotipo Curahuasi fueron en un contenido mayoritario de Anetol (88.51 %) seguida de Phthalic acid, isobutyl octyl (3.15%). Así mismo los componentes químicos que se elucidaron del aceite esencial de anís Ecotipo Boliviano fueron en un contenido mayoritario de anetol (85.73%) seguida de Phthalic acid, isobutyl 3-methylbu t-3-enyl ester (3.34%).

El aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L.) ecotipos Curahuasi y Boliviano presentan actividad antimicrobiana sobre cepas microbianas tales como *E Coli*, *Salmonella typhi* y *penicillium*, la misma que se observó por la presencia de halos transparentes mayores de 6 mm alrededor de cada disco de papel Whatman.

El aceite esencial de anís ecotipos Curahuasi, a concentraciones de 10000 ppm, inhibe mejor el crecimiento de microorganismos como *E Coli*, *Salmonella typhi* y *penicillium sp*, mientras que a concentraciones menores de 5000 y 3000 ppm se observa una inhibición lenta.

Recomendaciones

- Continuar la investigación del aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L) ecotipo Curahuasi y boliviano en otras cepas bacterianas y fúngicas.
- Aplicar en alimentos que son afectados por *E Coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium Sp* como en la carne, huevo u en otros alimentos que están presentes.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M., & Moss, M. (1997). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Adams, M., & Moss, M. (1997). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia, S.A.
- Alzamora, I., Morales, L., Armas, L., & Fernandez, G. (2001). Actividad antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de algunas plantas Aromáticas. *Instituto de Investigacion de Ciencias Biologicas -UNMSM*, 9.
- Aréstegui, A. (2014). Agro ecosistemas de Curahuasi Abancay – Apurímac. Tesis presentada para optar al grado de magíster en ciencias mención ecología y recursos naturales Cusco Perú. *UNSAAC Cusco*.
- Aréstegui Pezua, A. (2014). Agro ecosistemas de Curahuasi Abancay – Apurímac. Tesis presentada para optar al grado de magíster en ciencias mención ecología y recursos naturales Cusco Perú. *UNSAAC Cusco*.
- Bailey, & Scott. (2009). *Diagnóstico microbiológico* (Segunda ed.). Panamericana S.A.
- Barrera Necha, L. L., & Garcia Barrera, L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium Sp.* aislado de la papaya (carica papaya). *Centro Isidro, yautepec - Mexico*, 9.
- Cano Perez, C. A. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de hojas de *minthostachys mollis* (muña). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Cano, C. A. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de hojas de *minthostachys mollis* (muña). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Carhuapoma, M., & Lopez, S. (2009). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "Ruyaq muña". *UNMSM*.
- Cerpa, M. G. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales, Modelado y Caracterización. *Universidad de Valladolid*, 304.
- Collura, M. (1964). *Valor de cultivo de plantas aromáticas*. Buenos Aires: Colecciones Agropecuarias.
- Davidson, M. (2001). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds*. USA: ASM.
- Huacac Quintana, V. (2007). Efecto del Biol en la incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo de anís (*Pimpinella Anisum*) en Curahuasi. *UNSAAC-Cusco*.
- Huacac, V. V. (2007). Efecto del Biol en la incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo de anís (*Pimpinella Anisum*) en Curahuasi. *UNSAAC-Cusco*.
- Huaman Sosa, J. R. (1995). *El cultivo de anís en el valle de Curahuasi*. Lima - Peru: 1 era.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. *Current Medicinal Chem* 10.
- Lendoza, s., Barreiro, J. A., & Sandoval, A. (1994). *Higiene y saneamiento en la preparacion y servicios de alimentos*. Caracas, Venezuela: Serie Biologica.

- Lendoza, s., Barreiro, J. A., & Sandoval, A. (1994). *Higiene y saneamiento en la preparacion y servicios de alimentos*. Caracas, Venezuela: Serie Biologica.
- Lock de Ugaz, O. (1994). Investigación fisicoquímica, métodos de estudio de productos naturales. *Pontificie Universidad Católica del Perú*.
- Lock, O. (1994). Investigación fisicoquímica, métodos de estudio de productos naturales. *Pontificie Universidad Católica del Perú*.
- Maguna , F., Romero , A., & Garro, O. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenos. *Facultad de Agroindustrias - UNNE*, 4.
- Martinez M., A. (2003). *Aceites escenciales*. Colombia.
- Martinez, A. (2003). *Aceites escenciales*. Colombia.
- Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos* (Primera ed.). México.
- Ortuño, S. (2006). *Manual práctico de aceites escenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana.
- Ref, M. K. (1981). Analisis microbiologico. *Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentacion*, 10-11.
- Sanchez, C. Y., & Bedoya , J. C. (2002). Estudio del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Aloysia triphylla* sobre Cepas *S. aureus* y *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Politecnico colombiano Jaime Isaza Cadavid*.
- Segovia , I., & Suarez, L. (2010). Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith "chincho" y actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica. *UNMSM*.
- SIMENA. (2004). Sistema de información para el manejo empresarial del negocio agrícola. *Boletin de informacion de mercado del anís*.
- Tello, S. C. (2011). Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de muña-muña (*Satureja brevicalyx*) frente a microorganismos patógenos . *Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac*.
- Velásquez Alcántara, H. (2011). Efecto nocivo de Agroquímicos en el proceso de cultivo de anís en Curahuasi. *CEDES Apurímac*.
- Velásquez Reynaga, J. (1999). Determinación del agente causal de la mancha de roja en el anís" (*Pimpinellaanisum*L.) . *Facultad de Biología UNSAAC – Cusco*.
- Velásquez, H. (2011). Efecto nocivo de Agroquímicos en el proceso de cultivo de anís en Curahuasi. *CEDES Apurímac*.
- Velásquez, J. (1999). Determinación del agente causal de la mancha de roja en el anís" (*Pimpinellaanisum*L.) . *Facultad de Biología UNSAAC – Cusco*.