

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN
DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE WISKATAYA (*Senecio graveolens* Wedd)
SOBRE DOS CEPAS BACTERIANAS**

6360

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

KIEV OCHOA PUMAYLLE

Abancay, Marzo de 2012

PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
T IAG 0 2012	
	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	28 MAR 2012
Nº DE INGRESO:	00253



**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN
DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE
ESENCIAL DE WISKATAYA (*Senecio graveolens* Wedd)
SOBRE DOS CEPAS BACTERIANAS**

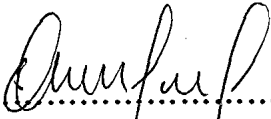


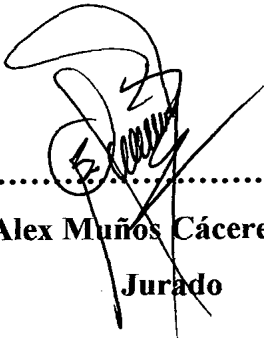
**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

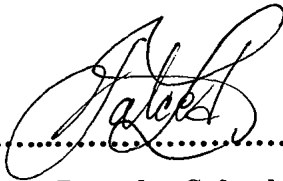
**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

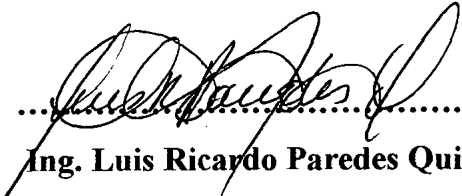
**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE
WISKATAYA (*Senecio graveolens* Wedd) SOBRE DOS CEPAS
BACTERIANAS**

Jurado calificador integrado por:

.....

Blgo. Trifón Oros Huayhua
Presidente

.....

Ing. Alex Muñoz Cáceres
Jurado

.....

Ing. Lourdes Salcedo Sucasaca
Jurado

.....

Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz
Asesor



DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación dedico a mi tierra querida Puquio y a todos aquellos que me han enseñado a amar, respetar y valorar la familia. De manera especial a mi hija Yumma Ochoa C.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por todo lo brindado, a sus autoridades y a su personal académico, mis maestros, que sin ellos no hubiera podido comprender lo hermoso de la Agroindustria en el país y el mundo.

A mi asesor que con mucha comprensión y con mucha determinación hizo que este trabajo saliera a la luz. Al Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz que bajo su dirección se terminó esta tesis.

Al Ministerio de Educación a través de la Oficina de Becas y Crédito Educativo - OBEC, con la beca "Santiago Antúnez de Mayolo Gomero" - Convocatoria 2010. Por financiar en parte el desarrollo de esta memoria.

A la Empresa Biokawsay S.A.C por financiar mis viajes, material bibliográfico, internet y alimentación.

A Dirección Regional de la Producción Apurímac PRODUCE por facilitar su instalación y equipo para la extracción del aceite esencial.

Al Prof. Alfonso Ángel Ochoa Mitma, a quien tengo el orgullo de llamar padre. Gracias por tus sabios consejos y tus días a mi lado, siempre fuiste y serás un enorme apoyo y ejemplo a seguir.

A mi madre, la Prof. Yeny Victoria Pumaylle Espejo, pues sin ella no hubiera podido comprender todos los detalles de las propiedades de las plantas medicinales, y tal vez ni siquiera hubiera podido escribir algo como esto, me llenas de sabiduría todos los días, además de amor, comprensión y cariño.

A mi hermano, Isaí Ochoa Pumaylle con quien compartí momentos felices y por su apoyo en estos años.



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es extraer, caracterizar y determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 29923. Se recolectó a una altitud de 3800 msnm en el Distrito de Puquio, Provincia de Lucanas, Región Ayacucho. El aceite esencial se obtuvo por un sistema de destilación por arrastre con vapor de agua, logrando un rendimiento de 1,27% p/p, al cual se practicaron ensayos físicos: densidad 0,8755 g/ml, índice de refracción 1,4726, índice de rotación 102°85' y miscible en etanol. La composición química se determinó por Cromatografía de gases, destacándose en el cromatograma identificaciones de los siguientes compuestos: Sabineno 56,39%; (+)-4-carene 8,20%; τ -terpinen 7,11%; β -myrcene 6,74%; 4-terpinenol 3,78%; Pulegone 3,67%. La determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* se realizó por el método de difusión en agar y en la formación de halos de inhibición contra cepas de microorganismos gram positivo, como: *Staphylococcus aureus* ATCC 29923 y gram negativo, como *Escherichia coli*, demostrando actividad antibacteriana significativa a concentraciones de 100, 90 y 80% en ambas cepas. La presencia de terpenos (monoterpenos y diterpenos), triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, validan la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

Palabras clave: *Senecio graveolens* Wedd., aceite esencial, composición química, actividad antibacteriana.



SUMMARY

EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL WISKATAYA (*Senecio graveolens* Wedd) IN BACTERIAL STRAINS

The aim of this study is to extract, characterize and determine the antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd., against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* ATCC 29923. The leaves and stems of *Senecio graveolens* Wedd., were collected in the District Puquio, Province Lucanas, Region Ayacucho. The essential oil was obtained by a distillation system with water vapor, resulting in a yield of 1,27% p/p, which were carried out physical tests: density 0,8755 g/ml, refractive index 1.4726, rotation rate 102° 85' and miscible in ethanol. The chemical composition was determined by gas chromatography, standing in the chromatogram identification of the following compounds: sabinene 56,39%; (+)-4-carene 8,20%; τ -terpinen 7,11%; β -myrcene 6,74%; 4-terpinenol 3,78%; pulegone 3,67%. Determination of antibacterial activity in vitro was performed by the agar diffusion method and the formation of halos of inhibition against gram-positive strains such as *Staphylococcus aureus* ATCC 29923 and gram negative, *Escherichia coli*, demonstrating activity significant antibacterial concentrations of 100, 90 and 80% in both strains. The presences of terpenes (monoterpenes and diterpenes), triterpenes, sesquiterpene lactones, flavonoids, the validate.

Keywords: *Senecio graveolens* Wedd., Essential oil, chemical composition, antibacterial activity.



TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Planta en estudio: <i>Senecio graveolens</i> Wedd.....	3
2.1.1. Descripción taxonómica.....	3
2.1.2. Descripción técnica.....	4
2.1.3. Distribución geográfica del <i>Senecio graveolens</i> Wedd.....	5
2.1.4. Usos del <i>Senecio graveolens</i> Wedd.....	5
2.2. Aceite esencial.....	5
2.2.1. Definiciones.....	5
2.2.2. Biosíntesis de los aceites esenciales.....	5
2.2.3. Distribución de los aceites esenciales en los vegetales.....	7
2.2.4. Función de los aceites esenciales en los vegetales.....	7
2.2.5. Propiedades físicas de los aceites esenciales.....	7
2.2.6. Usos de los aceites esenciales.....	8
2.3. Métodos de extracción.....	9
2.3.1. Destilación por arrastre de vapor con agua.....	9
2.3.2. Rendimientos del aceite esencial por la técnica destilación por arrastre con vapor de agua.....	10
2.4. Factores que influyen en la composición y el rendimiento del aceite esencial.....	10
2.5. Caracterización del aceite esencial.....	11



Sección	Página
2.5.1. Análisis físicos.....	11
2.5.1. Cromatografía.....	14
2.6. Composición química de los aceites esenciales.....	16
2.7. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.....	20
2.8. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.....	20
2.9. Ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i>	22
2.10. Susceptibilidad de las bacterias gramnegativas y grampositivas.....	23
2.11. Descripción de las cepas microbianas.....	24
III. Materiales y Métodos	
3.1. Materia prima.....	27
3.2. Cepas bacterianas.....	27
3.3. Equipos.....	27
3.4. Materiales.....	28
3.5. Reactivos.....	28
3.6. Medios de cultivo.....	28
3.7. Métodos.....	30
3.7.1. Etapa I - Preparación de muestra.....	30
3.7.2. Etapa II - Extracción del aceite esencial.....	30
3.7.3. Etapa III - Análisis físicos en el aceite esencial.....	31
3.7.4. Etapa IV- Análisis químico por cromatografía.....	32
3.7.5. Etapa V - Determinación de la actividad antimicrobiana..	33
3.8. Diseño experimental.....	35



Sección	Página
3.9. Procesamiento estadístico de datos.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
4.1. Extracción por el sistema de destilación por arrastre con vapor de agua.....	36
4.2. Análisis físicos del aceite esencial.....	37
4.3. Análisis químico del aceite esencial.....	38
4.4. Actividad antibacteriana del aceite esencial.....	44
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones.....	54
5.2. Recomendaciones.....	55
VI. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	56
ANEXOS.....	62



ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro	Descripción	Página
1	Aplicaciones de los aceites esenciales en las distintas industrias	8
2	Rendimiento de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas por la técnica destilación por arrastre con vapor de agua.	10
3	Densidades relativas a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.	11
4	Índice de refracción a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.	12
5	Rotación específica a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.	13
6	Principales compuestos presentes en los aceites esenciales.	17
7	Compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales con propiedades antimicrobianas.	18
8	Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial de naranja - Formación de halos de inhibición.	19
9	Actividad antimicrobiana de aceite esencial de <i>Senecio musterssi</i> y <i>Senecio subpanduratus</i> .	20
10	Esquema del diseño experimental para determinar MIC.	35
11	Parámetros presentes en la extracción de aceite esencial de Wiskataya.	36



Cuadro	Descripción	Página
12	Principales constantes físicas del aceite esencial.	37
13	Características sensoriales del aceite esencial de Wiskataya.	37
14	Caracterización de los componentes químicos del aceite esencial.	43
15	Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Senecio graveolens</i> Wedd., en <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29923.	44
16	Halos de inhibición antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya (<i>Senecio graveolens</i> Wedd.) por difusión en agar (mm).	46
17	Rendimiento antibacteriano del aceite esencial de <i>Senecio graveolens</i> Wedd (%) en referencia a la amoxicilina.	48
18	Actividad inhibitoria del aceite esencial según el antibiograma propuesta por NCCLS.	49
19	Esquematización del diseño de bloques completos al azar para realizar el ANOVA.	50
20	ANOVA para las concentraciones del aceite esencial de Wiskataya.	51
21	Diluciones de etanol en 100 ml de mezcla (% v/v) a \pm 0.1%	80



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Especie de <i>Senecio graveolens</i> Wedd.	4
2	Rutas biosintéticas del metabolismo secundario.	6
3	Esquema general de cromatógrafo de masas.	14
4	Esquema de la pared celular de gramnegativos.	23
5	Esquema de la pared celular de grampositivos.	24
6	Microfotografía de contraste de <i>Escherichia coli</i> .	25
7	Microfotografía de contraste de <i>Staphylococcus aureus</i> .	26
8	Diagrama de flujo general.	29
9	Determinación de terpenos.	38
10	Perfil cromatográfico típico del aceite esencial.	39
11	Espectro de masas de Sabinene.	40
12	Espectro de masas de β -Myrcene.	40
13	Espectro de masas de (+)-4-Carene.	41
14	Espectro de masas de τ -Terpinen.	41
15	Espectro de masas de 4-Terpinenol.	42
16	Espectro de masas de Pulegone.	42
17	Actividad antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya.	45
18	Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	45
19	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 29923.	45
20	Halos de inhibición antibacteriana del aceite esencial.	46



INTRODUCCIÓN.

La región andina del Perú posee una variada flora siendo una de ellas la Wiskataya (*Senecio graveolens* Wedd.), esta especie vegetal se desarrolla sobre los 3800 msnm en llanuras y quebradas, reportadas en las regiones de Apurímac, Ayacucho, Arequipa, Huancavelica, Huánuco, Cusco y Puno. Se utiliza en la medicina tradicional para aliviar malestares estomacales y el soroche.

El objetivo principal de esta investigación fue extraer, caracterizar y determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., sobre dos cepas bacterianas, para ello se ha especificado el estudio en extraer el aceite esencial por el sistema de destilación por arrastre con vapor de agua; determinar las propiedades físicas (densidad, solubilidad en etanol, índice de refracción e índice de rotación); determinar los compuestos químicos; finalmente determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en agar.

Las variables independientes a estudiar son: método de extracción del aceite esencial; concentraciones del aceite esencial y cepas bacterianas. Como variables dependientes: caracterización físico-química y la actividad antibacteriana. Se evaluó la interacción de 5 tratamientos y 2 bloques, cada tratamiento interactúa sobre las bacterias de manera diferente, de acuerdo a sus necesidades fisiológicas a demás cada microorganismo independientemente genera sus propios mecanismos de defensa. Por tanto, dependerá mucho de la concentración, composición química y difusibilidad del aceite esencial para distorsionar el peptidoglicano y generar ruptura de la pared celular.

Los antibióticos desde tiempos muy remotos cumplen un papel importante en la protección de salud, el mal uso y abuso ya sea en el hogar, hospitales, comunidades originaron el surgimiento y transmisión de cepas bacterianas con resistencia. Su consumo tiene un gran impacto en la ecología bacteriana tanto en humanos como en animales. A su vez, para su actividad requieren que las bacterias se encuentren en división activa y que encuentre su sitio blanco.

De igual manera las plantas medicinales se han utilizado de generación en generación como extractos y aceites esenciales. El uso de aceites esenciales implica la acción de múltiples compuestos a la vez, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra por lo que entonces es posible que puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes a agentes antimicrobianos de uso común.

La recolección del *Senecio graveolens* Wedd., en el distrito de Puquio, se debe a la necesidad de incorporar esta nueva especie a los procesos de la agroindustria, evitando así que cada año se pierda en su medio natural producto del abandono y desaprovechamiento. Con la extracción del aceite esencial se pretende dar un valor agregado e incrementar su valor económico como comercial en los mercados locales y nacionales. La caracterización química por cromatografía de gases servirá como referencia en investigaciones futuras y orientar su uso como agente antibacteriano. La actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial sobre microorganismos como: *Staphylococcus aureus* causante de enfermedades nosocomiales en ancianos e infantes y la *Escherichia coli* productoras de diarreas leves y persistentes. Se realiza con el fin de masificar su uso en la industria farmacéutica.



II. MARCO TEÓRICO

2.1. Planta en estudio: *Senecio graveolens* Wedd.

Pertenece a la familia de Asteraceae, angiosperma con mayor riqueza y diversidad biológica, ocupa el segundo lugar entre las familias más diversas de la flora peruana, presenta alrededor de 250 géneros y 1590 especies, mayormente hierbas, arbustos y subarbustos (*Senecio*, *Gynoxys*, etc.) (*Beltrán et al.*, 1996).

Senecio, es uno de los géneros más diversos de las asteráceas. En el Perú están registrados 174 especies de *Senecio* pero se continúan descubriendo especies nuevas (*Beltrán et al.*, 1996).

2.1.1. Descripción taxonómica.

Taxonomía:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	<i>Senecio</i>
Especie	:	<i>Senecio graveolens</i> .

(*Beltrán et al.*, 1996.)

Nombre científico:

Senecio graveolens Wedd.

Nombre común:

Wiskataya, Chachacoma, Taya de puna.





Figura 1. Especie de *Senecio graveolens* Wedd., Lugar denominado Ccechuica, comunidad campesina de Chaupi, distrito Puquio - 2011.

2.1.2. Descripción técnica.

El *Senecio graveolens* Wedd, es una planta herbácea anual que puede alcanzar una altura de 0,80 a 1,20 cm, cuenta con moderada masa foliar, es de raíz pivotante y tallo semileñoso, sus hojas son alternas abrazando el tallo, de 0,8 a 2 cm de largo (incluyendo el pecíolo), de 0,4 a 0,8 cm de ancho, el borde es dentado. Las flores son de cabezuelas discoidales, escasas a numerosas, de 6 a 10 mm de alto, sobre pedúnculos de 0.2 a 1.5 cm de largo, bracteolados, cilíndrico o ligeramente campanulado, receptáculo plano o ligeramente convexo; de color amarillos, rojos y blancos. Los frutos y semillas son aquenios maduros elipsoides a subcilíndricos (Villagrán *et al.*, 2004).

2.1.3. Distribución geográfica del *Senecio graveolens* Wedd.

Está distribuida en los Andes de Argentina, Bolivia, Chile y Perú. En el territorio peruano se encuentra en las regiones de Apurímac, Ayacucho, Arequipa, Cusco, Huánuco, Huancavelica y Puno, desarrollándose en laderas y quebradas sobre los 3800 msnm (Salvador *et al.*, 2009).

2.1.4. Usos del *Senecio graveolens* Wedd.

Como medicina tradicional, se utiliza la infusión de tallos y hojas para dolores estomacales y mal de altura (soroche), el exceso de esta planta causa la ceguera. También se recomienda para la fiebre, tos y resfriado fuerte el humo respirado en sahumero. Sirve para preparar pomadas para los dolores musculares. (Villagrán *et al.*, 2004).

2.2. Aceite esencial.

2.2.1. Definiciones.

Llamados así los constituyentes odoríferos o esencias de una planta (Cano, 2007). Los aceites esenciales son mezclas de sustancias orgánicas volátiles, pertenecientes a diferentes clases de compuestos, hidrocarburos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, flavonoides y lactonas; todos, son productos de largas cadenas de biosíntesis vegetal. (Briga, 1962).

2.2.2. Biosíntesis de los aceites esenciales.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo tanto del organismo como de las células especializadas y a periodos de estrés causados por diversas situaciones entre ellas, la deficiencia de nutrientes, factores ambientales o el ataque de microorganismos



y herbívoros. Se clasifican de acuerdo a sus rutas biosintéticas; las dos rutas principales son el ácido shikímico y el ácido mevalónico. (Juárez, 2010).

Las esencias se producen por la degradación de la clorofila por acción de la luz con formación de esteres y alcoholes dentro de los cloroplastos, estos se van formando durante la fotosíntesis de las células epidérmicas. (Morales, 1973).

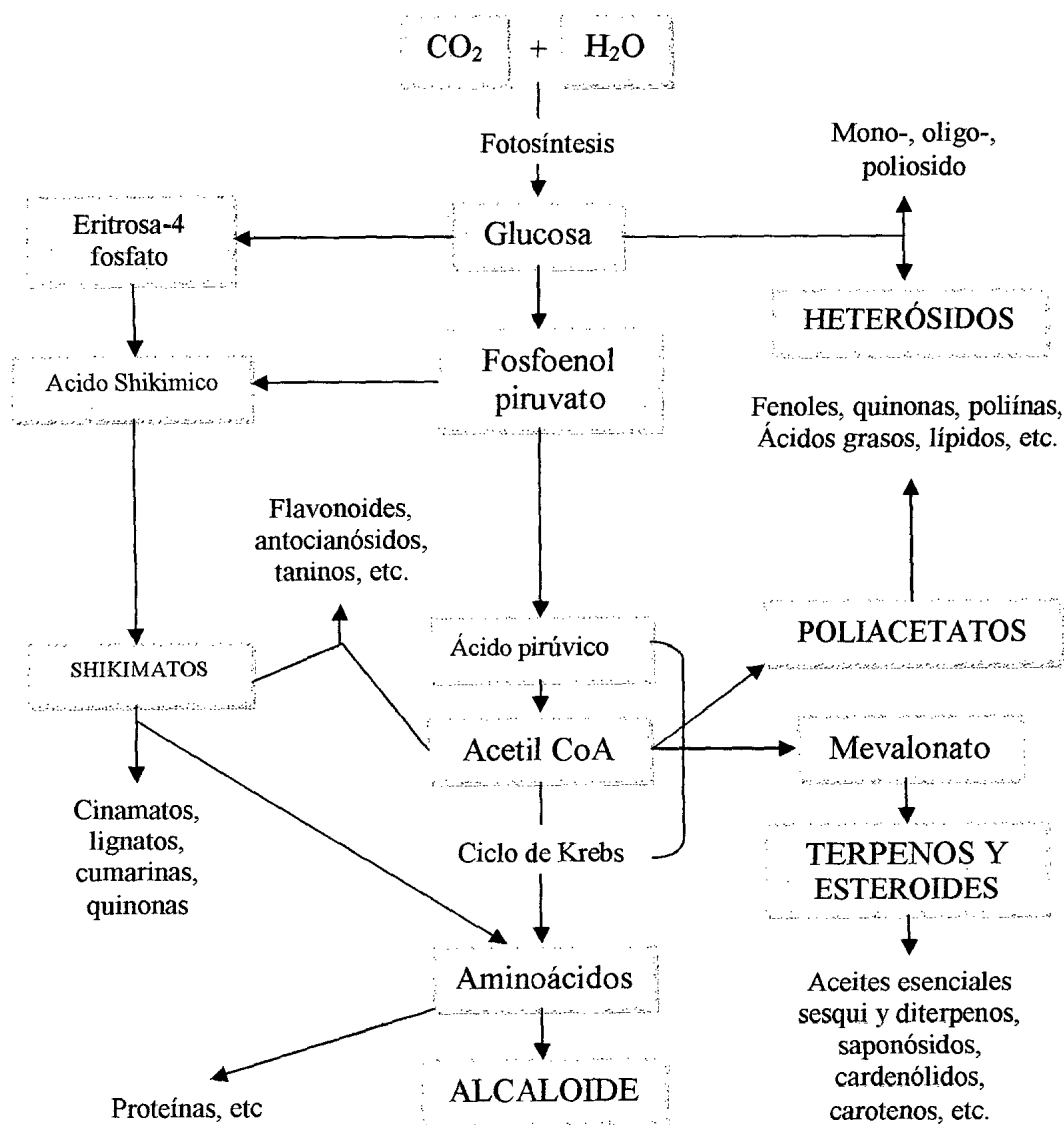


Figura 2. Rutas biosintéticas del metabolismo secundario (Blanco, 2007)

2.2.3. Distribución de los aceites esenciales en los vegetales.

Muchos de estos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas tales como ductos, cavidades secretoras y tricomas glandulares (Juárez, 2010). Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, hierbabuena, menta, romero, salvia, etc.), en las raíces (jengibre, valeriana, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (manzanilla, rosa, etc.) y en los frutos (nuez moscada, pimienta, etc.). (Figuroa, 2003) en el *Senecio graveolens* Wedd., se le puede encontrar en tallos, hojas y flores.

2.2.4. Función de los aceites esenciales en los vegetales.

Las funciones específicas de los aceites esenciales son: Atracción (las flores atraen a los insectos); Repulsión (repele la actuación de insectos nocivos); Cicatrización (evita evaporaciones intensas de agua); Hormonales (en la polinización); Físicas (reguladores de la conductividad calórica y presión osmótica). (Morales, 1973)

2.2.5. Propiedades físicas de los aceites esenciales.

Según (Cano, 2007), las propiedades generales son:

- ◆ 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 y solubles en disolventes orgánicos.



- ♦ Lipófilos.
- ♦ Índice de refracción elevado.

2.2.6. Usos de los aceites esenciales.

Las aplicaciones de los aceites esenciales se deben a sus múltiples compuestos aromáticos, destacando en los diferentes campos de las industrias. Se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Aplicaciones de los aceites esenciales en las distintas industrias.

INDUSTRIA	APLICACIÓN
Alimenticia	Condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, caramelos, aditivos, confitería.
Licorería	Bebidas alcohólicas y no alcohólicas
Farmacéutica	Cremas dentales, analgésicos, inhalantes para descongestionar las vías respiratorias, repelentes de insectos, antisépticos.
Cosmética	Elaboración de perfumes, jabones, colonias, perfumes, maquillajes, cremas.
Pinturas	Emplea limoneno como disolvente biodegradable.
Papelería	Para impregnar fragancias en cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales.
Plásticos	Para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas.
Tabacalera	Demanda de mentol para los cigarrillos mentolados
Textil	Como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido.

Fuente: Bruneton, 2001.



2.3. Métodos de extracción.

Los métodos de obtención de aceites esenciales, quedan englobados en: hidrodestilación, arrastre con vapor de agua, prensado/raspado, extracción con grasa en caliente, extracción con disolventes (extracción con disolventes derivados del petróleo, extracción con fluidos en condiciones supercríticas, extracción con disolventes no derivados de petróleo). (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales son mezclas formadas por muchas sustancias distintas, el método utilizado en su obtención puede influir en la composición del producto obtenido, al menos dentro de un margen. Esto hace que el perfil aromático del aceite esencial pueda variar dependiendo del método empleado en su obtención. Así, en la extracción mediante fluidos supercríticos con dióxido de carbono líquido, se suelen obtener aceites esenciales más viscosos debido a la incorporación de ceras o pigmentos y estos no están presentes en el producto destilado. En la extracción con disolventes derivados del petróleo se suele obtener un producto más concentrado en componentes oxigenados, que son los responsables del aroma (Ortuño, 2006).

2.3.1. Destilación por arrastre de vapor con agua.

El principio básico de la destilación de dos líquidos heterogéneos, como el agua y un aceite esencial, es que cada uno ejerce su propia presión de vapor como si el otro componente estuviera ausente. Cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión atmosférica, la mezcla hierve. Aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300 °C, evaporaran a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. (Cerutti *et al.*, 2004)



2.3.2. Rendimientos del aceite esencial por la técnica destilación por arrastre con vapor de agua.

En general el rendimiento de la extracción en aceites esenciales es muy bajo variando entre el 0,01% y el 2% (Zekario, 2006) y en algunas especies como eucalipto puede alcanzar el 3% (Carhuapoma *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Rendimiento de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas por la técnica destilación por arrastre con vapor de agua.

Nombre común	Nombre científico	Rendimiento	Ref.
Muña	<i>Minthostachys mollis</i>	0,19% p/p.	c
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	1,30% v/p	b
Huamanripa	<i>Senecio tephrosiodes</i>	0,80% v/p	e
Eucalipto	<i>Eucalipto globulus</i>	3% v/p	e
Hierba luisa	<i>Cymbopongo citratus</i>	1% v/p	f
Anís serrano	<i>Tagetes pusilla lag.</i>	1% v/p	e
Arrayán	<i>Luma chequen (molina)A.</i>	1,25% v/p	d
	<i>Senecio subpanduratus</i>	0,81% v/p	a
	<i>Senecio mustersii</i>	0,17% v/p	a

Fuente: (^aArancibia *et al.*, 2010; ^bAlbado, 2001; ^cCano, 2007; ^dCarhuapoma, 2009; ^eLibertad, 2001; ^fPozo, 2006).

2.4. Factores que influyen en la composición química y el rendimiento del aceite esencial.

Según (Blanco, 2007), los factores externos que influyen son: condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo); método de cultivo (uso de fertilizantes, abonos, pesticidas, otros agentes químicos); el tipo de especie vegetal, época de recolección y parte de la planta (raíz, tallo, hojas, semillas); manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado); método

de extracción (arrastre con vapor, expresión, hidrodestilación asistida con la radiación de microondas), etc. Y los factores internos son generalmente genéticos.

2.5. Caracterización del aceite esencial.

2.5.1. Análisis físicos.

Los parámetros físicos de los aceites esenciales permiten detectar de forma rápida alteraciones en alguna de las fases de producción o son indicativos de la presencia de algunos constituyentes del aceite (Liberti *et al.*, 1973).

2.5.1.1. Densidad.

Es la masa de un cuerpo que ocupa un volumen determinado, expresada en g/ml, a una temperatura dada (20°C). La temperatura de la determinación no debe diferir de la referencia en más de 5°C (Albaladejo, 1999).

Cuadro 3. Densidades relativas a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.

Nombre común	Nombre científico	Densidad	Ref.
Muña	<i>Minthostachys mollis</i>	0,9189 g/ml	b
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	0,9232 g/ml	a
Limón	<i>Citrus limón</i> (L) Burman	0,8550 g/ml	c
Salvia morada	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br	0.8843 g/ml	d

Fuente: (^aAlbado, 2001; ^bCano, 2007; ^cAlbaladejo, 1999; ^dGraviela *et al.*, 2000).

2.5.1.2. Índice de refracción.

El índice de refracción de una sustancia dada es la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniencia práctica se refiere a la relación aire sustancia. Es igualmente la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de



refracción (AENOR, 1984). Este parámetro, varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y la temperatura. Salvo indicación contraria el índice de refracción viene referido a la longitud de onda correspondiente a la línea D 589,3 nm de la luz del sodio.

Cuadro 4. Índice de refracción a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.

Nombre común	Nombre científico	Índice de refracción	Ref.
Muña	<i>Minthostachys mollis</i>	1,4727	b
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	1,4774	a
Arrayán	<i>Luma chequen</i> (molina)A.	1,4700	c
Limón	<i>Citrus limón</i> (L) Burman	1,4760	d
María negra	<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.)	1,4966	e
Salvia morada	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br	1.4916	f

Fuente: (^aAlbado, 2001; ^bCano, 2007; ^cCarhuapoma, 2009; ^dAlbaladejo, 1999; ^eAgrelo *et al.*, 2005; ^fGraviela *et al.*, 2000).

2.5.1.3. Desviación polarimétrica y poder rotatorio específico.

La desviación polarimétrica de un aceite esencial es el ángulo sobre el cual gira el plano de polarización de la luz cuando esta atraviesa cierto espesor de aceite esencial en condiciones determinadas. La desviación polarimétrica es aquella que se mide a través de un espesor de 1 dm, o través de un espesor diferente convertido a 1 dm; dicha desviación se expresa en grados y minutos, a una temperatura conocida, generalmente 20°C y en relación a una longitud de onda de luz señalada. (NTP, 319.076. 1988).

El poder rotatorio específico de un aceite esencial es igual al ángulo sobre el cual rotaría el plano de polarización de la luz si esta atravesara un espesor de 1 dm de una solución convencional de aceite esencial que contuviera 1 g de sustancia activa por mililitro. Se expresa en grados y minutos, a una temperatura conocida, generalmente 20°C, y en relación a una longitud de onda de luz señalada. (NTP. 319.076. 1988).

Cuadro 5. Rotación específica a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.

Nombre común	Nombre científico	Rotación	Ref.
Muña	<i>Minthostachys mollis</i>	+3° 45	a
Arrayán	<i>Luma chequen</i> (molina)A.	+6° 8	b
Salvia	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br	- 21.26°	d
María negra	<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.)	-19,96°	e
Limón	<i>Citrus limón</i> (L) Burman	+62,98°	c

Fuente: (ªCano, 2007; ºCarhuapoma, 2009; ºAlbaladejo, 1999; ºGrabriela *et al.*, 2000; ºAgrelo *et al.*, 2005).

2.5.1.4. Solubilidad en etanol.

Generalmente los aceites esenciales son sólo ligeramente solubles en agua y miscibles en etanol absoluto. Es una ayuda rápida en la evaluación de su calidad; aceites esenciales ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en etanol diluido que los aceites en cuya composición predominan los hidrocarburos terpénicos (Albaladejo, 1999). La solubilidad disminuye en aceites esenciales envejecidos, producto de la polimerización de hidrocarburos terpénicos (polímeros insolubles) (NMX-R-050, 1975).



2.5.2. Cromatografía.

La cromatografía es un método de separación. Los componentes al ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración (IUPAC). (Olguín, 2004)

2.5.2.1. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es el método más rápido para analizar cualquier sustancia volátil, se trata de muestras volátiles a determinada temperatura ya que los ácidos grasos y lípidos a condiciones normales, son muy poco volátiles Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. (Castillos, 1979).

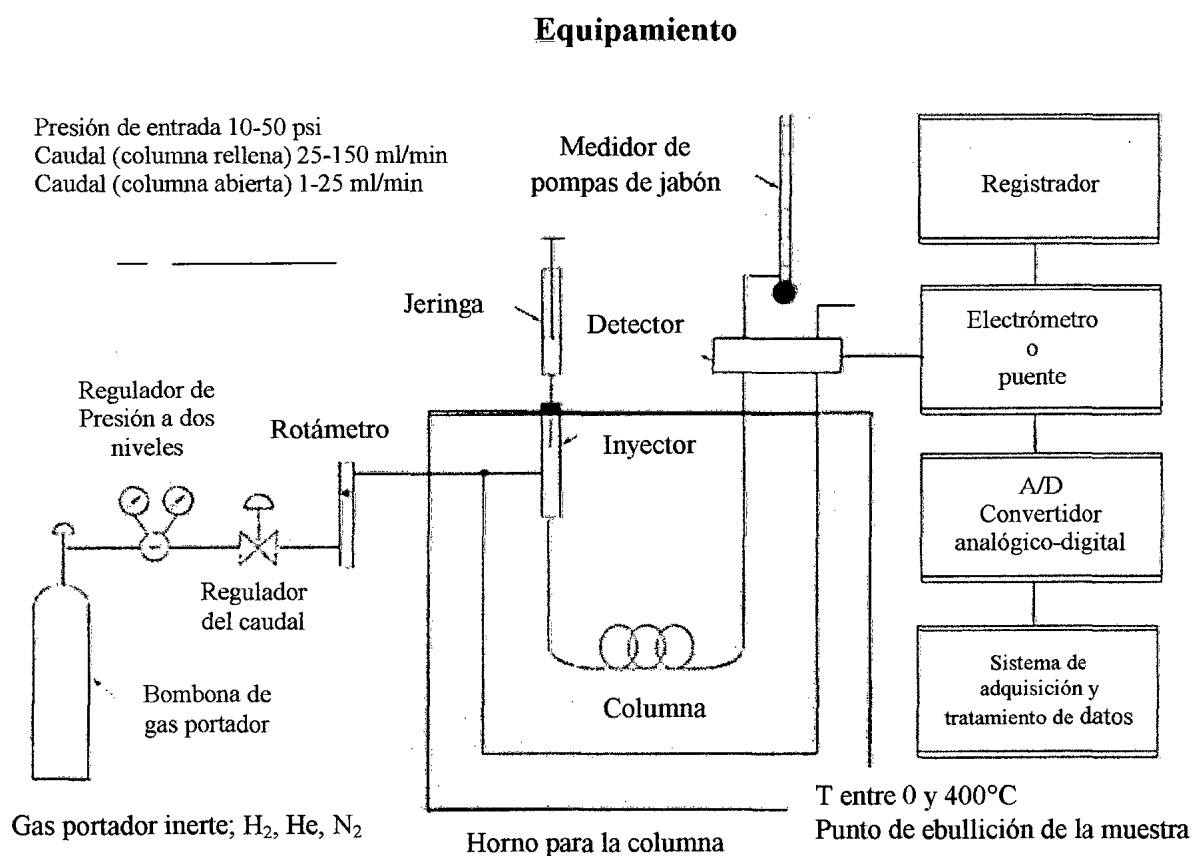


Figura 3. Esquema general de cromatógrafo de masas. (Olguin *et al.*, 2004).

2.5.2.2. Cromatografía plana.

Los métodos de cromatografía plana incluyen la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía en papel (PC). Es una técnica muy sensible y económica y es utilizada en la caracterización preliminar de los aceites esenciales.

En todos los casos se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a su vez es el soporte que recubre una superficie de vidrio, plástico o metal. La fase móvil se mueve a través de la estacionaria por capilaridad, por gravedad o por aplicación de un potencial eléctrico. (Aburrá *et al.*, 2001).

Según (Robert, 1992) para la identificación de compuestos se hace uso de algunos reactivos.

- **Reactivo de Liebermann-Bürchard.** Mezcla en partes iguales de anhídrido acético y ácido sulfúrico que sirve para revelar la presencia de compuestos orgánicos como triterpenos, que producen una coloración violeta y esteroides de coloración que varía de rosa a verde ó pardas.
- **Reactivo de p-anisaldehído sulfúrico.** Preparado con p-anisaldehído, ácido acético glacial, metanol y ácido sulfúrico concentrado, permite detectar la presencia de terpenos y saponinas triterpénicas, por medio de la aparición de coloraciones que varían del azul al violeta.
- **Reactivo de FeCl_3 .** Se utiliza para identificar compuestos de estructura fenólica, taninos. Según la naturaleza química del tanino se observa coloraciones de azul-negro (pirogálicos) hasta verde (catéquicos). Compuestos como los flavonoides pueden generar coloraciones verdes.



2.6. Composición química de los aceites esenciales.

Los componentes mayoritarios son hidrocarburos terpénicos (sin aroma o con poca contribución al aroma global) y los minoritarios son los responsables del aroma característico del aceite esencial y quedan englobados en distintas familias químicas (Ortuño, 2006).

Los hidrocarburos terpénicos (terpenos y terpenoides) son; Aldehídos (aldehído benzoico, aldehído cinámico, butanal, propanal); Ácidos (acético, palmítico); Alcoholes (linalol, geraniol, mentol); Fenoles (anetol, eugenol); Ésteres (acetato de linalilo, acetato de geranilo); Cetonas (tuyona); Otros (éteres, derivados nitrogenados, sulfuros, tioéteres, tioésteres) (Ortuño, 2006).

En la composición química de los aceites esenciales de algunas especies del género *Senecio* tales como: *Senecio trapezuntinus* el compuesto principal es (E)- β -farnesene (26,3%); *Senecio vernalis* Waldst. & Kit., de Irán siendo los mejores constituyentes el Spathulenol (37,1%), 1,8-cineole (19,0%), m-cymene (16,6%), y α -phellandrene (3,4%); *Senecio vernalis* Waldst. & Kit. en Turquía., sus principales compuestos son β -pinene (13,0%), α -pinene (10,5%), Δ -3-carene (10,4%), germacrene D (8,6%), α -phellandrene (8,3%), Z- β -ocimene (4,7%), y α -humulene (4,5%); *Senecio graveolens* (compositae) el compuesto principal es Isovaleraldehído, α -pineno, α -filandreno, α -terpineno, p-cimeno, sabineno, γ -terpineno, 1-metil-4-isopropenilbenzeno, terpinoleno, terpinen-4-ol, piperitenone, α y β eudesmol.; El mejor constituyente del aceite esencial de *Senecio mutans* Sch. Bip es α -phellandrene, p-cymene, sabinene y α -terpinene. (Kahrman *et al.*, 2010)



Cuadro 6. Principales compuestos presentes en los aceites esenciales.

TERPENOS	ALDEÍDOS Y CETONAS	ALCOHOLES
Mirceno	Hexanal	Hexanol
Ocimeno	Heptanal	Octanol
Limoneno	Octanal	Nonanol
Terpinoleno	Nonanal	Decanol
α -terpinoleno	Decanal	Hexen-3-ol
α -felanfreno	Undecanal	Citronelol
α -tuyeno	Dodecanal	Linalol
α -pineno	Tridecanal	Geraniol
β -felandreno	Pentadecanal	Nerol
β -pineno	Hexadecanal	Terpinenol
Sabineno	Citronelal	α -terpineol
Δ -3-careno	Neral	Terpinen-4-ol
Canfeno	Geranial	Tetrahydrogeraniol
p-cimeno	Metilheptenona	Trans-carveol
α -dimetilestireno	Carvona	1,8-p-mentadien-9-ol

SESQUITERPENOS	ÁCIDOS	ÉSTERES
α -humuleno	Acético	Acetato de octilo
α -bergamoteno	Caprílico	Caprilato de nonilo
β -bisaboleno	Cáprico	Acetato de nonilo
β -humuleno	Láurico	Aceto de decilo
Cariofileno	Mirístico	Acetato de citronelilo
ϵ -cadineno	Palmítico	Pelargonato de decilo
	Oleico	Acetato de geranilo
	Linoleico	Acetato de nerilo
	linolénico	Acetato de terpenilo

Fuente: Albaladejo, 1999.



Cuadro 7. Compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales con propiedades antimicrobianas.

Nombre común del aceite esencial	Nombre científico de la planta	Compuestos mayoritarios	Composición aproximada	Ref.
Canela	<i>Cinnamomun zeylandicum</i>	Trans-cimaldehido	65%	d
Orégano	<i>Oreganum vulgare</i>	Cis sabinene hydrate 4-terpineol Palmitic acid carvacrol	18,66% 9,43% 8,39% 7,72%	a
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno bornil acetato canfor 1.8-cineol	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%	d
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	Canfor α -pineno β -pineno 1.8-cineol α -tujeno	6-15% 4-5% 2-10% 6-14% 20-42%	d
Clavo	<i>Sizygyum aromaticum</i>	Eugenol Eugenil acetato	75-85% 8-15%	d
	<i>Senecio mustersii</i>	α -pineno β -pineno Myrceno p-cymeno Sabineno	53,3% 21,2% 2,3% 1,7% 1,6%	b
	<i>Senecio subpanduratus</i>	α -pineno Sabineno β -pineno Terpinen-4-ol p-cymeno	22,1% 23,8% 11,9% 10,2% 8,7%	b
Chachacoma	<i>Senecio nutans</i> Sch. Bip	α -phellandrene, p-cymene sabinene α -terpinene.	4% 10,5% 30% 22%	c
	<i>Senecio vernalis</i> Waldst. & Kit.	β -pinene α -pinene Δ -3-carene α -phellandrene	13.0% 10.5% 10.4% 8.3%	c

Fuente: (^aAlbado, 2001, ^bArancibia *et al.*, 2010, ^cKahriman *et al.*, 2010;

^dVelázquez, 2005)

2.7. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

La actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe a la presencia de terpenoides que contienen grupos alcoholes, aldehídos, cetonas y fenoles. Los principales mecanismos de acción en los terpenoides consiste en la ruptura de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula bacteriana. (Sánchez *et al.*, 2009).

Derivados fenólicos tales como el carvacrol y el eugenol provenientes de clavo y tomillo causan la desintegración de la membrana de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. (Sánchez *et al.*, 2009). También α y β -pineno son capaces de destruir la integridad celular. (Arancibia *et al.*, 2010).

Cuadro 8. Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de naranja - Formación de halos de inhibición.

Muestra	Concen tración %	Bacterias grampositivas (mm)			Bacterias gramnegativas (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Aceite esencial de naranja	100	28	20	17	Inactivo	11
	50	25	19	15	Inactivo	Inactivo
	10	21	15	Inactivo	Inactivo	Inactivo
Alcohol etílico	96°	inactivo	inactivo	Inactivo	Inactivo	Inactivo

Fuente: (Juárez, 2010)

Cuadro 9. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Senecio musterssi* y *Senecio subpanduratus*.

	Dilución del aceite esencial (v/v)									
	<i>Senecio musterssi</i>					<i>Senecio subpanduratus</i>				
	1/125	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/125	1/250	1/500	1/1000	1/2000
<u>Bacterias</u>										
<i>S. aureus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<u>Levaduras</u>										
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicales</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

(+) actividad antimicrobiana (-) no actividad antimicrobiana

Fuente: (Arancibia *et al.*, 2010).

2.8. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.

La evaluación antimicrobiana de aceites esenciales, se aplica generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. Hay dos técnicas básicas usadas para la valoración de actividades antibacteriales y antimicóticas.

El primer método es difusión en agar (pozo o disco de papel) y el segundo es método de dilución (agar o caldo líquido). Las pruebas y evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad (Kalemba *et al.*, 2003).

2.8.1. Método de difusión en agar.

Permite estimar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos y sus cambios morfológicos de una manera simple. En las placas petri con agar se inocula el microorganismo de prueba; existen dos métodos posibles para la incorporación del aceite esencial que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar. (Guiza, 2007).

Esta técnica tiene la ventaja de utilizar pocas cantidades de placas que se emplean en los otros métodos. Se basa en la colocación de discos o tiras de papel absorbente con concentraciones conocidas de antimicrobianos. (NCCLS, 2000)

Se lleva a cabo de la siguiente forma:

- En una placa con agar Mueller-Hinton (u otro requerido para el microorganismo que se ensaya) se siembra el inóculo en superficie.
- A continuación, se colocan los discos con concentraciones conocidas de los antimicrobianos a estudiar.
- La distancia entre los discos debe ser igual o ligeramente superior a la del radio de la zona de inhibición de los antimicrobianos cuando se examinan por separado.
- Se incuba la placa a 35-37°C durante 16-18 h, tras lo cual se observan los resultados.
- El sinergismo se observa como una zona de inhibición que une los halos de los dos antimicrobianos, mientras que en el antagonismo esta zona de unión aparece con crecimiento visible incluso en las zonas de inhibición de los dos antimicrobianos.



2.8.1.1. Concentración mínima inhibitoria.

Es la concentración más baja del aceite esencial en el caldo, teniendo como resultado la carencia de los cambios visibles del crecimiento del microorganismo (Kalemba, 2003). Informa sobre el nivel de resistencia a un antimicrobiano alcanzado por una población bacteriana en un lugar geográfico particular. La ventaja de su determinación reside en que orienta hacia las dosis clínicas del antibiótico en estudio, lo que debe complementarse con conocimientos sobre la farmacocinética de la droga en una especie animal determinada. (Betancourt, 2003). La concentración mínima inhibitoria (MIC) del aceite esencial de *Senecio graveolens* (compositae) evaluados en *Staphylococcus aureus* es de 10,91 mg/ml (Pérez *et al.*, 2008).

2.8.1.2. Concentración mínima bactericida.

Es la menor concentración del antimicrobiano que destruye el 99.9% del inóculo original, lo que equivale a una disminución de 3 logaritmos decimales con relación al recuento de colonias (UFC) del inóculo inicial. (Vázquez, 2010). La concentración bactericida mínima (MBC) del aceite esencial *S. graveolens*, está por encima de 87.3 mg/ml. Según la proporción del MBC/MIC sería claramente superior que 1 (por encima de 8), indicando un efecto bacteriostático del aceite esencial (Pérez *et al.*, 2008).

2.9. Ensayos de sensibilidad *in vitro*.

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre y animales presentes en los alimentos, por su implicación en toxiinfecciones alimentarias y su capacidad para alterar las propiedades organolépticas de los alimentos. (Hammer, 1999)



La actividad *in vitro* de un antimicrobiano puede no corresponderse siempre con su eficacia *in vivo*. Los valores de MIC y MBC obtenidos *in vitro* deben tomarse siempre como una referencia para el cálculo de su administración en alimentos, siendo necesarios ensayos clínicos y pruebas de campo. (Huerta, 2001.) Las pruebas *in vitro* constituyen por tanto, el primer paso en la valoración de cualquier aceite esencial, sin embargo no existen actualmente protocolos de trabajo estándar para expresar los resultados en una misma unidad de medida, los cuales son muy dispares (% v/v, % p/v, $\mu\text{l/ml}$, g/ml , $\mu\text{l}/\mu\text{l}$). En estas condiciones, la comparación de datos se hace muy difícil. (Marino *et al.*, 2001)

2.10. Susceptibilidad de las bacterias gramnegativas y grampositivas.

La mayoría de los estudios han observado que los aceites esenciales tienen una mayor actividad frente a las bacterias gram positivas que frente a las gram negativas (Smith *et al.*, 1998).

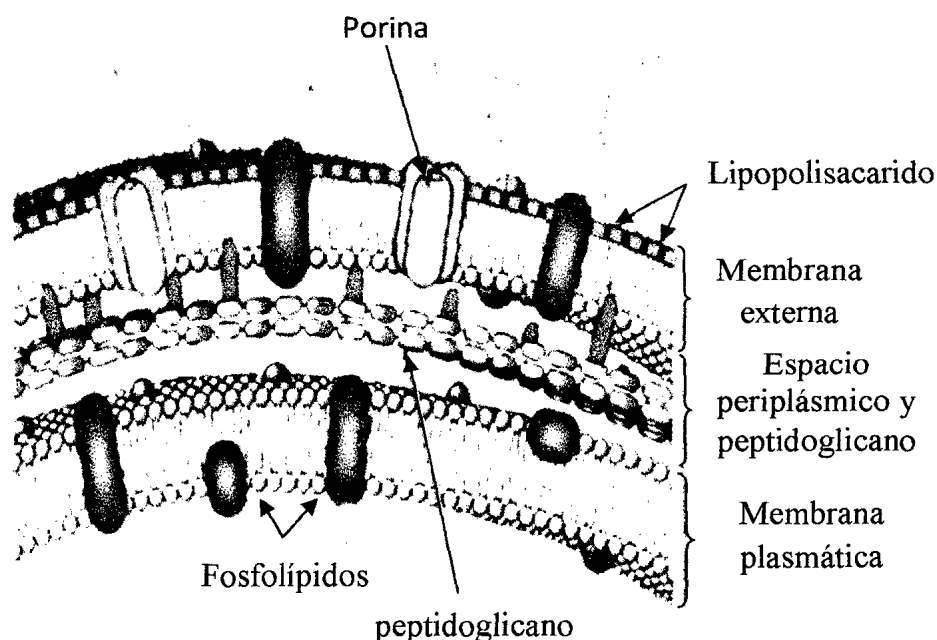


Figura 4. Esquema de la pared celular de gramnegativos (Vázquez, 2010).

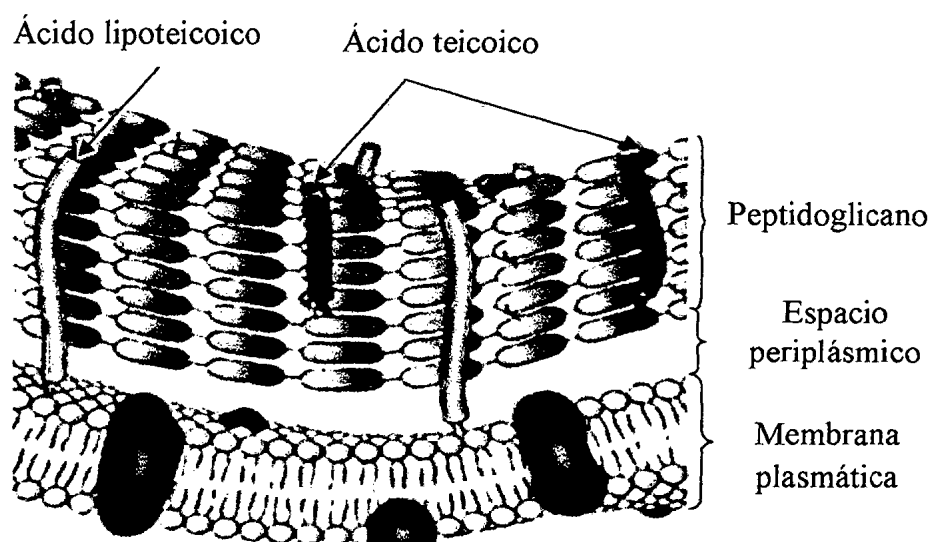


Figura 5. Esquema de la pared celular de grampositivos (Vázquez, 2010).

Las bacterias grampositivas sólo tienen una membrana, la membrana citoplasmática (Figura 5). Por el contrario, las bacterias gramnegativas tienen una membrana externa de fosfolípidos y lipopolisacáridos, además de la membrana citoplasmática (Figura 4)

Las bacterias gramnegativas son menos susceptibles a la acción antibacteriana ya que poseen una membrana externa alrededor de la pared celular, lo que restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cobertura de lipopolisacáridos. A pesar de la presencia de los poros de baja especificidad, la membrana externa tiene una permeabilidad muy baja hacia los compuestos hidrofóbicos, debido a los lipopolisacáridos lipofílicos. (Sikkema *et al.*, 1995).

2.11. Descripción de las cepas microbianas.

2.11.1. *Escherichia coli*.

Son bacilos de 1 a 3 μm por 0.5 μm , sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados:

en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas, no forman esporas. (Llop *et al.*, 2001)

Escherichia coli es un huésped permanente del tracto intestinal del hombre y los animales y no es considerado como un patógeno primario, por su abundancia en el tracto intestinal y su facilidad de cultivo (Llop *et al.*, 2001).

◆ Clasificación.

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *coli*

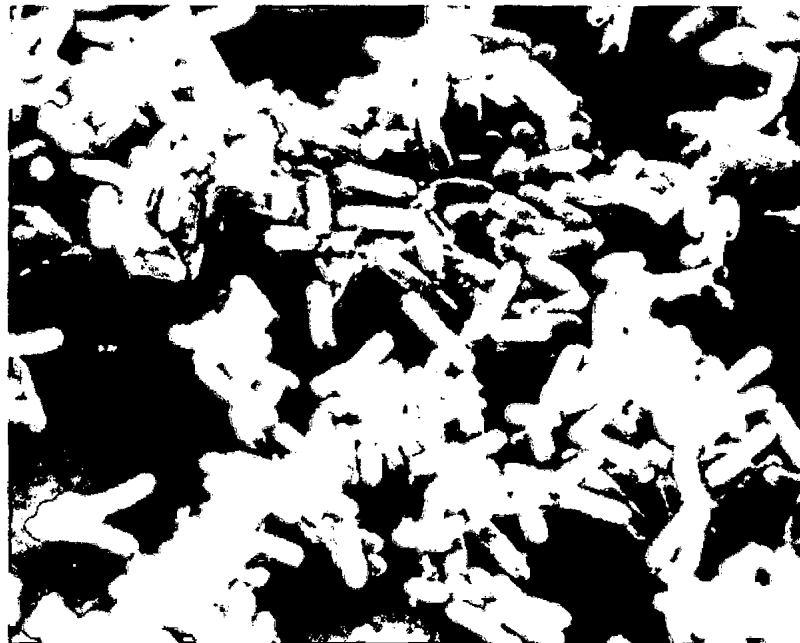


Figura 6. Microfotografía de contraste de *Escherichia coli*
(Prescott *et al.*, 2002)

2.11.2. *Staphylococcus aureus*.

Forma parte de la familia *Micrococaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas. Es un coco grampositivo, no móvil. No

forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. (Llop *et al.*, 2001)

Es un anaerobio facultativo, crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm. *Staphylococcus aureus* produce una gran variedad de proteínas, enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal es degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes. (Madigan *et al.*, 2000)

◆ Clasificación.

Familia: *Micrococaceae*

Género: *Staphylococcus*

Especie: *aureus*

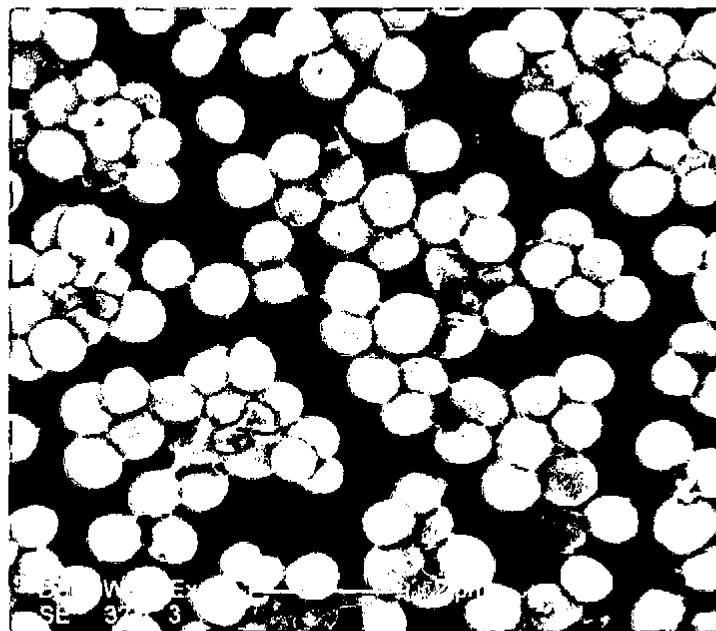


Figura 7. Microfotografía de contraste de *Staphylococcus aureus* (Vázquez, 2010)

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materia prima

La Wiskataya (*Senecio graveolens* Wedd.) fue recolectado el 25 de marzo del 2011, en Km 18 ruta Puquio-Andamarca, lugar denominado Ccechuica (zona volcánica), territorio que pertenece a la comunidad campesina de Chaupi, distrito Puquio, provincia de Lucanas, región Ayacucho, a una altitud de 3800 msnm, siendo transportado a las instalaciones de producción de la Empresa BIOKAWSAY S.A.C., para su procesamiento.

3.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de colección del Laboratorio Veterinario del Sur LABVETSUR.

Gramnegativa.

- ◆ *Escherichia coli*, cepa aislada de un ganado bovino con diagnóstico de colitis hemorrágico en la ciudad de Arequipa.

Grampositiva.

- ◆ *Staphylococcus aureus* ATCC 29923. Cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC)

3.3. Equipos

- Estufa de aire forzado, marca WTC Binder, modelo 4567.
- Balanza analítica, marca Chyo Balance Corp., modelo 305896.
- Balanza de plataforma, capacidad 50 kg.
- Balanza digital, capacidad 5000g. marca Oertling, modelo RC52
- Baño termostático, marca Büchi, modelo B-465.
- Agitador Vortex, marca Cenco Instruments, modelo 34525-200.



- Microscopio compuesto.
- Refractómetro ABBE., marca Ivymen System, Modelo RI-71
- Polarímetro. Marca Dispatch, modelo 02-CF.
- Autoclave de acero inoxidable.
- Refrigeradora, marca Labcold, modelo 0004.
- Cocina eléctrica con dos hornillas.
- Extractor por arrastre con vapor de agua. Material acero inoxidable.

3.4. Materiales

- Unidad de embudo de vidrio, pirex, tamaño mediano.
- Unidad de pera de decantación.
- Unidad de bureta, capacidad 10 ml.
- Vasos precipitados, capacidad 50 ml.
- Botella de vidrio color ámbar, capacidad 20 ml.
- Pipeta volumétrica 1 ml.
- Micropipetas 100 μ l.
- Placa petri descartables.
- Probeta, capacidad 50 ml.
- Unidad de picnómetro 10 ml
- Termómetro médico.

3.5. Reactivos

- Lugol.
- Indicador Rojo de metilo
- Etanol 96°
- Metanol 99°
- Sulfato de sodio

3.6. Medios de cultivo

- Caldo Mueller-Hinton
- Agar Mueller-Hinton
- Agar Sangre
- Agar Mac conkey

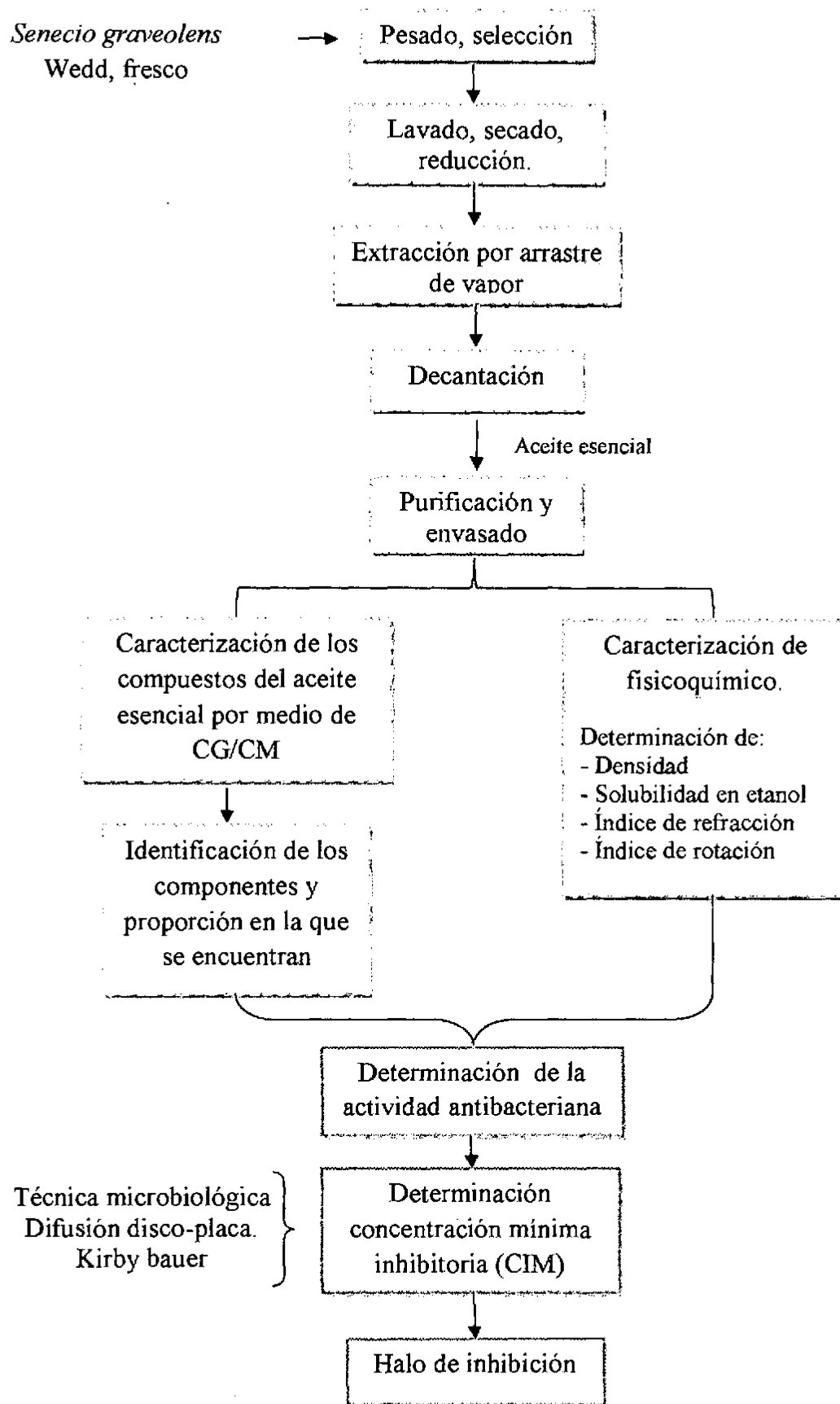


Figura 8. Diagrama de flujo general para la extracción, caracterización y actividad antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya (*Senecio graveolens* Wedd).

3.7. Métodos.

3.7.1. Etapa I –Preparación de muestra.

- a) **Pesado.** Operación realizada en una balanza de plataforma.
- b) **Selección.** Para mantener la homogeneidad y representatividad de la muestra, se seleccionó las mejores partes de la planta (tallos y hojas), los parámetros exigidos fueron frescura y color característico.
- c) **Lavado.** Se utilizó agua potable con la finalidad de remover la materia extraña presente en la planta.
- d) **Secado.** El secado se realizó bajo sombra con ventilación. Se tendió en estantes de malla en las instalaciones de la empresa BOKAWSAY S.A.C.
- e) **Despiece.** El objeto de esta operación es reducir al vegetal en partes más pequeñas, se realizó para facilitar la extracción.

3.7.2. Etapa II – Extracción del aceite esencial por arrastre con vapor de agua.

- a) **Extracción.** La extracción del aceite esencial se realizó en el laboratorio de Dirección Regional de Producción Apurímac PRODUCE, el equipo es un extractor por arrastre con vapor de agua, capacidad 10 kg de materia prima y 20 litros de agua.
- b) **Separación.** Se realizó con la pera de decantación (material de vidrio), aprovechando el principio de la diferencia de densidades existentes en ambos líquidos.
- c) **Purificación.** Se purificó con sulfato de sodio (Na_2SO_4), para evitar la oxidación y deterioro químico del aceite esencial por presencia de agua.

- d) Envasado.** Para preservar sus características físico-químicas, el envasado se realizó en botellas pequeñas de color ámbar de 20 ml.

3.7.3. Etapa III - Análisis físicos en el aceite esencial de Wiskataya.

a) Preparación de muestra.

La muestra se preparó de acuerdo a la Norma Técnica Peruana: NTP 319.077:1974. ACEITES ESENCIALES. Preparación de la muestra para análisis. (Ver anexo 1)

b) Determinación de la densidad por el método picnométrico.

Para determinar la densidad se procedió de acuerdo a la Norma Técnica Peruana: NTP 319.081:1974. ACEITES ESENCIALES. Determinación de la densidad y de la densidad relativa (Ver anexo 2). Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Química general de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial-UNAMBA.

c) Determinación de la solubilidad en etanol.

Se determinó de acuerdo a la norma técnica Mexicana: NMX-K-081-1976. ACEITES ESENCIALES. Determinación de la Solubilidad en Alcohol Etilico, a concentraciones de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96° (Ver anexo 4). Los ensayos se realizaron en el laboratorio de química general de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial-UNAMBA.

d) Determinación del Poder Rotatorio.

El poder rotatorio específico se determinó de acuerdo a la Norma Técnica Peruana: NTP 319.076:1974. ACEITES ESENCIALES. Determinación de la desviación polarimétrica (Ver anexo 3). Se efectúa generalmente sobre el aceite esencial al natural y la determinación del poder rotatorio específico, sobre el



aceite esencial diluido en un solvente. El análisis lo desarrolló el laboratorio de SERVILAB de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa.

e) Determinación del Índice de Refracción.

El análisis lo realizó el laboratorio de SERVILAB de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. El equipo utilizado fue refractómetro ABBE cuyo principio es la relación de aire sustancia medida a 20°C.

3.7.4. Etapa IV – Análisis químico del aceite esencial por cromatografía.

- 1) La caracterización química cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de Wiskataya se determinó por Cromatografía de gases, en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco.
- 2) Y un análisis adicional determinado por cromatografía de capa fina, en el laboratorio de control de calidad de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

3.7.4.1. Análisis instrumental por cromatografía de gases.

Para realizar el análisis cromatográfico se mezcló 10 µl de aceite esencial con 10 ml de metanol; se aforó a 10 ml con metanol en un microtubo de reacción, después de homogeneizar, la mezcla se trasvasó a un vial de 1.5 ml., la caracterización química de los compuestos presentes en el aceite esencial se basó en la comparación de sus espectros de masas, obtenidos por medio de un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 Plus Series GC, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 Network, equipado con un sistema computarizado de datos MSD Chem Station (Versión D.02.00.275); con

los de las bases de datos: NBS 75K, WILEY 138K, ADAMS y NIST v 05 pertenecientes a este sistema.

a). Especificaciones de Cromatógrafo de gases.

- Cromatógrafo de masas, Modelo HP5890 serie II
- Detector de masas agilent 5975B
- Columna HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane. 30 metro de largo a, 25 de diámetro 0,5 film.

b). Condiciones del cromatógrafo.

- Temperatura del horno inicial 60°C hasta 260°C
- Volumen de inyección 1,00 microlitro
- Tiempo de corrida: 54.17min
- Presión 8,23 psi
- Tipo de gas Helio
- Flujo nominal inicial 1,0 ml/min

3.7.4.2. Análisis instrumental por cromatografía de capa fina.

Se realizó un filtrado del aceite esencial mediante cromatografía en capa fina (TLC), para determinar la presencia de metabolitos secundarios, se utilizó como fase estacionaria cromatoláminas de gel de sílice G tipo 60 con indicador de Vainillina (1%) Acido Sulfúrico (5%), las fases móviles utilizadas fueron Tolueno, Acetato de etilo 90:10, con el cual se logró la separación lo permitiendo visualizar los diferentes grupos químicos de los constituyentes del aceite esencial.

3.7.5. Etapa V – Determinación de la actividad antimicrobiana.

Para determinar la actividad sobre el crecimiento microbiano del aceite esencial de Wiskataya, se aplicó la técnica microbiológica de difusión en agar.



Se inició preparando las concentraciones respectivas del aceite esencial en caldo Mueller-Hinton (100, 90, 80, 70, 60%) cuya unidad de medida fue $\mu\text{l}/\mu\text{l}$. los discos utilizados fueron papel filtro de 5 mm de diámetro, al cual se introdujo las concentraciones correspondiente. Seguidamente se llevo a la estufa para el secado a una temperatura de 37°C .

3.7.5.1. Activación de las cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* se incubó en agar Mac Conkey y la cepa *de Staphylococcus aureus* en agar Sangre a $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$, durante toda la noche para la obtención de cultivos jóvenes (18-24 h) y se procedió a realizar la dilución del cultivo en solución salina al 0.85% estéril, mostrando una densidad igual al 0.5 de la escala de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml). (Ver anexo 8)

3.7.5.2. Inoculación de cepas en agar Mueller-Hinton

Las placas con agar Mueller-Hinton se inocularón con la suspensión microbiana, para ello se utilizó un hisopo de algodón estéril y se eliminó el exceso haciéndolo rotar contra la pared del frasco. Posteriormente se extendió por la superficie del agar Mueller-Hinton en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo.

A continuación se colocó el disco del antibiótico y se realizó pozos de excavación en el agar con un diámetro de 5 mm, llenados con 15 μl de los aceites esenciales, con la ayuda de una micropipeta y asegurándose de que se mantuviera un perfecto contacto con la superficie del agar.

La separación entre los pozos fue como mínimo de 2 cm, para evitar interferencias entre los agentes antimicrobianos. Antes de incubar las placas se



dejó reposar a temperatura ambiente durante otros diez minutos, para que los discos hicieran una pre difusión y posteriormente se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

3.8. Diseño experimental.

El diseño es de bloques completos al azar (DBCA Clásico o paramétrico). La única fuente de variabilidad son los tratamientos, los bloques son completos porque todos los tratamientos aparecen en igual número y son al azar porque los tratamientos son asignados aleatoriamente dentro de cada bloque.

Cuadro 10. Esquema del diseño experimental para determinar MIC.

Bloque	Repeticiones	Tratamiento con concentración del aceite esencial					
		T1	T2	T3	T4	T5	Testigo
		100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	Amoxicilina
<i>Escherichia coli.</i>	R1	mm	mm	mm	mm	mm	mm
	R2	mm	mm	mm	mm	mm	mm
	R3	mm	mm	mm	mm	mm	mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	R1	mm	mm	mm	mm	mm	mm
	R2	mm	mm	mm	mm	mm	mm
	R3	mm	mm	mm	mm	mm	mm

3.9. Procesamiento estadístico de datos.

El procesamiento de datos estadísticos se realizó con el programa Microsoft office excel 2010. Convenientemente se aplicó el ANOVA con estadístico de “F” calculado al 5%, posteriormente el cálculo del nivel de significancia se determinó por Duncan. Dichos análisis se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics plus V 5.1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Extracción por el sistema de destilación por arrastre con vapor de agua.

El proceso de extracción se realizó en 4 periodos con 8 kg de materia prima deshidratada; por cada periodo 2 kg de Wiskataya con un tiempo de 120 min de destilación.

Cuadro 11. Parámetros presentes en la extracción de aceite esencial de Wiskataya.

PARÁMETROS	CANTIDAD
Cantidad de muestra	8000 g
Tiempo de destilación	480 min
Peso del aceite esencial	100,8 ±0,01 g
Rendimiento del aceite esencial	1,26 ±0,01 % p/p

El bajo rendimiento en la extracción del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., por el sistema de destilación por arrastre con vapor de agua se debe a que la temperatura, presión y el agua no han sido monitoreados y es posible que sus compuestos hayan sufrido modificaciones producto de la hidrólisis o isomerización de esteres.


Durante el proceso de separación en la pera de decantación se perdió fracciones importantes del aceite esencial. Según (Zekario, 2006) el rendimiento de los aceites esenciales fluctúa entre 0,01% y 2%. De acuerdo a los resultados obtenidos se encuentra en el promedio.

4.2. Análisis físicos del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

Cuadro 12. Principales constantes físicas del aceite esencial de Wiskataya.

CONSTANTES FÍSICAS	VALORES
Densidad (20°C)	0,8756±0,12 g/ml
Índice de refracción (20°C)	1,4726±0,02
Índice de rotación	102°85'±0,04
Solubilidad en etanol	85°, 90°, 96°

Cuadro 13. Características sensoriales del aceite esencial de Wiskataya.

CONSTANTES	DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIONES
Aspecto	Líquido oleoso	
Color	Ligeramente amarillo	
Olor	Fuerte, característico de la planta	
Sabor	Picante	

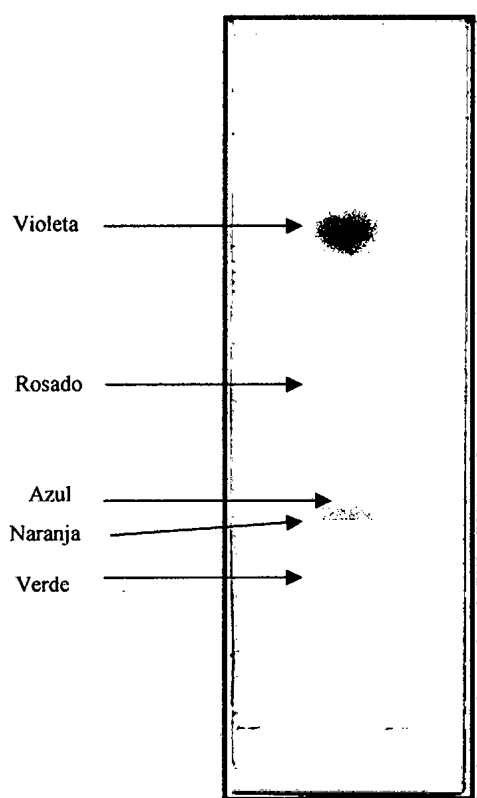
La densidad del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., es menor que la densidad del agua, y está en el promedio en comparación a otros aceites esenciales de especies tales como limón y salvia. Según (Albaladejo, 1999) el índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura y es directamente proporcional a la densidad. Este parámetro, varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y la temperatura.

La rotación óptica en el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., se produce por la relación de las proporciones entre sus dos componentes mayoritarios (sabineno de naturaleza levógira y (+)-4-carene de naturaleza

dextrógira). Autores como (Stanley *et al.*, 1961) observan que las rotaciones ópticas de los aceites esenciales procedentes de zona andina, son más altos que los producidos en la zona de costa. Los aceites esenciales son más solubles cuando están presentes compuestos oxigenados, disoluciones obtenidas pueden ser totalmente límpidas o pueden ser más o menos turbias.

4.3. Análisis químico del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

Por cromatografía de capa fina se determinó: presencia de terpenos (monoterpenos y diterpenos), triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides y alcaloides. Y ausencia de taninos.



La interpretación de los compuestos presentes en el aceite esencial de Wiskataya es de acuerdo a referencia bibliográfica.

El color azul indica la presencia de terpenos, el color violeta indica la presencia de triterpenos, el color verde indica la presencia de flavonoides y el color rosado indica presencia de sesquiterpenos, el color naranja indica la presencia de alcaloides.

Figura 9. Determinación de terpenos: TLC

Fase Móvil: Tolueno, acetato de etilo 90:10

Revelador: Vainillina (1%) Acido Sulfúrico (5%)

Por cromatografía de gases se determinó los compuestos químicos del aceite esencial de Wiskataya en concordancia con la Biblioteca NIST v 5,0

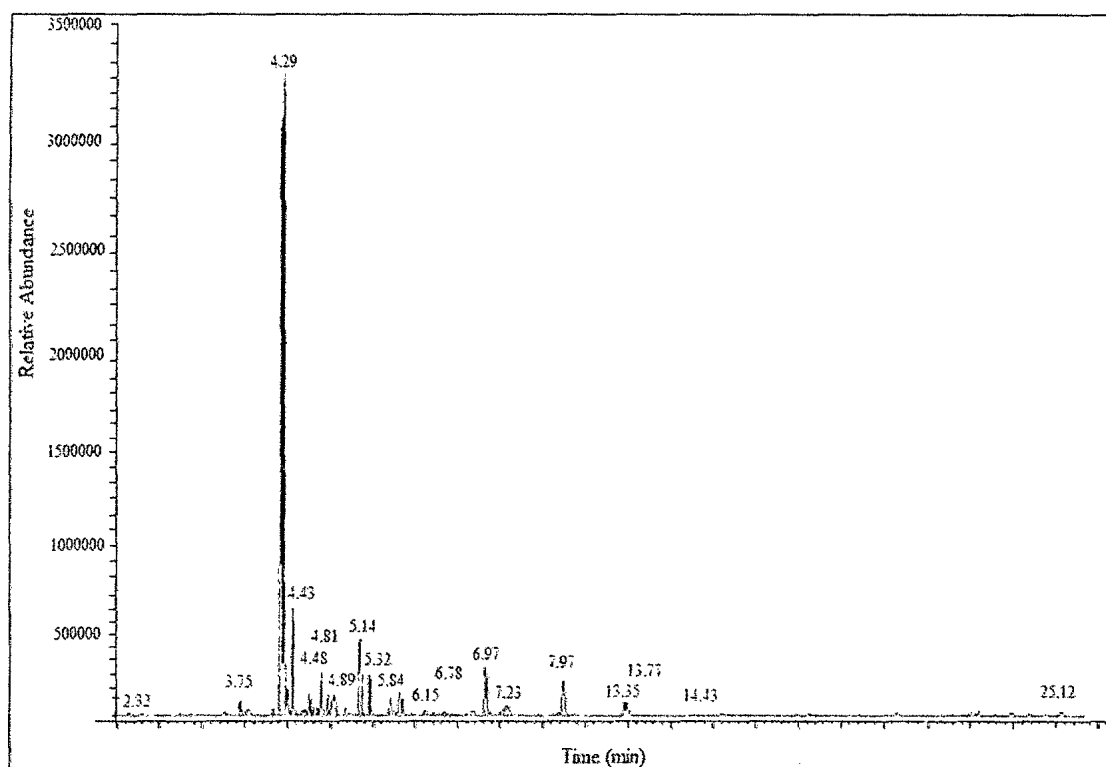


Figura 10. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de Wiskataya.

El perfil cromatográfico es el resultado de la lectura de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., mediante el cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas. La relación está en función a la abundancia de los compuestos (%) y el tiempo recorrido (min).

Para identificar los compuestos químicos volátiles del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., se realizó la lectura del perfil cromatográfico en concordancia al patrón (biblioteca NIST v 5,0) siendo los espectros de masas la mejor forma de representación.

Espectros de masas de algunos compuestos químicos presentes en el aceite esencial de Wiskataya.

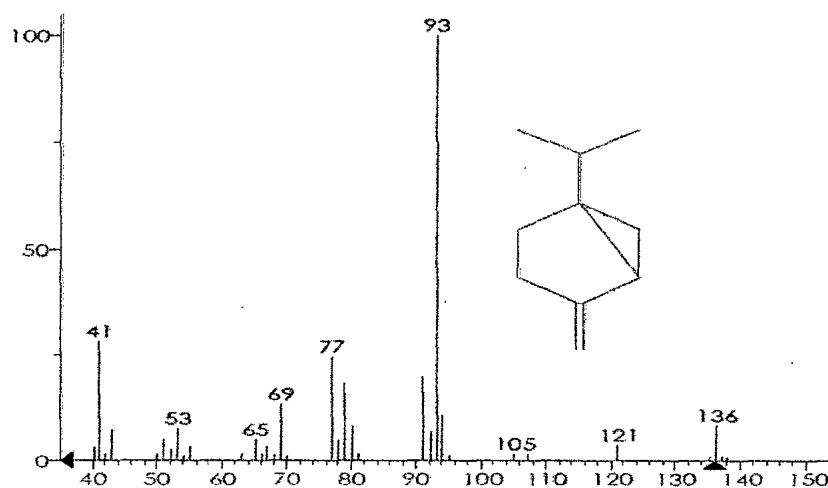


Figura 11. Espectro de masas de Sabinene.

Representación gráfica de la estructura química de Sabinene ($C_{10}H_{16}$). El sabinene es un terpeno, se puede encontrar con otras denominaciones como: Bicyclo[3.1.0]hexane,4-methylene-1-(1-methylethyl); Thujene, 4(10); Isopropyl-4-methylenebicyclo[3.1.0]hexane.

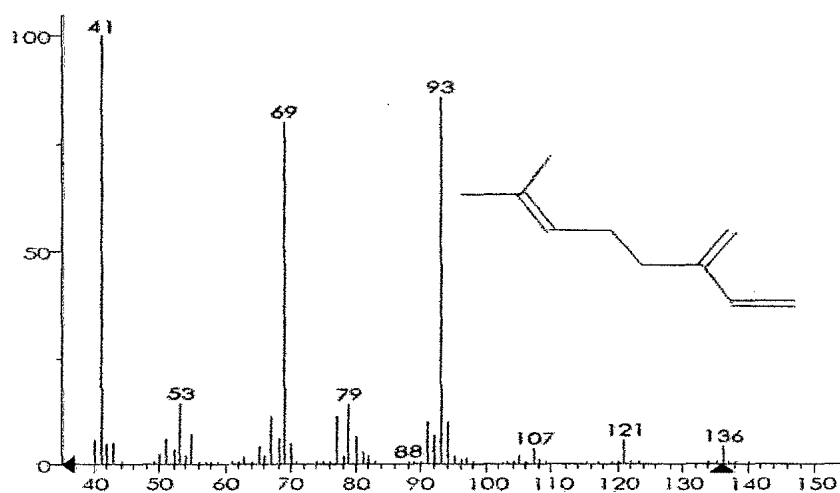


Figura 12. Espectro de masas de β -Myrcene.

Representación gráfica de la estructura química de β -Myrcene ($C_{10}H_{16}$); también se le conoce como β -Geraniolene; 7-Methyl-3-methylene-octa-1,6-diene; 1,6-Octadiene,7-methyl-3-methylene.

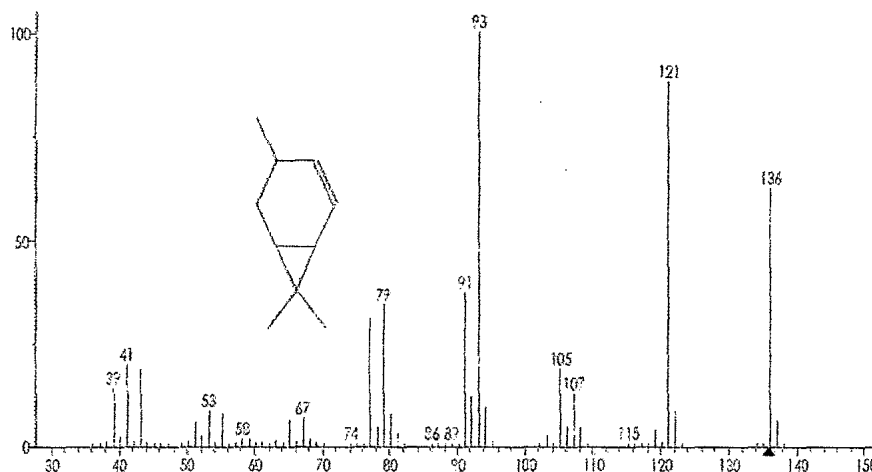


Figura 13. Espectro de masas de (+)-4-Carene.

Representación gráfica de la estructura química de (+)-4-Carene ($C_{10}H_{16}$); es un terpeno conocido también como: 4,7,7-Trimethylbicyclo[4.1.0]hept-2-ene.

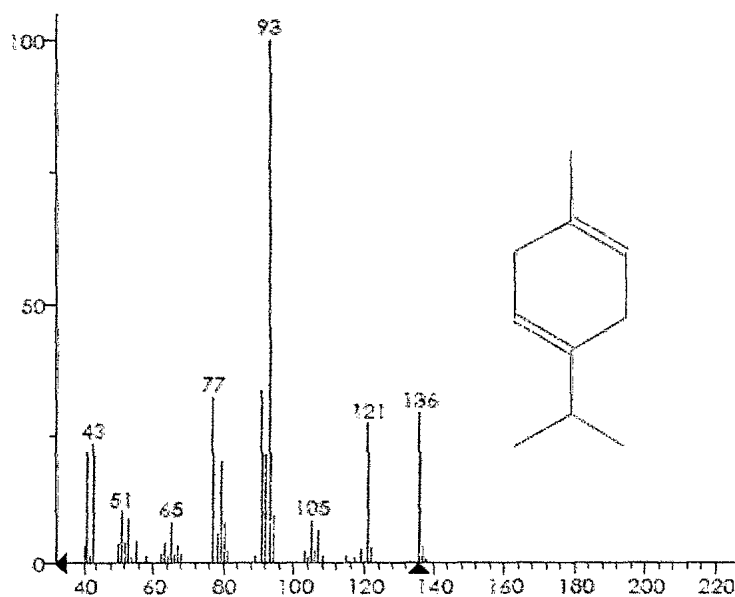


Figura 14. Espectro de masas de τ -Terpinen.

Representación gráfica de la estructura química de τ -Terpinen ($C_{10}H_{16}$); es un terpeno conocido también como: 1,4-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethyl); Isopropyl-4-methyl-1,4-cyclohexadiene; Moslene; Terpinene.

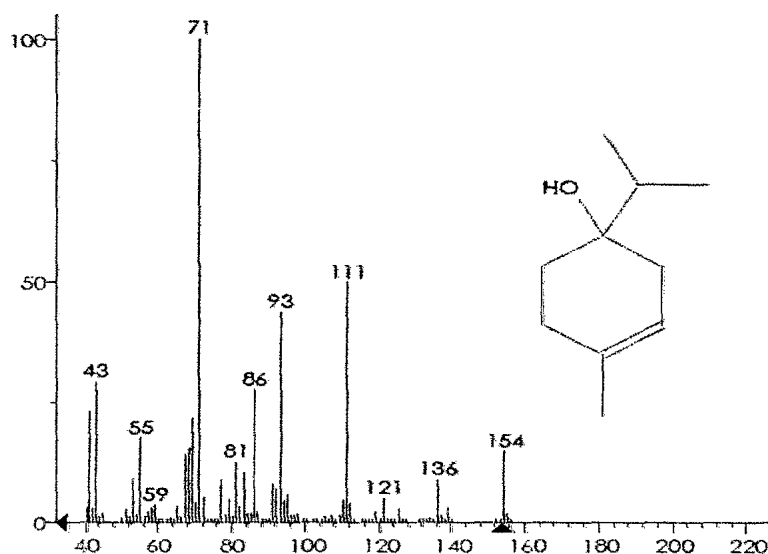


Figura 15. Espectro de masas de 4-Terpinenol.

Representación gráfica de la estructura química de 4-Terpinenol ($C_{10}H_{18}O$); es un alcohol conocido también como: Terpinen-4-ol; 1-Methyl-4-isopropyl-1-cyclohexen-4-ol; 4-Carvomenthenol.

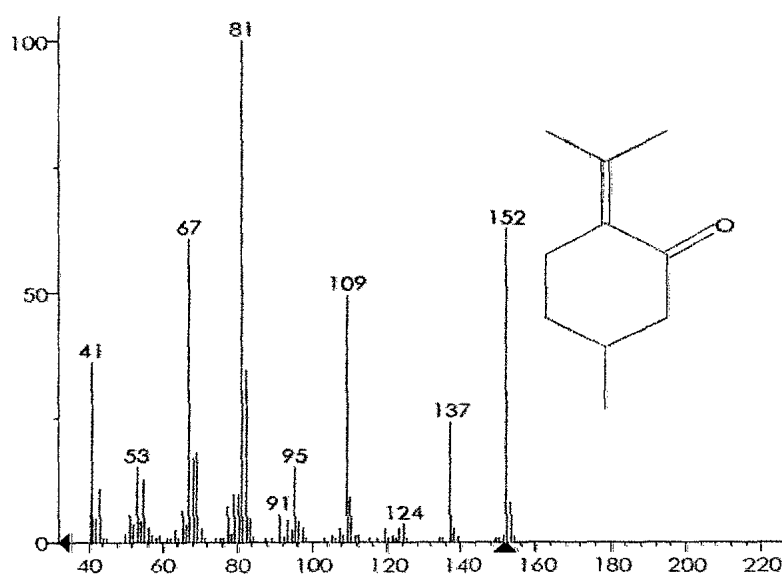


Figura 16. Espectro de masas de Pulegone.

Representación gráfica de la estructura química de Pulegone ($C_{10}H_{16}O$); es un terpeno conocido también como: p-Menth-4(8)-en-3-one; 5-Methyl-2-(1-methylethylidene)cyclohexanone; 2-Isopropylidene-5-methylcyclohexanone.

Cuadro 14. Caracterización de los componentes químicos del aceite esencial de Wiskataya. (Tiempo de retención, nombre del componente y porcentaje)

Nº PICO	T.R. (min)	NOMBRE	Contenido parcial %
1	2.32	2,2-Dimethoxybutane	0,51
2	3.75	α -Phellandrene	1.40
3	3.75	Bicyclo[3.1.0]hexane,4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv	2.30
4	4.29	Sabinene	56.39
5	4.43	β -Myrcene	6.74
6	4.81	(+)-4-Carene	8.20
7	4.89	P-cymene	1.33
8	5.14	β -trans-Ocimene	0.64
9	5.32	τ -Terpinen	7.11
10	5.84	5-isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	4.03
11	6.15	2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-,cis	0.39
12	6.78	Menthone	1.26
13	6.97	4-Terpinenol	3.78
14	7.23	Estragol	1.72
15	7.97	Pulegone	3.67
16	13.35	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a – hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)	0.86
17	13.77	Cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)	0.72
18	14.43	δ -cadinene	0.61
19	25.12	1,2-benzenedicarboxylic-acid,bis(2-methylpropyl)ester	1.06

Los otros componentes encontrados están en relación a trazas.

Los seis metabolitos secundarios más importantes identificados en el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., fueron: sabineno 56,39%; (+)-4-carene 8,20%; τ -terpinen 7,11%; β -myrcene 6,74%; 4-terpinenol 3,78%; pulegone 3,67%. Según investigaciones de (Pérez *et al*, 2008) sobre composición química del aceite esencial de *Senecio graveolens*. (Compositae) los compuestos encontrados fueron: Isovaleraldehydo, α -pineno, α -filandreno, α -terpineno, p-cimeno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno, terpinen-4-ol, α y β eudesmol. De las cuales solo el sabineno, α -filandreno, p-cimeno y el 4-terpinenol contrastan con el resultado obtenido.

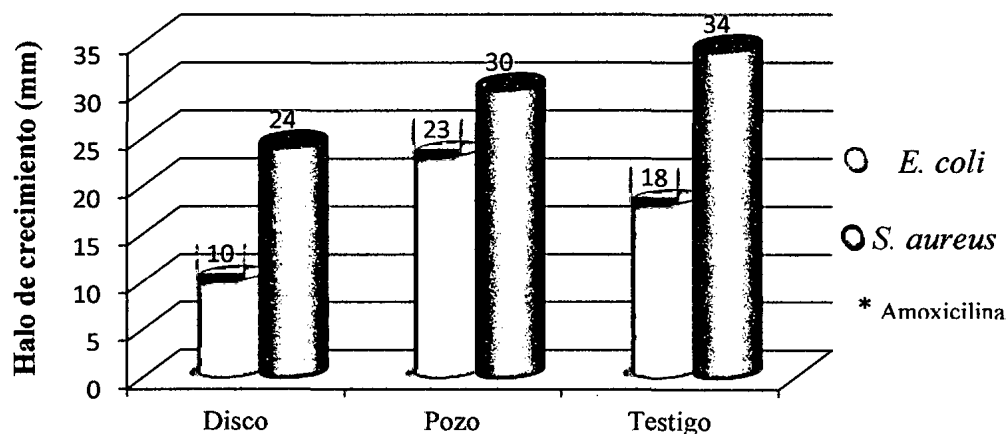
4.3.1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

La prueba de sensibilidad se efectuó por triplicado y se utilizó la amoxicilina (antibiótico betalactámico) como testigo. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., se determinó en dos cepas bacterianas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 29923.

Cuadro 15. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 29923.

Metodo de difusión radial en agar	Halo de inhibición (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
AE_p en Disco	10	24
AE_p en Pozo	23	30
Amoxicilina	18	34

(AE_p) Aceite esencial puro.



Método de Kirby-Bauer

Figura 17. Actividad antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya.

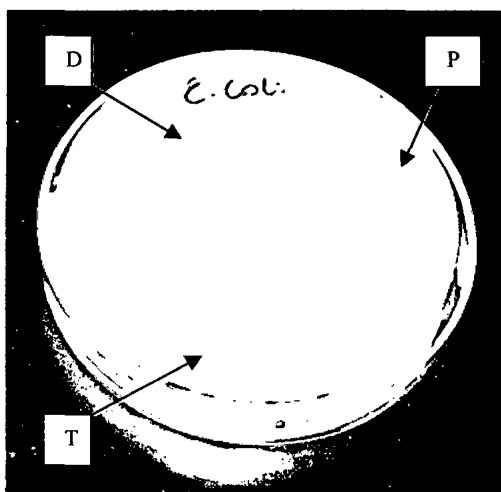


Figura 18. Cepas de *Escherichia coli*.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

D: Disco de aceite esencial al 100% en agar Mueller-Hinton.

P: Pozo de excavación de aceite esencial al 100% en agar Mueller-Hinton.

T: TESTIGO: disco de Amoxicilina

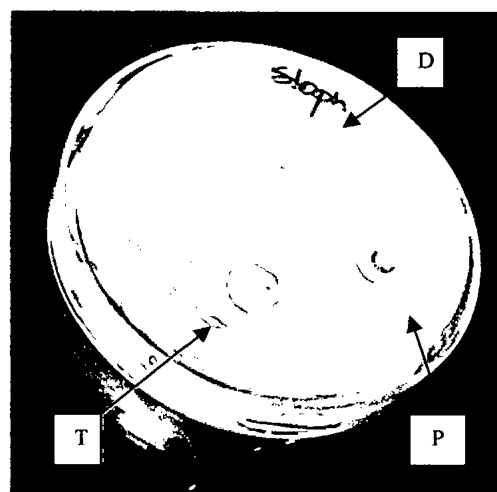


Figura 19. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29923.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

D: Disco de aceite esencial al 100% en agar Mueller-Hinton.

P: Pozo de excavación de aceite esencial al 100% en agar Mueller-Hinton.

T: TESTIGO: disco de Amoxicilina

El cuadro 15 muestra la eficacia de la técnica de difusión radial en agar. Con las variantes de pozo y disco; los disco de papel filtro en agar Mueller-Hinton presentó diámetros menores en ambas cepas bacterianas. En comparación al pozo en agar que presentó mejores diámetros de halos de inhibición en ambas cepas

bacterianas. La diferencia se debe a la pérdida de compuestos del disco de papel sufrido al momento de haber realizado el secado y la escasa difusión del disco.

Cuadro 16. Halos de inhibición antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya (*Senecio graveolens* Wedd.) por difusión en agar (mm).

Concentración del aceite esencial %	Bacterias indicadoras	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	23,67±0,33	29,33±0,67
90	13,33±0,33	20,67±0,67
80	7,67±0,33	10,33±0,33
70	0	0
60	0	0
Amoxicilina	17±0,01	34±0,01

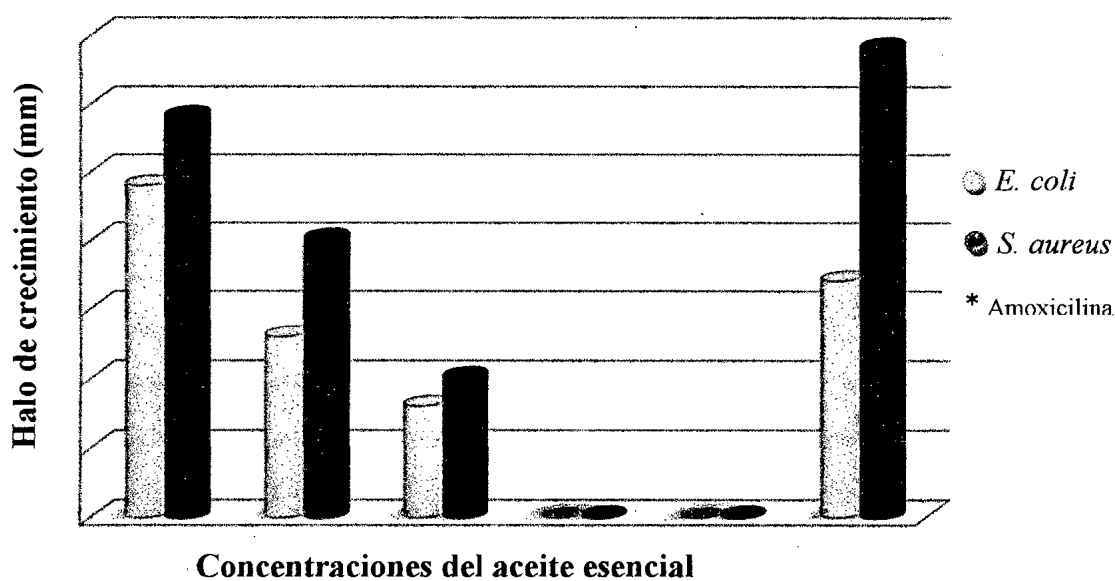


Figura 20. Halos de inhibición antibacteriana del aceite esencial de Wiskataya.

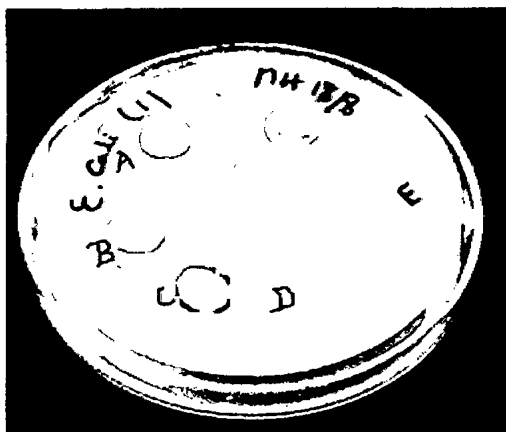


Figura 21. Cepas de *Escherichia coli*.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

A: Concentración del aceite esencial al 100%

B: Concentración del aceite esencial al 90%

C: Concentración del aceite esencial al 80%

D: Concentración del aceite esencial al 70%

E: Concentración del aceite esencial al 60%

TESTIGO: Amoxicilina



Figura 22. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29923.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

A: Concentración del aceite esencial al 100%

B: Concentración del aceite esencial al 90%

C: Concentración del aceite esencial al 80%

D: Concentración del aceite esencial al 70%

E: Concentración del aceite esencial al 60%

TESTIGO: Amoxicilina

La actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se debe a la acción conjunta de los múltiples compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd. Esta actividad no se le puede atribuir a un mecanismo específico sino a varios sitios blancos dentro y fuera de la célula. Además no todos los sitios blancos se afectan de forma separada, sino que algunos son consecuencia de la alteración previa de un mecanismo metabólico.

La característica de lipofilia en los aceites esenciales permite su reparto entre los lípidos de la membrana celular y pared celular, causando alteraciones en las diferentes capas de lipopolisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos permeabilizándolos. En las bacterias, la permeabilización de la membrana está asociada con la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la fuga del pool de ATP.

En general, la actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe mayormente a la presencia de fenoles, así como de aldehídos y alcoholes. Los fenoles destruyen las membranas citoplasmáticas de los microorganismos y desnaturalizan sus proteínas en bacterias gramnegativas. La ausencia de este compuesto en el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., es una razón por la que *Escherichia coli* presenta menores diámetros de halos de inhibición con respecto a *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 17. Rendimiento antibacteriano del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (%) en referencia a la amoxicilina.

Concentración del aceite esencial %	Bacterias indicadoras	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	139,24%	86,26%
90	78,41%	60,79%
80	45,12%	29,41%
70	0%	0%
60	0%	0%
Amoxicilina	100%	100%

El cuadro 17 muestra la variación de los rendimientos (la interacción existente entre la cepa bacteriana y las diferentes concentraciones del aceite esencial). Donde el aceite esencial a una concentración de 100% resultó ser mejor que el antibiótico en 139,24% probado en *Escherichia coli* y 86,26% probado en *Staphylococcus aureus*. A la concentración de 90%, el aceite esencial fue mejor

que el antibiótico en un 78,41% en *Escherichia coli* y 60,79% en *Staphylococcus aureus*. Con respecto a las concentraciones de 70% y 60% del aceite esencial probados en ambas cepas no tuvo actividad antibacteriana.

Cuadro 18. Actividad inhibitoria del aceite esencial según el antibiograma propuesta por NCCLS.

Concentración del aceite esencial %	Bacterias indicadoras	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	S	S
90	R	S
80	R	R
70	Inactivo	Inactivo
60	Inactivo	Inactivo
Amoxicilina	R	S

R (Resistente) S (sensible)

El cuadro 18 muestra que solo *Escherichia coli* es sensible a una concentración del 100% y resistente a concentraciones de 80 y 90%. Con lo que respecta a *Staphylococcus aureus* es sensible a las concentraciones de 90 y 100 % y resistente a 80% de concentración del aceite esencial. Si bien el aceite esencial presentó buenos rendimientos en referencia al antibiótico a las concentraciones de 90% y 80%. Sigue siendo un problema por presentar resistencia en *Escherichia coli*.

Cuadro 19. Esquematización del diseño de bloques completos al azar para realizar el ANOVA.

Cepa bacteriana (bloque)	Concentración del aceite esencial (%)					Y _i	\bar{Y}_i	$\sum_{k=0}^n Y_{ij}^2$
	100	90	80	70	60			
<i>E. coli</i>	23,67	13,33	7,67	0	0	44,67	8,93	796,76
<i>S. aureus</i>	29,33	20,67	10,00	0	0	60	12	1387,49
	53	34	17,67	0	0	104,67		
Y _{ij}	26,5	17	8,84					

$$Y = \frac{Y_{..}}{txb} = \frac{104,67}{5 \times 2} = 10,467$$

Efectos estimados de los tratamientos

$$T_1 = Y_i - Y_{..} = 26,5 - 10,47 = 16,03$$

$$T_2 = Y_i - Y_{..} = 17 - 10,47 = 6,53$$

$$T_3 = Y_i - Y_{..} = 8,84 - 10,47 = -1,63$$

$$T_4 = T_5 = 0 - 10,47 = -10,47$$

Efectos estimados de los bloques

$$B_1 = Y_i - Y_{..} = 8,93 - 10,47 = -1,54$$

$$B_2 = Y_i - Y_{..} = 12 - 10,47 = 1,53$$

$$T_c = \frac{Y_{..}}{txb} = \frac{104,67^2}{5 \times 2} = 1095,58$$

Análisis de varianza

$$SC_{total} = \sum_{i=1}^T \cdot \sum_{j=1}^B Y_{ij}^2 - T_c$$

$$SC_{total} = 23,67^2 + 13,33^2 + \dots + 10^2 - T_c$$

$$SC_{total} = 2184,28 - 1095,58$$

$$SC_{total} = 1088,79$$

$$SC_{tratamiento} = \sum_{i=1}^t Y_i^2 - Tc$$

$$SC_{tratamiento} = \frac{53^2}{2} + \frac{34^2}{2} + \frac{17,67^2}{2} - 1095,58$$

$$SC_{tratamiento} = 1043,03$$

$$SC_{bloque} = \sum_{j=1}^b Y_j^2 - Tc$$

$$SC_{bloque} = \frac{44,67^2}{5} + \frac{60^2}{5} - 1095,58$$

$$SC_{bloque} = 23,50$$

$$SC_{error} = SC_{total} - SC_{tratamiento} - SC_{bloque}$$

$$SC_{error} = 1088,70 - 1043,03 - 23,50$$

$$SC_{error} = 22,17$$

Cuadro 20. ANOVA para las concentraciones del aceite esencial de Wiskataya.

Fuentes de variación	gl	SC	CM	FC	F _t 5%	F _t 1%	significancia
Tratamientos	4	1043,03	260,76	47,07	6,39	15,98	**
Bloques	1	23,53	23,50	4,24	7,71	21,20	NS
EE	4	22,17	5,54				
Total	9	1088,70					

(EE) Error experimental. (gl) Grados de libertad.

(SC) Suma de cuadrados. (CM) Cuadrado medio.

(FC) F calculado. (F_t) F tabla. (NS) No significativo.

(**) Altamente significativo.

En el análisis del ANOVA, los tratamientos son altamente significativos por tener una implicación directa en el comportamiento y desarrollo de los microorganismos en estudio. Se fundamenta en el $F_c > F_{t\ 5\%}$ y $F_c > F_{t\ 1\%}$. Los bloques no tienen significancia debido a la cantidad de cepas bacterianas utilizadas. Se interpreta que 2 microorganismos para este tipo de investigación no son representativos. Se fundamenta en el $F_c < F_{t\ 5\%}$ y $F_c < F_{t\ 1\%}$.

$$CV = \frac{\sqrt{CME}}{Y} = \frac{\sqrt{5,54}}{10,47} = 0,22\%$$

El coeficiente de variación mide las variaciones de las observaciones en todo el experimento, generalmente varía de 0 a 7% en laboratorios.

El valor de tabla con $\alpha=5\%$ para 5 tratamientos y 4 grados de libertad la amplitud estandarizada es 6,26.

Número de promedios	Tabla AES (D)	ALS (D)
2	3,93	6,52
3	4,01	6,66
4	4,02	6,67
5	4,02	6,67

Promedio				
T1	T2	T3	T4	T5
26,5	17	8,84	0	0
Ordenar los promedios en forma ascendente.				
I	II	III	IV	V
0	0	8,84	17	26,5

Comparación real.

Determinación de la existencia de diferencias significativas.

V-IV	26,5-17	= 9,5	>	6,52
V-III	26,5-8,84	= 17,66	>	6,66
V-II	26,5-0	= 26,5	>	6,67
V-I	26,5-0	= 26,5	>	6,67
IV-III	17-8,84	= 8,16	>	6,66
IV-II	17-0	= 17	>	6,67
IV-I	17-0	= 17	>	6,67
III-II	8,84-0	= 8,84	>	6,67
III-I	8,84-0	= 8,84	>	6,67
II-I	0-0	= 0	<	6,67

El tratamiento T1 tiene una elevada acción antibacteriana en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por ocasionar lisis celular y evitar el desarrollo de las cepas en el sustrato, con respecto al tratamiento T2 y T3 solo inhibieron el desarrollo de ambas cepas. Los tratamientos T4 y T5 no tuvieron acción inhibitoria en el desarrollo de las cepas bacterianas.

Cada tratamiento interactúa sobre las bacterias de manera diferente, de acuerdo a sus necesidades fisiológicas a demás cada microorganismo independientemente genera sus propios mecanismos de defensa. Por tanto, dependerá mucho de la concentración, composición química y difusibilidad del aceite esencial para distorsionar el peptidoglicano y generar ruptura de la pared celular. También se puede hacer un análisis de significancia por cada tratamiento: si existe diferencia significativa en los tratamientos (T1:T2, T1:T3, T1:T4, T2:T3, T2:T4, T2:T5, T3:T4, T3:T5), no existe diferencia significativa en los tratamientos (T4:T5).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- ◆ Se logro extraer aceite esencial de tallos y hojas de la especie *Senecio graveolens* Wedd., por la técnica de arrastre con vapor de agua. extraída en 4 periodos; con 2 kg de materia prima deshidratada y un tiempo de 120 min, obteniéndose un porcentaje de rendimiento de 1.26% p/p.
- ◆ Se determinó los parámetros físicos del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., como: densidad 0,87555 g/ml; índice de refracción 1,4726, índice de rotación 102°85' y miscibilidad en etanol a 85°, 90°, 96° de concentración.
- ◆ Se determinó la composición química del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd., por el método de cromatografía de gases, mediante comparación de los espectros de masas, con la biblioteca NIST vs 5,0. Los compuestos principales fueron: sabineno 56,39%; (+)-4-carene 8,20%; τ -terpinen 7,11%; β -myrcene 6,74%; 4-terpinenol 3,78%; pulegone 3,67%.
- ◆ Se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd. La bacteria gramnegativa, *Escherichia coli*, fue sensible a la acción del aceite esencial a una concentración de 100%. Resistente a las concentraciones de 90% y 80%, e inactivas a concentraciones de 70% y 60%. En comparación a la bacteria grampositiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, fue sensible a la acción del aceite esencial en concentraciones de 100% y 90%.

Resistente a 80%, e inactivas a concentraciones de 70% y 60%

5.2. Recomendaciones.

- Completar la investigación realizando un análisis proximal (carbohidratos, fibra, grasa, ceniza, alcaloides) de la harina de *Senecio graveolens* Wedd.
- Utilizar materia prima fresca para rendimientos en la obtención del aceite esencial, y para optimizar la extracción utilizar equipos con instrumentos de control (flujo de vapor, distribución de vapor, temperatura, presión).
- Enfocar el estudio de actividad antibacteriana con la especie de *Senecio graveolens* Wedd, en el ensayo *in vitro* e *in vivo* con más cepas bacterianas para masificar su uso.
- Estudiar la posibilidad de acción sinérgica entre el aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd y la amoxicilina, así también se recomienda utilizar otros antibióticos (sulfametrazol o buscapina). Antibióticos que se utilizan para combatir los males producidos por estas bacterias.
- La determinación de sensibilidad por difusión radial en agar es habitualmente suficiente; sin embargo, en ciertas ocasiones se recomienda la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por métodos turbidimétricos.



VI. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Aburrá R.; Sbarato D. 2001. Manejo de los residuos convencionales y no-convencionales. Manual de cromatografía.

AENOR. 1993. Aceites esenciales. Determinación de la densidad absoluta y la densidad relativa.

Agrelo N.; Torres A. 2005. Caracterización del aceite esencial de *cordia curassavica* (jacq.) Roem. & schult. (María negra). Tesis para optar el título de ingeniero químico. Universidad Nacional del Nordeste- Argentina.

Albaladejo M. 1999. El Aceite esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales, departamento de tecnología de los alimentos nutrición y bromatología. Universidad de Murcia.

Arancibia L.; Naspi C.; Pucci G.; Arce M. 2010. Plantas aromáticas de la Patagonia: Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Senecio mustersii* y *Senecio subpanduratus*. UNP-Argentina.

Blanco V. 2007. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *lippia alba* mill n.e. Brown ex britton & wills cultivada con tres tipos de *compost*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga-Colombia.

Beltrán H.; Galan A. 1996. *Senecio* [sect. *Senecio*] ser. *Lomincola nova* y notas corológicas y taxonómicas sobre *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae) para los Andes centrales del Perú. UNMSM, Lima-Perú.

Betancourt O.; Scarpa C.; Villagrán K. 2003. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la ix región de Chile. UCT-Chile.



Briga J. 1962. Los aromáticos en la industria moderna. 2ª edición. Editorial Sintet, Barcelona-España.

Bruneton J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2da Ed. Zaragoza: Acribia S. A. Fundación Alfonso Martín Escudero. Madrid.

Cano P. 2007. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). Tesis para optar el grado de magister en recursos vegetales y terapéuticos. UNMSM. Lima - Perú.

Castillos M. 1979. Extracción y caracterización de aceite de semilla de Tarhui (*Lupinus mutabilis*). Tesis para optar el título de ingeniero de industrias alimentaria, UNALM. Lima-Perú.

Carhuapoma M. 2006. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. GRAY (Arrayan). Tesis para optar el grado de magister en recursos vegetales y terapeuticos. UNMSM. Lima-Perú.

Carhuapoma M.; López G.; Roque M.; Bell C. 2009. Actividad antibacterinana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA”. Facultad de farmacia y bioquímica. UNMSM. Lima-Perú.

Chamblee T.; Clarck C.; Brewster G.; Radford T.; Iacobucci G. 1991. Quantitative analysis of the volatile constituents of lemon peels oil. J. Agric. Food Chem.39, 162-169.

Cerutti M.; Neumayer F. 2004. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario. Argentina, pág. 149-155.



Gúiza P. 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. PUJ. Bogotá-Colombia.

Graviela A. 2000. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de salvia morada de Sáenz Peña (Chaco). Facultad de ciencias exactas y naturales. UNE-Argentina.

Figueroa A. 2003. Análisis de residuos en aceite esencial de mentol en miel de abejas (*Apis mellifera L.*). Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile.

Hammer K.; Carson C.; Riley T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*.

Huerta L. 2001. Aceites esenciales en el control de las patologías aviares. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

ITINTEC 319,077. 1974. Aceites esenciales. Preparación de la muestra para análisis. Norma Técnica Peruana.

ITINTEC 319,08. 1974. Aceites esenciales. Determinación de la densidad y de la densidad relativa. Norma Técnica Peruana.

ITINTEC 319,076. 1974. Aceites esenciales. Determinación del poder rotatorio específico y de la desviación Polarimétrica. Norma Técnica Peruana.

Juárez J.; Américo J.; Jaúregui J. 2010. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *citrus sinensis* (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. UNMSM. Lima-Perú.

Juárez R. 2010. Fertilización orgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo. Tesis para optar el grado de



doctor en ciencias. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Montecillo, Texcoco-México.

Kahriman N.; Tosun G.; Terzioglu S. 2010. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Flower, Leaf, and Stem of *Senecio Pandurifolius*.

Liberti A.; Carpena O.; Laencina J.; Goretti G. 1973. Estudio de las características del aceite esencial de limón Español. I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia -Valencia.

Libertad A.; Morales L.; Armas L. 2001. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Facultad de medicina, UNMSM. Lima-Perú.

Llop H.; Dapena V. 2001. Microbiología y parasitología medica, primera edición. Habana-Cuba. Pág. 251.

Madigan M.; Martinko J.; Parker J. 2000. BROCK: Biología de los microorganismos, décima edición, editorial Pearson. Madrid- España.

Maguna F.; Romero A.; Garro M. 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias. UNNE.

Matthew A.; Franklin R.; Cockeril L.; Dudley P. 2009. Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio CLSI por su sigla en inglés, anteriormente conocido como NCCLS), décima edición.

Marino M.; Bersani C.; Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Internatiol Journal of Food Microbiology.



Morales A. 1973. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *Minthostachis mollis* (Muña) y de la *Salvia sagittata* (Hierba buena). UNALM. Lima- Perú.

NMX-R-050.1975. Norma Mexicana. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Mexicanas.

Olgún P.; Rodríguez M. 2004. Cromatografía de gases - métodos en biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ortuño S. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición, edit aiyana. Murcia-España. Pág. 5-9. Disponible en: <http://www.biomoon.net/aiyana>. <http://books.google.com>.

Pérez C.; Agnese A.; Cabrera J. 1999. El aceite esencial de *Senecio graveolens* (Compositae): composición química y las pruebas de actividad antimicrobiana. UBA. Argentina.

Pozo E. 2006. Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). Sangolquí-Ecuador

Prescott L.; Harley J.; Klein D. 2010. Microbiology. 5th edition, editorial McGraw-Hill-USA. Pág 109.

Rojas L.; Velasco J.; Díaz T. 2010. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton contra patógenos génito-urinarios. UA. Merida-Venezuela.

Robert H. 1992. Manual del Ingeniero Químico. Tercera Edición en Español. Editorial McGraw Hill. México



Salvador F.; Angeles A.; Segundo R. 2009. Tres nuevos registros del genero *Carex* (Cyperaceae) para el Perú y adiciones a la flora andina del departamento de Huánuco, Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

Sánchez Y.; Pinooriela M. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum kunth* (caisimón de anís) Rev. Protección Veg. Vol. 24 N° 1: 39-46. La Habana, Cuba.

Sikkema J.; Bont J.; Poolman B. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59:201-222.

Smith A.; Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Pág.118-122.

Vázquez Q. 2010. Actividad antibacteriana del aceite esencial de bellota de cipres (*Cupressus sempervirns* var *horizontalis*) y semillas de brócoli (*Brassica oleraceae* var *italica*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana - Mexico.

Velázquez B. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis para obtener el grado de Doctor en el programa de Producción Animal. Universidad Autónoma de Barcelona.

Villagrán C.; Castro V. 2004. Etnobotánica del sur de los Andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas Altiplánicas y de las quebradas altas del Loa superior. Santiago- Chile.

Zekario. 2006. Los aceites esenciales una alternativa antimicrobiana, laboratorios Calier. Disponible en http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_Aceites_esen_como_promotores.pdf



ANEXOS

Anexo 1. Norma Técnica Peruana (ITINTEC 319,077). Aceites esenciales.

Preparación de la muestra para análisis. Diciembre, 1974.

Normas a consultar.

ITINTEC 319,075. Aceites esenciales – determinación del índice de refracción.

1. Objeto.

- 1.1. La presente norma establece los métodos de preparación de las muestras de aceites esenciales destinadas al laboratorio para su análisis.

2. Métodos.

2.1. Aparatos.

- 2.1.1. Matraces erlenmeyer.
- 2.1.2. Capsulas para cenizas.
- 2.1.3. Estufa.
- 2.1.4. Frascos de vidrio oscuro, con tapa para conservación de la muestra.

2.2. Reactivos.

- 2.2.1. Sulfato de magnesio (p.a)

2.3. Procedimiento.

- 2.3.1. Aceite esencial líquido a la temperatura ambiente.

Se introduce en un matraz erlenmeyer seco, que se encuentra a la misma temperatura del aceite esencial, una cantidad de aceite no mayor de los 2/3 partes de la capacidad del matraz.

- 2.3.2. Aceite esencial sólido o parcialmente solidificado a la temperatura ambiente.

- 2.3.2.1. Se licuefacta colocándolo en una estufa a temperatura lo más baja posible

pero que permita licuefactarlo en menos de diez minutos, por lo general es preferible una temperatura superior en 10°C al punto de congelación del aceite esencial. Se debe evitar durante esta operación (principalmente en el caso de los aceites esenciales que contienen aldehídos) la renovación del aire en el recipiente que contiene la muestra; con este fin se afloja el tapón sin retirarlo.

2.3.2.2. Se vierte después el aceite esencial en un matraz erlenmeyer seco y previamente calentado en la estufa; este matraz no debe llenarse a más de las $2/3$ partes de su capacidad.

2.3.2.3. Durante todas las operaciones posteriores el aceite esencial se debe mantener a una temperatura lo más baja posible, pero sin que llegue a solidificar.

2.3.3. En los dos casos anteriores (2.3.1 y 2.3.2) se introduce una cantidad de sulfato de magnesio recién desecado, neutro, igual a más o menos el 10% del peso del aceite esencial.

2.3.3.1. Es posible desecar el sulfato de magnesio del siguiente modo: se calienta el sulfato de magnesio en una cápsula hasta peso constante entre 180°C y 200°C (temperatura que se toma en el producto constantemente) se pulveriza finamente y se conserva en un frasco seco y herméticamente cerrado.

2.3.4. Se agita vigorosamente y de tiempo en tiempo durante una o dos horas y luego se filtra.

2.3.4.1. Este tratamiento vuelve a la muestra inadecuada para determinar su tenor de agua.



2.3.5. Si se trata de un aceite esencial sólido o parcialmente solidificado a la temperatura ambiente, se efectúa la filtración en la estufa evitando prolongar más tiempo del necesario la permanencia de la muestra dentro de ella.

2.3.6. Se verifica la acción del agente desecador por una serie de modificación del índice de refracción, después de cada desecación.

Las variaciones del índice de refracción no debe ser superior a una unidad decimal del tercer orden de lo contrario se introduce una nueva cantidad de sulfato de magnesio aproximadamente igual a un 5% del peso del aceite esencial.

Se agita y se filtra de nuevo como lo indicado anteriormente. Se mide el índice de refracción y se asegura que su variación no sea superior a una unidad decimal del tercer orden.

2.3.6.1. Es posible efectuar en el curso de preparación de la muestra, la determinación definitiva de índice de refracción pero conviene en este caso, operar según lo indicado en la norma 319,075.

2.3.7. Todas estas operaciones deben proceder inmediatamente al análisis, en caso de no ser posible, se conserva la muestra desecada y filtrada en un recipiente seco, lleno, herméticamente cerrado, protegido de la luz y en lugar fresco.



Anexo 2. Norma Técnica Peruana (ITINTEC 319,081). Aceites esenciales.

Determinación de la densidad y de la densidad relativa. Diciembre, 1974

Normas a consultar.

ITINTEC 319,077 Aceites esenciales. Preparación de la muestra para análisis.

ITINTEC 319,079 Aceites esenciales. Extracción de muestras.

1. Objeto

- 1.1. La presente norma establece el método para determinar la densidad y la densidad relativa de los aceites esenciales, líquidos a la temperatura de 20°C.

2. Definiciones y clasificación

- 2.1. Densidad a 20°C de un aceite esencial.- es la relación entre el peso (masa) de un volumen dado de aceite esencial y su volumen, determinados a 20°C.
 - 2.1.1. Esta cantidad se expresa en gramos por mililitro y su símbolo es ρ_{20}
- 2.2. Densidad relativa a 20°C ó a 4°C de un aceite esencial.- es la relación entre la densidad del aceite a 20°C y la del agua destilada a 20°C ó a 4°C.
 - 2.2.1. Esta cantidad no tiene dimensión y su símbolo es d_{20}^{20} ó d_4^{20} .
 - 2.2.2. Todas las pesadas se hacen en aire.

3. Métodos de ensayo

3.1.Principio del método

- 3.1.1. Está norma requiere de valores con una precisión de tres cifras decimales:
Se usa un picnómetro para pesar volúmenes iguales del líquido en ensayo, con el objeto de obviar el uso de grandes cantidades de éste.



3.2. Aparatos

- 3.2.1. Balanza analítica, con una precisión de 0,5 mg.
- 3.2.2. Baño de agua, mantenido a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- 3.2.3. Embudos y sifones para picnómetros.
- 3.2.4. Picnómetros de 50 ml, 25 ml ó 10 ml de capacidad, de acuerdo al volumen de aceite esencial disponible.
- 3.2.5. Termómetro normalizado, dividido en quintos o décimos de grados Celsius para determinaciones de temperatura entre 10°C y 30°C .

3.3. Procedimiento

- 3.3.1. La preparación de la muestra para el análisis se efectúa según la norma ITINTEC 319.077.
- 3.3.2. Se lava cuidadosamente el picnómetro se escurre, se enjuaga sucesivamente con etanol y éter dietílico y se seca el interior por medio de una corriente de aire seco.
 - 3.3.2.1. Se seca la parte externa del picnómetro con una tela seca ó un papel filtro y se inserta el tapón.
 - 3.3.2.2. Se coloca el picnómetro en la balanza y se le deja durante 30 segundos, luego
- 3.3.3. Se llena el picnómetro con agua destilada a aproximadamente 20°C y recientemente hervida, teniendo cuidado de evitar la presencia de burbujas de aire.
 - 3.3.3.1. Se coloca el picnómetro en un baño de agua a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Se comprueba la temperatura del baño de agua por medio del termómetro normalizado y se enrasa con agua destilada hasta la marca.



- 3.3.3.2. Se inserta el tapón al picnómetro y se seca la parte exterior con una tela seca o un papel de filtro.
- 3.3.3.3. Se coloca el picnómetro en la balanza, y se deja durante 30 minutos, luego se pesa con el contenido (P_1)
- 3.3.4. Se vacía el picnómetro, se lava con etanol y después con éter dietílico y se seca por medio de una corriente de aire seco.
- 3.3.5. Se llena el picnómetro con el aceite esencial, que debe estar a aproximadamente 2°C , evitando la presencia de burbujas de aire.
- 3.3.5.1. Se vuelve a colocar el picnómetro en el baño de agua a $20^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ y se le deja durante 30 minutos. Se enrasa con aceite esencial hasta la marca y se procede como en 3.3.3.2. y 3.3.3.3 obteniéndose un peso (P_2).

3.4. Expresión de resultados.

3.4.1. Sea:

Y el peso, en gramos, del picnómetro vacío

P_1 el peso, en gramos, del picnómetro lleno con agua destilada a 20°C .

P_2 el peso, en gramos, del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C .

- 3.4.2. La densidad relativa ρ_{20} , en gramos por mililitro, se da por la siguiente fórmula:

$$\rho_{20} = 0,99718 \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

- 3.4.3. La densidad relativa d_{20}^{20} se da por la fórmula siguiente:

$$\frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

- 3.4.4. La densidad relativa d_4^{20} se da por la fórmula siguiente:

$$D_4^{20} = 0,99718 \times D_{20}^{20}$$



Anexo 3. Norma Técnica Peruana (ITINTEC 319,076) Determinación del poder rotatorio específico y de la desviación Polarimétrica. Diciembre, 1974.

Normas a consultar.

ITINTEC 319,077 Aceites esenciales. Preparación de la muestra para análisis.

1. Objeto.

- 1.1. La presente norma establece el método de determinación del poder rotatorio específico y de la desviación polarimétrica de los aceites esenciales.
- 1.2. La determinación de la desviación polarimétrica se efectúa generalmente sobre el aceite esencial al natural y la determinación del poder rotatorio específico, sobre el aceite esencial diluido en un solvente.

2. Definiciones y clasificación.

- 2.1. Desviación polarimétrica de un aceite esencial.- es el ángulo sobre el cual gira el plano de polarización de la luz cuando esta atraviesa cierto espesor de aceite esencial en condiciones determinadas. Por convención en la presente norma, la desviación polarimétrica es aquella que se mide a través de un espesor de 1 dm, o a través de un espesor diferente convertido a 1 dm; dicha desviación se expresa en grados y minutos, temperatura conocida, generalmente 20°C y en relación a una longitud de onda de luz señalada.

Está dado por la expresión:

$$(\alpha)_D^{20^{\circ}C} = \frac{A}{L}$$

Dónde.

A: es el ángulo de rotación observado, en grados.

L: es el espesor atravesado en decímetros.



De esta expresión existe otra equivalente que es la rotación polarimétrica. La desviación polarimétrica es, por otra parte, llamada impropriamente “poder rotatorio”, expresión que también es utilizada como sinónimo de poder rotatorio específico, lo que da origen a numerosas confusiones.

2.1.1. Para facilitar los cálculos, la desviación polarimétrica y el poder rotatorio específico, pueden expresarse igualmente en grados y en centésimos de grado.

2.2. Poder rotatorio específico de un aceite esencial.- es igual al ángulo sobre el cual rotaría el plano de polarización de la luz si esta atravesara un espesor de 1 dm de una solución convencional de aceite esencial que contuviera 1 g de sustancia activa por mililitro. Se expresa en grados y minutos, a una temperatura conocida, generalmente 20°C, y en relación a una longitud de onda de luz señalada. Esta dado por la expresión.

$$(\alpha)_D^{20^\circ\text{C}} = \frac{AxV}{LxP}$$

A: es el ángulo de rotación observado, en grados.

L: es el espesor atravesado en decímetros.

V: es el volumen de la solución, en mililitros.

P: es el peso de la sustancia disuelta, en gramos.

3. Métodos de ensayo

3.1. Principio del método.

Es la medida de la rotación del plano de polarización de la luz, a una longitud de onda definida, al atravesar un espesor determinado de aceite.

3.2. Aparatos.

3.2.1. Polarímetro cuya precisión debe ser por lo menos igual a ± 2 ó $0,03^\circ$.



3.2.2. Fuente luminosa: mecanismo que permita la obtención de luz monocromática de una longitud de onda de $589,3 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$, correspondiendo sensiblemente a la línea D del sodio o de cualquier otra longitud de onda escogida.

3.2.3. Tubo de observación de longitud apropiada según la coloración del aceite esencial, por ejemplo:

$L = 100 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ para los aceites de coloración mediana.

$L = 200 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ para los aceites de coloración débil.

$L = 50 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ para los aceites de coloración intensa.

Los tubos de observación deben llevar de preferencia un dispositivo que permita la determinación de la temperatura.

En caso de que la medida deba efectuarse exactamente a 20°C en particular cuando el poder rotatorio específico o la desviación polarimétrica a medir son superiores a 35°C , el polarímetro o los tubos de observación deben estar en lo posible provistos de un sistema termostático, de manera de mantener la sustancia a la temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, durante todo el tiempo de la operación.

3.2.4. Termómetro de precisión que permita la lectura de temperaturas cercanas a 20°C o de aquellas indicadas en la norma del producto.

3.2.5. Matraces aforados de precisión, con capacidad correspondiente a la del tubo de observación utilizado.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Se prepara la muestra a ensayar según la norma ITINTEC 319,077.



3.3.2. Se enciende el dispositivo de iluminación y se espera hasta obtener una buena luminosidad. Se regula el polarímetro con el tubo de observación vacío.

3.3.3. Para aceites esenciales al natural.

3.3.3.1. Se llena el tubo de observación con el aceite esencial que previamente debe haberse llevado a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ó a otra temperatura especificada.

3.3.3.2. Se debe asegurar que el tubo también este a la misma temperatura del aceite esencial.

3.3.3.3. Se verifica que no haya dentro del tubo ninguna burbuja de aire.

3.3.3.4. Se coloca el tubo en el polarímetro y se mide la rotación polarimétrica dextrógira o levógira del aceite esencial.

3.3.3.5. Se efectúan varias mediciones y se asegura que los resultados de tres muestras no difieran entre ellas en más de 5 minutos. Se calcula el promedio de estos tres resultados.

3.3.4. Para aceites esenciales en solución.

3.3.4.1. Se pesa con una precisión de 0,5 mg la cantidad de aceite esencial a analizar.

3.3.4.2. Se coloca en un matraz aforado y se disuelve en el solvente apropiado indicado en la norma correspondiente.

3.3.4.3. Se coloca el matraz en un baño termostático a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, se completa a volumen con el solvente y se homogeneiza.

3.3.4.4. Se continúa luego según lo indicado en 3.3.3.2.



3.4. Expresión de resultados.

3.4.1. Para aceites esenciales al natural

3.4.1.1. Sea:

A: el valor del ángulo de rotación expresado en grados y minutos.

L: la longitud del tubo expresado en decímetros.

P: el peso del aceite esencial a 20°C, en gramos por mililitro.

3.4.1.1.1. Los datos sobre constantes analíticas de los aceites esenciales solo indican frecuentemente la densidad relativa d_{20}^{20} , es posible en este caso deducir el peso con la ayuda de la expresión.

$$\rho = 0,99843 \times D_{20}^{20}$$

3.4.1.2. La desviación polarimétrica expresada en grados y minutos está dada por la siguiente fórmula.

$$(\alpha)_D^{20^\circ C} = \frac{A}{L}$$

3.4.1.3. El poder rotatorio específico expresado en grados y minutos está dado por la fórmula:

$$(\alpha)_D^{20^\circ C} = \frac{A}{Lx}$$

3.4.1.4. Las desviaciones polarimétricas y los poderes rotatorios específicos dextrógiros o levógiros son afectados respectivamente del signo + y del signo - que preceden al valor numérico. Ejemplo:

$$(\alpha)_D^{20^\circ C} = +73^\circ 45' \text{ ó } +73,75^\circ$$

3.4.2. Para aceites esenciales en solución

3.4.2.1 Sea:

A: el valor del ángulo de rotación, expresado en grados.

L: La longitud del tubo, expresado en decímetros.



V: el volumen de la solución, en mililitros.

P: el peso de la sustancia disuelta, en gramos.

3.4.2.2. El poder rotatorio específico, expresado en grados y minutos está dado por la expresión:

$$(\alpha)_D^{20^{\circ}\text{C}} = \frac{AxV}{LxP}$$

3.5. Informa

3.5.1. El informe sobre el ensayo debe además de los resultados, todas las condiciones de ensayo (en especial la longitud del tubo empleado, el solvente y la concentración del aceite esencial en el solvente), todos los detalles operatorios no previstos en la norma o facultativos, así como todos los incidentes susceptibles de haber influido sobre los resultados.



Anexo 4. Norma Mexicana (NMX-K-081-1976). Determinación de la solubilidad en etanol de aceites esenciales y productos aromáticos. Dirección general de normas.

1. Objetivo y campo de aplicación.

Esta Norma establece el método a emplear y las observaciones visuales a efectuar, para la determinación del grado de solubilidad de los aceites esenciales y productos aromáticos, en disoluciones de etanol en concentraciones que van del 50 al 95% con intervalos de 5%.

2. Definiciones

- 2.1. Se dice que un volumen del producto es soluble en V y más volúmenes de etanol de concentración C , cuando la disolución límpida en V volúmenes permanece así después de la adición de alcohol de la misma concentración hasta un total de 20 volúmenes.
- 2.2. Se dice que un volumen del producto es soluble en V volúmenes de etanol de una concentración C y se enturbia al diluir, cuando la disolución límpida en V volúmenes se torna turbia y permanece así después de la adición de alcohol de la misma concentración hasta un total de 20 volúmenes (ver cuadro 21).
- 2.3. Se dice que un volumen de producto es soluble en V volúmenes de etanol de concentración C y se enturbia a V' volúmenes ($V' < 20$), cuando la disolución límpida en V volúmenes se torna turbia y permanece así después de la adición gradual de V' volúmenes de etanol de la misma concentración.



- 2.4. Se dice que un volumen de producto es soluble con opalescencia, cuando la disolución alcohólica presenta una opalescencia análoga a la mostrada por un testigo recién preparado.

3. Principio o fundamento.

El método se basa en el grado de miscibilidad observado a 20°C, durante la adición progresiva de una disolución acuosa de etanol de concentración conocida a un aceite esencial o producto aromático.

4. Reactivos y materiales

- 4.1. Disoluciones acuosas de etanol al 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95% v/v. Para preparar estas disoluciones usar etanol tan puro como sea posible siguiendo las instrucciones dadas en el cuadro 21. Verificar la concentración con un densímetro.
- 4.2. Disolución testigo de opalescencia. A 50 ml de disolución 0.0002 N de cloruro de sodio se agregan 0.5 ml de disolución de nitrato de plata 0.1 N y una gota de ácido nítrico al 25% p/p. Se agita bien la disolución y se deja en reposo 5 minutos.

5. Aparatos e instrumentos

- ❖ Bureta de 25 ó 50 ml graduada en 0.1 ml
- ❖ Pipeta volumétrica de 1 ml
- ❖ Probeta de vidrio de 25 ml con tapón esmerilado
- ❖ Baño con control de temperatura con precisión de 0.2°C
- ❖ Termómetro calibrado, graduado en 0.1°C para leer temperaturas entre 10 y 30°C.



6. Procedimiento

Se toma con una pipeta 1.0 ml (ver cuadro 21) del producto y se transfiere a la probeta, la cual se introduce en el baño a 20°C. En estas condiciones de temperatura, con la bureta se agrega etanol de la concentración indicada en la Norma del producto correspondiente, en porciones de 0.1 ml hasta disolución del aceite y sucesivamente en porciones de 0.5 ml hasta un volumen máximo de 20 ml, agitando vigorosamente después de cada adición. Cuando se ha obtenido una disolución límpida, se anota el volumen V de etanol utilizando y se continúa agregando etanol en las condiciones ya descritas. Si se produce turbidez antes de haber agregado los 20 ml de etanol, se anota el volumen V' con el que apareció la turbidez y eventualmente el volumen V'' con el cual desaparece.

Cuadro 21. Diluciones de etanol en 100 ml de mezcla (% v/v) a $\pm 0.1\%$

Diluciones ml de etanol en 100 ml de mezcla (% v/v) a \pm 0.1%	Volumen de agua destilada a 20°C, para ser adicionada a 100 ml de etanol de 95%, a la misma temperatura a $\pm 0.1^\circ\text{C}$, para la preparación de las diluciones correspondientes ml	Masa de etanol 95% (v/v) g	Masa de agua para ser añadida g	Límites de la densidad relativa y densidades aparentes	
				D 20 20	D 20 4
50	95,8	46,0	54,0	0,9316 a 0,9320	0,9300 a 0,9304
55	77,9	51,1	48,9	0,9214 a 0,9218	0,9198 a 0,9202
60	62,9	56,4	43,6	0,9105 a 0,9110	0,9089 a 0,9094
65	50,2	61,9	38,1	0,8990 a 0,8994	0,8974 a 0,8978
70	39,1	67,6	32,4	0,8868 a 0,8873	0,8725 a 0,8857
75	29,5	73,4	26,6	0,8740 a 0,8745	0,8725 a 0,8730
80	20,9	79,6	20,4	0,8604 a 0,8610	0,8589 a 0,8595
85	13,3	86,0	14,0	0,8460 a 0,8466	0,8445 a 0,8451
90	6,4	92,7	7,3	0,8303 a 0,8339	0,8288 a 0,8294
95	0,0	100,0	0,0	0,8123 a 0,8101	0,8109 a 0,8117

Anexo 5. FOTOGRAFIAS.



Imagen 1. Especie ejemplar de *Senecio graveolens* Wedd., ubicación a 30 km al norte de la ciudad Puquio. A una altitud de 3800 msnm.



Imagen 2. Secado de *Senecio graveolens* Wedd., en estantes de malla en las instalaciones de la empresa BOKAWSAY S.A.C.



Imagen 3. *Senecio graveolens* Wedd., envasado en bolsas de polietileno de baja densidad.



Imagen 4. Extracción del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd, por el sistema de destilación por arrastre con vapor de agua. PRODUCE-ABANCAY.

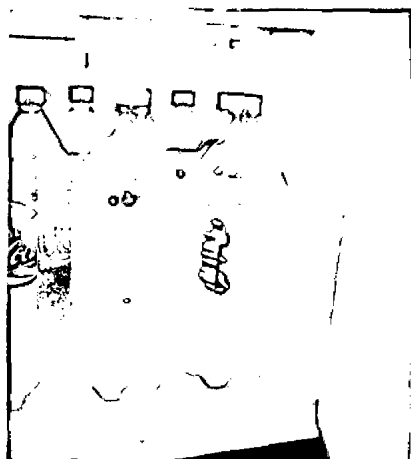


Imagen 5. Solución agua y aceite en botellas descartables de 2,500 ml.

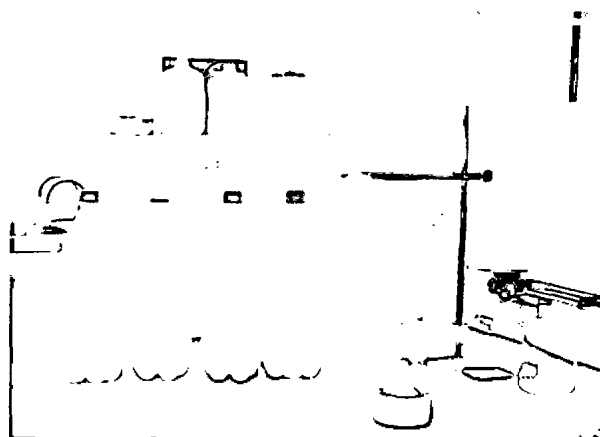


Imagen 6. Separación de la solución agua y aceite esencial con una pera de decantación.

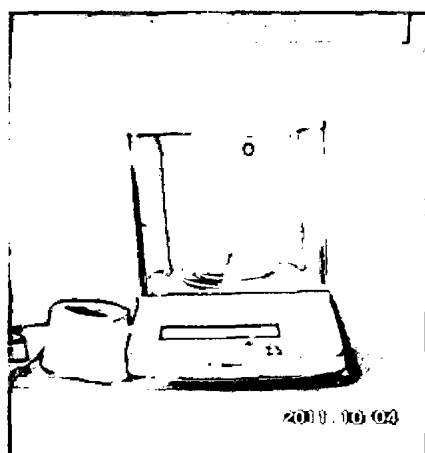


Imagen 7. Picnometro con agua destilada. Determinación de la densidad. UNAMBA.

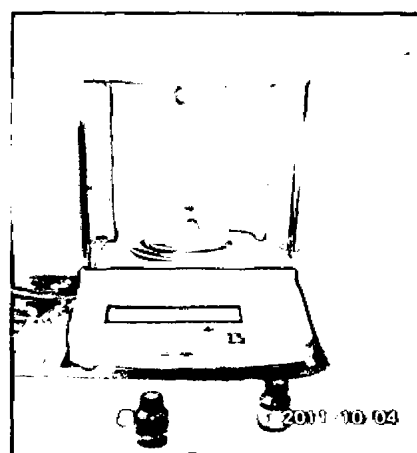


Imagen 8. Picnometro con aceite esencial. Determinación de la densidad. UNAMBA.

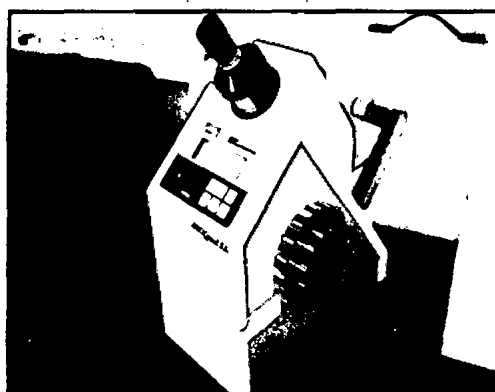


Imagen 9. Equipo refractómetro ABBE. UNSAA-AREQUIPA.

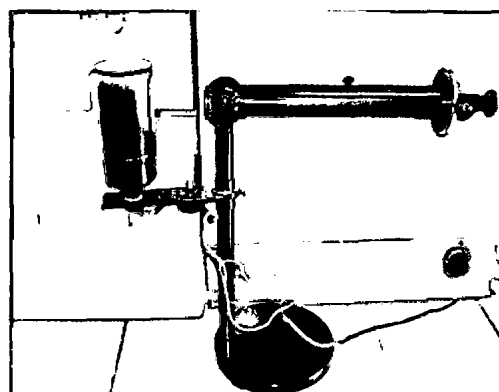


Imagen 10. Equipo de polarímetro. UNSAA-AREQUIPA

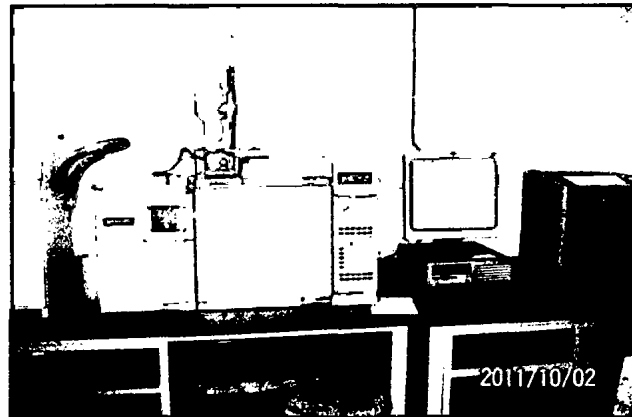


Imagen 11. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 Plus Series GC, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973 Network. UNSAAC-CUSCO.

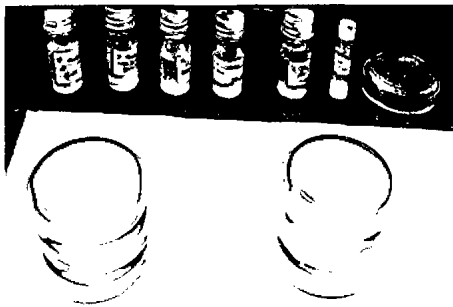


Imagen 12. Activación de cepas bacterianas en agar mac conkey y agar sangre. LABVETSUR.

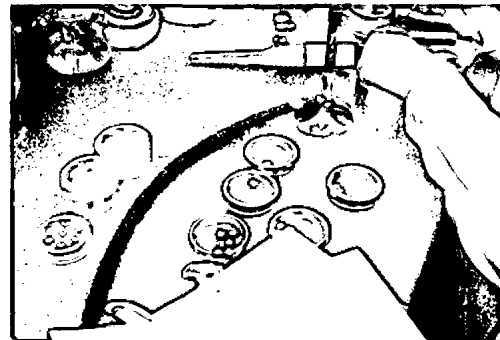


Imagen 13. Procedimientos general del método difusión radial en agar (disco y pozo). LABVETSUR.

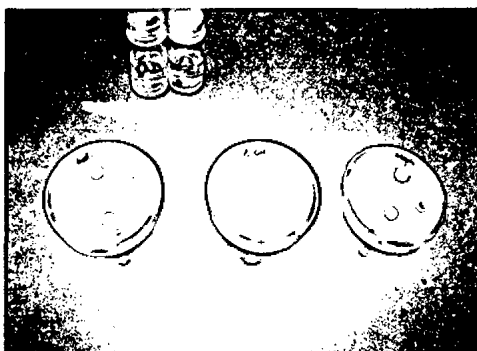


Imagen 14. Halos de inhibición de *E. coli* y *S. aureus*. LABVETSUR.

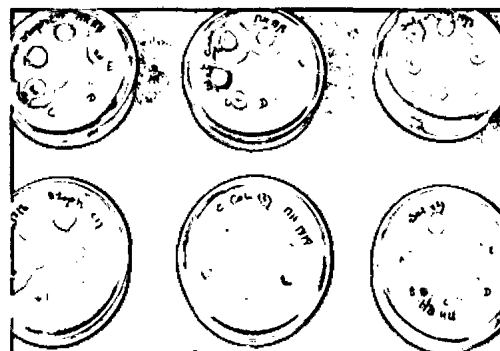


Imagen 15. Actividad antibacteriana del aceite esencial. LABVETSUR