

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD  
DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Senecio saxicola* Wedd Y SU EFECTO INHIBITORIO ANTE *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, PROCEDENTE DEL DISTRITO DE OCONGATE, PROVINCIA DE QUISPICANCHIS, CUSCO.**

**TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER:  
LEONARD RODRIGO HUANCA CAMACHO.**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE QUÍMICO.**

**ASESORES:  
Dr. LEONCIO SOLIS QUISPE  
Dra. MARIA ANTONIETA QUISPE RICALDE.**

**FINANCIADO POR:  
CONVENIO ARES - UNSAAC.**

**Cusco – Perú.**

**2021**

**INFORME DE ORIGINALIDAD**  
(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesora del trabajo de tesis titulado “Composición química del aceite esencial de *Senecio saxicola Wedd* y su efecto inhibitorio ante *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, procedente del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, Cusco” presentado por: **Leonard Rodrigo Huanca Camacho**, identificado con DNI Nro. **72950408**, para optar el título profesional de Químico.

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de diez por ciento (10%).

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesora, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio TURNITIN.

Cusco, 30 de enero de 2023

  
.....  
Firma

Post firma: María Antonieta Quispe Ricalde  
Nro. de DNI 23932572.  
ORCID del Asesor: 0000-0001-6349-1095.

**Se adjunta:**

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio:  
<https://unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:201536942?locale=es>.

NOMBRE DEL TRABAJO

**TESIS\_LEONARD RODRIGO HUANCA CA  
MACHO\_2022.pdf**

AUTOR

**Leonard Huanca Camacho**

RECUENTO DE PALABRAS

**22774 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**129259 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**104 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**3.5MB**

FECHA DE ENTREGA

**Jan 30, 2023 5:08 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Jan 30, 2023 5:10 PM GMT-5****● 10% de similitud general**

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

- 2% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 10% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
GENERALIDADES.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	3
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	5
CAPITULO I.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.2.-ESPECIE <i>Senecio saxicola</i> Wedd. ( <i>Asteraceae</i> ).....	14
1.2.1.-LA FAMILIA <i>Asteraceae</i> Y EL GÉNERO <i>Senecio</i> .....	14
1.2.2.-CLASIFICACION TAXONOMICA DE <i>S. saxicola</i> .....	14
1.2.3.-DESCRIPCION BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>S. saxicola</i> .....	15
1.2.4.-DISTRUBUCION GEOGRÁFICA DE <i>S. saxicola</i> .....	16
1.3.-LOS ACEITES ESENCIALES.....	17
1.3.1.-MONOTERPENOS, SESQUITERPENOS Y FENILPROPANOS EN ACEITES ESENCIALES.....	17
1.3.2- EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	20
1.3.2.1.- EXTRACCIÓN MEDIANTE ARRASTRE DE VAPOR.....	20
1.3.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	20
1.3.3.1.-CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	20
1.3.3.2.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	20
1.3.3.3.-CARACTERISTICAS QUÍMICAS.....	21
1.4-LA CROMATOGRAFIA.....	22
1.4.1.- CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	23
1.5.- BACTERIAS.....	27
1.5.1.- ESTRUCTURA.....	27
1.5.1.2.-SÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO DE LA PARED CELULAR.....	29
1.5.2.-DIVISIÓN CELULAR.....	31

1.5.3.- AGENTES ANTIBACTERIANOS .....	31
1.5.3.1.- ANTIBIÓTICOS B-LACTAMICOS .....	32
1.5.3.1.1.- CEFALOSPORINAS Y CEFAMICINAS .....	32
1.5.3.1.2.- GLUCOPÉPTIDOS .....	32
1.5.4.-BACTERIAS DEL GENERO <i>Staphylococcus</i> .....	33
1.5.4.1.-TAXONOMÍA.....	33
1.5.4.2.- ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS <i>Staphylococcus</i> .....	34
1.5.4.3.-ESPECIES DE IMPORTANCIA CLÍNICA.....	35
1.5.4.4.-ENFERMEDADES RELACIONADAS A <i>S. aureus</i> Y <i>S. epidermidis</i> .....	36
1.5.5.-INHIBICIÓN BACTERIANA.....	37
1.5.6.-ANTIBIOGRAMA.....	37
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.- MATERIALES.....</b>	<b>39</b>
2.1.1.- MUESTRA VEGETAL.....	39
2.1.2.- MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
2.1.3.-MATERIALES, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS .....	39
<b>2.2.- METODOS .....</b>	<b>43</b>
2.2.1.- TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	43
2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	44
2.2.3.- PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.....	45
2.2.4.-RECOLECCION Y PREPARACIÓN DE ESPECIE <i>S. saxicola</i> .....	45
2.2.5.-OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	46
2.2.6.-DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	48
2.2.7.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUÍMICOS MEDIANTE GC-MS .....	50
2.2.8.-EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE LA TECNICA KIRBI-BOUER MODIFICADA.....	51
2.2.8.1.-FUNDAMENTO.....	51
2.2.8.2.-PREPARACIÓN DE MATERIALES .....	52
2.2.8.3.-PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (0.5 MAC. FARLAND) PARA EL INÓCULO .....	52
2.2.8.4.-PREPARACION DE DISCOS DE ACEITE ESENCIAL (AE).....	53
2.2.8.5.-PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA ENSAYO MICROBIOLÓGICO .....	54
2.2.8.6.- PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN BACTERIANA .....	54

2.2.8.6.1.- INOCULACIÓN .....	54
2.2.8.6.2.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO.....	54
2.2.8.6.3.-INOCULACIÓN DE LAS PLACAS .....	55
2.2.8.7.-APLICACIÓN DE LOS DISCOS.....	55
2.2.8.8.-INCUBACIÓN.....	56
2.2.8.9.-LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	56
CAPITULO III.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
3.1.-DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	58
3.1.1.- PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S.</i> <i>saxicola</i> .....	58
3.1.2.-CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S.</i> <i>saxicola</i> .....	59
3.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i>	60
3.2.1.-PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> .....	60
3.2.2.-CARACTERISTICAS FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> .....	61
3.2.3.-CARACTERISTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S.</i> <i>saxicola</i> .....	62
3.3.-DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> ..	63
3.3.1.-PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> .....	63
3.4.-DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S.</i> <i>saxicola</i> Wedd.....	72
3.4.1.- DEL DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> Wedd. FRENTE AL CONTROL POSITIVO, EN LAS CEPAS DE <i>Staphylococcus epidermidis</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
3.4.2. DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>S. saxicola</i> wedd. FRENTE AL CONTROL POSITIVO, EN LAS CEPAS DE <i>Staphylococcus epidermidis</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	80
CONCLUSIONES .....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86
ANEXOS.....	89
ANEXO N° I.-IDENTIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1.- Especie <i>Senecio saxicola</i> Wedd.....	15
Figura N° 2.-Distribución geográfica de la especie <i>Senecio saxicola</i> Wedd.....	16
Figura N° 3.-Monoterpenos de Aceites esenciales .....	18
Figura N° 4.-Sesquiterpenos de Aceites esenciales. ....	18
Figura N° 5.-Fenilpropanos de Aceites esenciales. ....	19
Figura N° 6.-Fase móvil y Fase estacionaria en cromatografía.....	22
Figura N° 7.- Esquema de cromatografía de gases (GC). ....	24
Figura N° 8.- Esquema de espectrómetro de masas.....	26
Figura N° 9.- Bacterias <i>Staphylococcus</i> en forma de racimos.....	33
Figura N° 10.-Estructura pared celular <i>Staphylococcus</i> . ....	35
Figura N° 11.- Síndrome de shock tóxico. ....	37
Figura N° 12.- Diagrama de flujo del trabajo experimental.....	45
Figura N° 13.- Mapa del Distrito de Ocongate. ....	46
Figura N° 14.- Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar. ....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1- Actividad antibacteriana frente a <i>S. epidermidis</i> (St16447) y <i>S. aureus</i> (M5-7)</b> .....	44
<b>Tabla 2- Concentración de aceites esenciales para antibiograma</b> .....	53
<b>Tabla 3- Parámetros para la medición de los halos</b> .....	57
<b>Tabla 4.-Porcentaje de extracción del aceite esencial de <i>S. saxicola</i></b> .....	58
<b>Tabla 5.-Propiedades organolépticas del aceite esencial de <i>S. saxicola</i></b> . ....	59
<b>Tabla 6.-Solubilidad del aceite esencial de <i>S. saxicola</i></b> .....	60
<b>Tabla 7.-Propiedades físicas del aceite esencial de <i>S. saxicola</i></b> .....	61
<b>Tabla 8.-Propiedades químicas del aceite esencial de <i>S. saxicola</i></b> .....	62
<b>Tabla 9.-Composición química del aceite esencial del <i>S. saxicola</i></b> . ....	64
<b>Tabla 10.-Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> Wedd, frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> (St16447)</b> .....	72
<b>Tabla 11.-Determinación del grado de sensibilidad de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (St16447) a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> Wedd</b> .....	73
<b>Tabla 12.-Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> wedd frente a la cepa de <i>S. epidermidis</i> (St16447)</b> .....	74
<b>Tabla 13.-Prueba de Post hoc de Scheffé de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> wedd frente a la cepa de <i>S. epidermidis</i> (St16447)</b> .....	75
<b>Tabla 14.-Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Senecio saxicola</i> Wedd frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (M5-7)</b> .....	76
<b>Tabla 15.-Determinación del grado de sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> (M5-7) a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> wedd</b> .....	77
<b>Tabla 16.-Análisis de Varianza (ANOVA) para la actividad antibacteriana del aceite esencial de frente a la cepa de <i>S. aureus</i> (M5-7)</b> .....	78
<b>Tabla 17.-Prueba de post hoc de Scheffé para la actividad antibacteriana del aceite esencial de frente a la cepa de <i>S. aureus</i> (M5-7)</b> .....	79
<b>Tabla 18.-Efecto inhibitorio del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> wedd, frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>, respecto a Vancomicina</b> . .....	80
<b>Tabla 19.-Efecto inhibitorio del aceite esencial de <i>S. saxicola</i> wedd, frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>, respecto a Cefalexina</b> . .	82

## TABLA DE ABREVIATURAS

- °C: Grados centígrados.
- µg.: Microgramos.
- µm.: Micrómetros.
- BHI: Caldo de cerebro corazón (Agar).
- CC: Cromatografía en columna.
- CCF: Cromatografía de capa fina.
- cm.: Centímetros.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria.
- D.O.: densidad óptica.
- DMAPP: Pirofosfato de dimetilalilo.
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
- *E. coli*: *Escherichia coli*.
- *et al.*: Y otros.
- g: Gramos.
- GC: Cromatografía de gases.
- GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama.
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- Hrs: Horas.
- IC<sub>50</sub>: Concentración mínima inhibitoria.
- IgG: Inmuno globulinas.
- IPP: Isopentenil difosfato.
- m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar.
- m/z: Masa y carga molecular.
- MEP: Metileritritol fosfato.
- mg/mL: Miligramos por mililitros.
- MH: Muller Hilton (Agar).
- mm: Milímetros.
- MS: Espectrometría de masas.
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida.
- n<sub>D</sub>: Índice de refracción se ha medido usando la línea D de emisión del sodio (589 nm).
- p/p: Concentración peso- peso.
- p/v: Concentración peso-volumen.
- Q.P: Reactivo grado químicamente puro.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.
- *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.
- *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*.
- *S. saxicola*: *Senecio saxicola*.
- Spp: Especie no identificada.
- UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro.
- v/v: Concentración volumen-volumen.
- nm: Nanómetros.
- µL: Microlitros.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se obtuvo el aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. procedente del Distrito de Ocongate, mediante la técnica de hidrodestilación, y fue caracterizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para determinar su composición química, y evaluar la actividad inhibitoria ante *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La especie vegetal *Senecio saxicola* Wedd. fue recolectada a 4725 m.s.n.m en el Abra de Pirhuayani en el Distrito de Ocongate. La extracción del aceite esencial se realizó aplicando la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor con trampa de cleverger, se obtuvo un rendimiento de 7.7%. Las pruebas fisicoquímicas dieron a conocer que el aceite presenta una densidad de 0.9706, índice de refracción 1.518, rotación óptica  $-0.175^\circ$ , índice de acidez 0.7106 mg de KOH/g de aceite, índice de saponificación 0.2018 mg de KOH, alta solubilidad en etanol al 90%, etanol absoluto. Mediante GC-MS se elucidaron componentes químicos siendo: 4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano (4.65%), 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-[1s(1a,7a,8aa)]-Naftaleno (2.73%), (3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidronaftaleno -1(8aH) (24.97%), 9-cedranona (7.17%), 3,4,4a,5,6,7-hexahidro-4a,5-dimetil-3-(1-metiletenil)-[3S-(3a,4aa,5a)]-1(2H)-naftalenona (41.4%) los componentes mayoritarios. La actividad inhibitoria ante *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se evaluó mediante la técnica de Kirby- bouer modificada mediante el uso de un antibiograma usando fármacos patrón Vancomicina y Cefalexina para comparar los resultados. Mediante el análisis estadístico realizado y coeficiente de correlación lineal de Pearson se estableció la correlación entre los halos de inhibición de actividad antibacteriana, los cuales verificaron los resultados obtenidos. El aceite esencial a 75% presento mediana actividad inhibitoria contra a *Staphylococcus aureus* a comparación de las diferentes concentraciones de aceite esencial evaluadas.

**Palabras Clave:** *Senecio saxicola* Wedd., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, aceite esencial, inhibición.

## INTRODUCCIÓN

Cusco es una Región rica en biodiversidad, principalmente en flora, debido a que forma parte del Corredor Biológico Vilcabamba-Amboró, siendo uno de los ocho territorios con la mayor mega biodiversidad del mundo. Caracterizándose por tener plantas únicas en el mundo (especies endémicas) y albergar miles de especies de plantas.<sup>(1)</sup>

El Distrito de Ocongate como parte de la Provincia de Quispicanchis no es la excepción, debido a que posee distintos pisos ecológicos, las cuales ofrecen una abundante biodiversidad, especialmente la flora que ha sido aprovechada por sus pobladores debido a las bondades terapéuticas que estas poseen. Como parte de sus tradiciones, diversas especies vegetales han sido usadas con propósitos medicinales por los diversos efectos terapéuticos que poseen, dichos conocimientos empíricos se han mantenido en el tiempo, transmitiéndose de generación en generación.<sup>(2)</sup>

Esta especie vegetal se caracteriza por los usos medicinales y el agradable aroma que posee. Según los pobladores de la zona esta planta se usa para elaborar Ilipta (un comprimido de ceniza en forma de bloque elaborado a partir de la ceniza del tallo de esta planta).<sup>(3)</sup>

La caracterización química (mediante cromatografía de gases) permite conocer las moléculas responsables del aroma que emite. Cabe resaltar que, los aceites esenciales poseen amplia variedad de usos, principalmente en la medicina en la cual son usadas por sus aplicaciones terapéuticas y sus propiedades biológicas las cuales se aplican en microbiología.<sup>(4)</sup>

El presente trabajo tiene el propósito de determinar la composición química del aceite esencial de la especie *Senecio saxicola* Wedd. procedente del Distrito de Ocongate, Provincia de Quispicanchis, y evaluar su actividad inhibitoria frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, microorganismos de importancia clínica.

# GENERALIDADES

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La especie *Senecio saxicola* Wedd, perteneciente a la familia *Asteraceae*, se caracteriza por las propiedades aromáticas que posee, desprendiendo un aroma agradable tanto en las hojas como en el tallo. A partir de esta especie aromática, como materia prima, se puede obtener aceites esenciales cuya propiedad aromática se debe a la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos.<sup>(2)</sup>

Aunque, existen estudios botánicos de la especie *Senecio saxicola* Wedd, no se reportan estudios sobre la composición química de los aceites esenciales de dicha especie, especialmente sobre los compuestos químicos responsables de su agradable aroma. Además, se desconoce si el aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. presenta actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Por consiguiente, se tienen pocos antecedentes sobre este gran recurso natural.

### FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la composición química del aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd procedente del Distrito de Ocongate?

¿El aceite esencial de *Senecio saxicola* presenta efecto inhibitorio contra las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*?

## **JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

El desarrollo de esta investigación permitió conocer la estructura química de las moléculas responsables del aroma, actividad farmacológica y propiedades que caracterizan el aceite esencial.

Por otro lado, el presente estudio busco revalorar los conocimientos ancestrales en medicina tradicional de los pobladores de las comunidades campesinas de Ocongata por la diversidad biológica que poseen. Además, desarrollar mayor investigación a nivel científico y ver el gran potencial terapéutico que posee *Senecio saxicola* Wedd. como fuente de nuevos recursos químicos y darles un mayor valor agregado.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la composición química del aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. y evaluar la actividad inhibitoria frente a las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener el aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. por arrastre de vapor mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd.
- Determinar la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. sobre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mediante pruebas de sensibilidad bacteriana (Antibiograma).

### **HIPÓTESIS**

El aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd. en su composición química presenta monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Por otro lado, presentara actividad antibacteriana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## **LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se desarrolló en:

-Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco.

- Laboratorio de Química Analítica Cualitativa de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco.

-Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco.

# CAPITULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Weddell (1856) en su libro *Chloris Andina* registró la clasificación sistemática e información de la especie *Senecio saxicola* teniendo en cuenta su taxonomía, fenología y distribución en Perú<sup>(3)</sup>.

Vision *et al.* (1996) reportaron la presencia de la especie *Senecio saxicola*, incluyendo sus citas bibliográficas, sinonimia y distribución departamental en Perú. Además, reportaron el género *Senecio* a través de estudios recientes, dando a conocer que el Perú tiene 180 especies, distribuidas en casi todos los hábitats, incluidos el desierto costero, los bosques montañosos y las formaciones de gran altura como jalca y puna. También se proporcionaron una lista de nombres de especies excluidas de *Senecio* debido a cambios en la posición genérica, una lista alfabética de nombres tratados como sinónimos, una clave para los géneros *Andean Senecioneae* y una sinopsis jerárquica de los géneros reportados en el Perú<sup>(5)</sup>.

Balzaretti *et al.* (2000) extrajeron y caracterizaron los aceites esenciales de dos variedades de *Senecio filaginoides*: *S. ilaginoides var DC. filaginoides* y *S. filaginoides var. lobulatus* (Hook. Et Arn.). También, reportaron la composición química de los aceites esenciales de las variedades *Senecio filaginoides* mediante GC-MS en un 63.91% para *Senecio filaginoides var filaginoides* y 53.73% para *Senecio filaginoides var lobulatus*<sup>(6)</sup>.

De Feo *et al.* (2002) extrajeron aceite esencial de las partes aéreas de la especie vegetal *Senecio nutans* Sch. Bip. recolectado en dos localidades del Departamento de Arequipa, Perú (a 3500 y 4800 m.s.n.m.). También, reportaron que el rendimiento de los aceites extraídos mediante la técnica de hidrodestilación fue: 0.16% y 0.18% respectivamente. Además, determinaron la composición química de los aceites esenciales por GC y GC-MS, en el cual se identificó 21 de 25 componentes para el aceite esencial de la muestra recolectada a menor altura. De igual manera, en el aceite esencial de mayor altura se identificó 41 de 46 componentes. Los hidrocarburos monoterpénicos

predominaron en ambos aceites teniendo como compuestos mayoritarios: sabineno y  $\alpha$ -terpineno<sup>(7)</sup>.

El-Shazly *et al.* (2002) extrajeron aceites esenciales de *Senecio aegyptius var. discoideus* a partir de: flores, hojas, tallos y raíces mediante la técnica de hidrodestilación. En este estudio se determinó la composición química de los aceites esenciales mediante GC-MS e identificaron 34 de 37 compuestos. Además, Aislaron y caracterizaron el componente mayoritario (1,10 epoxifuranoeremofilano) mediante una combinación de análisis de GC, GC-MS y resonancia magnética nuclear (RMN). Por otro lado, reportaron que los aceites esenciales de flores, hojas y tallos poseen gran cantidad de hidrocarburos monoterpenicos, mientras que el aceite esencial de raíz es rico en furanoeremofilanos. Finalmente, indicaron que los aceites esenciales de flores y hojas presentan actividad antifúngica significativa contra *Candida albicans* y un efecto moderado contra bacterias Gram positivas; sin embargo, tiene una actividad débil contra las bacterias Gram negativas. Además, que el compuesto aislado (sesquiterpeno: 1,10-epoxifuranoeremofilano) presenta actividad inhibitoria sustancial contra bacterias Gram negativas<sup>(8)</sup>.

Baser *et al.* (2004) extrajeron aceite esencial de *Senecio farfarifolius* Boiss. *et* Kotschy (partes aéreas), endémico en Turquía, mediante la técnica de hidrodestilación. Además, determinaron la composición química del aceite esencial mediante GC y GC-MS, caracterizando ochenta y siete componentes que representan el 95% de los compuestos con  $\alpha$ -pineno (48.3%) y 1,8-cineol (10.3%) como componentes principales<sup>(9)</sup>.

El Hawary *et al.* (2008) extrajeron el aceite esencial de *Senecio rowleyanus* Jacobs obtenida mediante hidrodestilación, Además, determinaron su composición química mediante GC-MS, identificando veinticinco componentes (99.95% de la composición del aceite) y reportaron que el aceite esencial tiene gran cantidad de alcoholes sesquiterpénicos de tipo guaiane y que los componentes mayoritarios fueron: espatulenol (22.9%), germacreno B (12.4%), mirceno (12.8%) y viridiflorol (11%). Por otro lado, El hawary *et al.* (2008) analizaron la actividad citotóxica y antimicrobiana del aceite esencial e indicaron

que presenta marcada actividad citotóxica contra ciertas líneas celulares humanas del cerebro y el hígado in vitro. <sup>(10)</sup>.

Dambolena *et al.* (2008) extrajeron aceites esenciales de las partes aéreas de tres especies de *Senecio* (*Senecio subulatus* var. *Salsus*, *S. subulatus* var. *Erectus*; *Senecio viridis* y *Senecio argophylloides*) mediante hidrodestilación, Las muestras vegetales fueron recolectadas en diferentes áreas fitogeográficas del norte de Argentina. En estudio se determinó la composición química de los aceites esenciales por GC y GC-MS, reportando que los hidrocarburos monoterpenos dominaron el perfil químico de los aceites con  $\beta$ -pineno (17–31%), p-cimeno (18–33%) y J-terpineno (16–54%) como compuestos mayoritarios de *S. subulatus*. De igual manera, se reportaron que: Ot- tujeno (13–32%), canfeno (53–9%), sabineno (12–7%) y betellandeno (11–16%) eran compuestos mayoritarios para *S. argophylloides* y *S. viridis*, respectivamente <sup>(11)</sup>.

Oladipupo *et al.* (2009) extrajeron los aceites esenciales de *Senecio polyanthemoides* Sch. Bip. a partir de flores, hojas y tallos mediante la técnica de hidrodestilación, las muestras vegetales fueron recolectadas en dos localidades diferentes dentro de la Ciudad de Umhlatuze, Provincia de KwaZulu-Natal (Sudáfrica). En el estudio se determinó la composición química de los aceites esenciales mediante GC y GC-MS, e identificaron veintiséis constituyentes que representan un promedio de 86 - 99.6% de la composición total del aceite. Además, reportaron que hubo predominio de los compuestos monoterpenoides, aunque se observó una variación cuantitativa. De igual manera, indicaron que: limoneno (3.1 - 43.0%), p-cimeno (4.9-36.3%),  $\beta$ -selineno (1.3-32.7%),  $\alpha$ -pineno (1.8-21.4%),  $\beta$ -pineno (7.6 16.5 %) y 1,8-cineol (9.3-11.4%), óxido de cariofileno (4.1-13.4%) y humuleno epóxido II (8.6-10.3%) fueron los compuestos mayoritarios respectivamente <sup>(12)</sup>.

González *et al.* (2009) extrajeron el aceite esencial de las hojas y tallos de *Senecio bracteolatus* var. *bracteolatus* Hook. et Arnott mediante hidrodestilación obteniendo un rendimiento de 1.3%. Además, determinaron la composición química de los constituyentes por cromatografía de gases (GC) y GC-MS, teniendo como componentes mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (69.3%),  $\beta$ -pineno (7.6%), sabineno (7.2%),  $\alpha$ -felandreno (1.3%),  $\beta$ -felandreno (2.3%) y o-cimeno (1.4%).<sup>(13)</sup>

Chen *et al.* (2009) reportaron la composición química del aceite esencial de las flores frescas de *S. scandens* teniendo monoterpenos y b-pineno como componentes mayoritarios de 62 compuestos identificados. Chen *et al.* indicaron que se usó la especie *S. scandens* debido a que, es parte de la medicina tradicional china para tratar enfermedades oftálmicas, inflamación y leptospirosis. Además, informaron que sus extractos y compuestos poseen importantes actividades antimicrobianas y antiinflamatorias <sup>(14)</sup>.

Usta *et al.* (2009) extrajeron dos muestras de aceites esenciales obtenidas por hidrodestilación de las flores de *Senecio vernalis* Valdst. & Kit., (*Asteraceae*) y *Senecio platyphyllus* DC. *van platyphyllus*. En el estudio determinaron la composición química de los aceites esenciales mediante GC-FID y GC-MS, encontrando 69 compuestos en el aceite de *S. vernalis*, representando el 93.4% de sus componentes y 48 compuestos para el aceite esencial de *S. platyphyllus* *var. platyphyllus*, representando el 94.4% de sus componentes. Además, indicaron que los aceites esenciales presentaron como compuestos mayoritarios: p-pineno (13.0%) y (E) -cariofileno (28.6%), respectivamente <sup>(15)</sup>.

Murari *et al.* (2009) extrajeron los aceites esenciales de hojas, tallos aéreos y subterráneos de *Senecio crassiflorus* *var. Crassiflorus* mediante la técnica de hidrodestilación. Además, determinaron la composición química del aceite esencial mediante GC-MS, indicando diferencias cualitativas y cuantitativas entre las partes analizadas, asimismo determinaron que los compuestos mayoritarios del aceite esencial de las hojas eran ( $\alpha$ -cadinol) sesquiterpenos oxigenados, mientras que del aceite de tallos aéreos y subterráneos (D Germacreno) reportaba hidrocarburos sesquiterpénicos como constituyentes mayoritarios. Por otro lado, se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. en el cual el aceite esencial de las hojas mostró gran actividad <sup>(16)</sup>.

Ucuncu *et al.* (2010) extrajeron los aceites esenciales de *Senecio othonnae*, *S. racemosus* y *S. nemorensis* obtenidos mediante hidrodestilación a partir de sus flores frescas. También, determinaron la composición química de los aceites esenciales mediante GC-FID y GC-MS, identificando un total de setenta y seis

compuestos, que constituyen más del 83.1%, 97.7% y 86.8% de la composición de aceite total de las flores de *S. othonnae*, *S. racemosus* y *S. nemorensis* respectivamente. Además, reportaron como componentes mayoritarios: óxido de cariofileno (18.6%), (E)-beta-farneseno (21.6%) y gamma-curcumeno (42.8%) respectivamente para cada aceite esencial. Por otro lado, el estudio reportó que los aceites de *S. othonnae* y *S. nemorensis* mostraron actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida tropicalis*, pero la de *S. racemosus* solo presentó actividad contra *Candida tropicalis*<sup>(17)</sup>.

Arancibia *et al.* (2010) determinaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Senecio mustersii* y *Senecio subpanduratus*, además, reportaron que los aceites esenciales se extrajeron mediante la técnica de hidrodestilación y obtuvieron porcentajes de rendimiento de 0.81% para *S. mustersii* y 0.72% para *S. subpanduratus*. También, evaluaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos: la especie *Senecio mustersii* se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* y la especie *Senecio subpanduratus* frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El trabajo realizado llegó a la conclusión que, la especie vegetal *Senecio mustersii* no presentó actividad antifúngica, mientras que la especie *Senecio subpanduratus* presentó actividad antibacteriana contra algunas especies de *Candida*<sup>(18)</sup>.

Mohammadhosseini *et al.* (2010) identificaron y cuantificaron los aceites esenciales obtenidos de partes aéreas de *Senecio gallicus* Chaix en la provincia de Semnan (Irán). En el trabajo realizado reportaron la composición química del aceite esencial mediante GC y GC-MS, identificando 23 componentes que constituían el 96.2% de la composición química del aceite esencial teniendo como principales componentes:  $\beta$ -felandreno (12.2%),  $\alpha$ -pineno (9.8%), D-germacrano (9.8%), mirceno (8.2%),  $\alpha$ -copaeno (8.1%), sabineno (7.2%), (Z) -  $\beta$ -ocimeno (7.0%),  $\beta$ -cariofileno (6.8%), p-cimeno (6.4%),  $\beta$ -pineno (4.2%),  $\alpha$ -felandreno (3.8%),  $\alpha$ -terpinoleno (3.3 %),  $\beta$ -ocimeno (1.7%),  $\alpha$ -humuleno (1.6%),  $\alpha$ -zingibereno (1.5%) y óxido de cariofileno (1.0%)<sup>(19)</sup>.

Arrabal *et al.* (2011) obtuvieron aceite esencial de las hojas de *Senecio coincoyi* Rouy mediante hidrodestilación, la composición química del aceite esencial

extraído fue analizada mediante GC-MS y tuvieron como compuesto mayoritario el 1-trideceno ( $28.1 \pm 8.5\%$ ) y la presencia de hidrocarburos insaturados (1-undeceno, 1-dodeceno y 1-trideceno)<sup>(20)</sup>.

Kahriman *et al.* (2011) obtuvieron los aceites esenciales de la flor, hoja y tallo frescos de la especie *Senecio pandurifolius* mediante la técnica de hidrodestilación con trampa de Clevenger. los aceites esenciales fueron caracterizados por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y GC-MS, identificando un total de 45, 60 y 42 compuestos que constituyen más del 90.1%, 88% y 89% de la composición de aceite de la flor, hoja y tallo de *S. pandurifolius* respectivamente. Por otro lado, reportaron que los principales componentes de los aceites esenciales propios de *S. pandurifolius* fueron  $\alpha$ -cupreneno (30.7%) en flor,  $\alpha$ -zeribereno (16.1%) en la hoja y  $\alpha$ -curcumeno (14.9%) en el tallo. Además, evaluaron las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales de *S. pandurifolius* frente a bacterias Gram positivas, micobacterias y hongos, pero no bacterias Gram negativas. En resumen, demostraron que el aceite esencial de la hoja presentaba alta actividad antimicobacteriana<sup>(21)</sup>.

Pumaylle *et al.* (2012) extrajeron, caracterizaron y evaluaron la actividad antibacterial del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd. frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La muestra vegetal (hojas y tallos) fue recolectada en el distrito de Puquio a 3800 m.s.n.m. en Ayacucho. El estudio realizado reportó que el aceite esencial extraído mediante destilación por arrastre de vapor tubo un rendimiento de 1.26 % (p/p), también que al determinar la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) se obtuvieron como componentes mayoritarios: sabineno (52.39%), 4-careno (8.20 %),  $\tau$ -terpineno (7.11 %),  $\beta$ -mirceno (6.74 %), 4-terpinenol (3.78 %) y pulegona (3.67 %). Por otro lado, la actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en agar en pocillos, utilizando cepas de *S. aureus* y *E. coli*, los resultados mostraron actividad antibacteriana marcada y moderada respectivamente. En conclusión, el estudio demostró que el aceite esencial de *S. graveolens* presentó actividad antibacteriana promisorio frente a *E. coli* y *Staphylococcus aureus* <sup>(22)</sup>.

Murillo *et al.* (2017) evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Senecio nutans* de Patahuasi (4090 m.s.n.m.), en Arequipa, durante el almacenamiento de la hamburguesa de carne de vacuno. También, dieron a conocer que el aceite esencial se extrajo de las hojas y tallos del material vegetal mediante la técnica de destilación agua-vapor, además, determinaron la composición química del aceite esencial mediante GC-MS y reportaron como componentes mayoritarios a metilcinamato (24.04%),  $\alpha$ -terpineno (13.14%), timol (8.89%), etc. Por otro lado, determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial frente a aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método Kirby-Bauer y evaluaron las muestras de hamburguesa aplicando el aceite esencial en el cual el recuento microbiano de aerobios mesófilos, *E. coli*, y *S. aureus* no excedió lo establecido por la Norma Técnica Peruana-NTP por un tiempo de hasta 10, 20, 15 días respectivamente<sup>(23)</sup>.

Alderete (2017) determinó la composición química y evaluó la actividad antimicrobiana, antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *Senecio nutans* Sch. Bip, *S. calvus* Cuatrec y *S. chiquianensis* Cabrera. El estudio realizado reportó que los aceites esenciales de *S. nutans* Sch. Bip, *S. calvus* Cuatrec *S. chiquianensis* Cabrera tuvieron porcentajes de rendimiento de 0.97%, 0.42% y 0.03% respectivamente, obtenidos mediante la técnica de hidrodestilación. Además, indicó que la composición química determinada mediante GC-MS obtuvo hidrocarburos monoterpenos como componentes mayoritarios, seguidos de sesquiterpenos. Además, la actividad antimicrobiana realizada por el método de microdilución, indicó que los aceites esenciales estudiados presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y poca actividad frente *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante el análisis de DPPH, se obtuvo una concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de 11.06 mg/mL, 8.85 mg/mL y 4.205 mg/mL para el aceite esencial de *Senecio nutans* Sch. Bip, *Senecio calvus* Cuatrec y *Senecio chiquianensis* Cabrera respectivamente, estos valores exhibieron una capacidad antioxidante como donadores de electrones al radical DPPH menor que la sustancia de referencia Trolox® (IC<sub>50</sub>=0.0038 mg/mL)<sup>(24)</sup>.

Rodríguez *et al.* (2018) presentaron un catálogo de las plantas vasculares que crecen en Chile, de acuerdo a este catálogo, la flora de las plantas vasculares que crecen en Chile comprende 186 familias, 1121 géneros y 5471 especies. Además, indicaron que 4655 de las especies reportadas corresponden a especies nativas, siendo 2145 endémicas de Chile y 816 especies introducidas. Entre la gran diversidad floral reportan la presencia de la especie *Senecio saxicola* en Atacama<sup>(25)</sup>.

## **1.2.-ESPECIE *Senecio saxicola* Wedd. (Asteraceae)**

### **1.2.1.-LA FAMILIA *Asteraceae* Y EL GÉNERO *Senecio***

Esta familia en Perú se caracteriza por albergar 222 géneros y más de 1500 especies distribuidas en 13 tribus. Además, como especies nativas se tiene 14 géneros, con 325 especies aproximadamente, en el cual el género *Senecio* L. es el más diverso.

Asimismo, las diferentes especies presentes en el Perú muestran gran diversidad en hábito, variando desde hierbas anuales a perennes rizomatosas, arbustos sufrutescentes o arbustos. Las hojas son basales, caulinares, o ambas, con filotaxia alterna o raramente opuesta, entre otras características morfológicas de esta abundante familia.

Por otro lado, el género *Senecio* se caracteriza por residir en una gran variedad de hábitats y zonas ecológicas peruanas. Cabe resaltar, que ocupa principalmente hábitats andinos. Además, contiene 10 especies en lomas de desiertos costeros, siendo 8 especies endémicas. Las especies altoandinas de *Senecio* acogen diversas formas, desde arbustos reducidos con hojas lineares y capítulos solitarios hasta otras especies en forma de hierbas perennes rizomatosas con hojas basales cintiformes y capitulescencia escaposa. En zonas áridas de los valles interandinos se presentan como arbustos con hojas y capitulescencias variables. Finalmente, indicar que más del 65% de *Senecio* peruanos son especies endémicas.<sup>(5)</sup>

### **1.2.2.-CLASIFICACION TAXONOMICA DE *S. saxicola*.**

*-Reino: Plantae.*

*-Clase: Equisetopsida C. Agardh*

*-Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.*

*-Súper-orden: Asterales Takht.*

*-Orden: Asterales Link*

*-Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl*

*-Género: Senecio L.*

*-Especie: Senecio saxicola.*

**Nombre común:** Maycha.

### 1.2.3.-DESCRIPCION BOTÁNICA DE LA ESPECIE *S. saxicola*

Planta semejante a un arbusto ,cespitoso (en forma de césped abundante), es una planta de crecimiento anual, glandular-pubérulo; ramas herbáceas, delgadas, erguidas, estriadas con moderación de hoja, en lugar del ápice ligeramente corimbosas son un poco lineal, aguda, sésiles, ovoide; ambos fuertemente dentadas; y se encuentra con sus oligocefalos, tiene capítulos de radiación amplios, por otro lado el cáliz es mucho más corto que el pedúnculo; envoltura subcampanulato, con 12-15 glándulas de hojas lineales bordeadas; flores a la altura del disco; con gran densidad de papilosis, en forma de cepillo.

Esta especie vegetal tiene de 20 a 30 centímetros de altura, con una cepa leñosa, así como la base de las ramas que son extremadamente frágiles. Las hojas tienen de 2 a 3 centímetros de largo, y apenas 2 milímetros de ancho, viscosas como todas las otras partes verdes, además posee pequeños y numerosos tallos en las extremidades de los tallos o ramas, de 15 milímetros de ancho cuando están abiertos, tienen una longitud de 6 a 8 milímetros. Flores de color amarillo pálido en los meses de mayo a julio (Figura N°1).<sup>(3)</sup>



**Figura N°1.-** Especie *Senecio saxicola* Wedd.

#### 1.2.4.-DISTRUBUCION GEOGRÁFICA DE *S. saxicola*

*S. saxicola* se encuentra en Perú a una altura de 3500-4000 m.s.n.m. por ejemplo en la cordillera de Taco (Palca), por lo general se encuentra distribuido entre rocas. También, esta especie se distribuye en Chile, aunque a una altura de 200 a 300 m.s.n.m. por ejemplo en Atacama. Esta especie se encuentra distribuida en la zona sur del continente sudamericano siendo una especie nativa (Figura N°2).<sup>(3, 5, 25)</sup>



**Figura N°2.-** Distribución geográfica de la especie *Senecio saxicola* Wedd.<sup>7</sup>

### **1.3.-LOS ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), fenilpropanos las cuales son sustancias orgánicas volátiles y aromáticas. Desde el punto de vista químico, en estas moléculas se presentan como hidrocarburos alicíclicos, cíclicos y aromáticos con sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, además, contienen sustancias azufradas y nitrogenadas, entre otros compuestos. Por otro lado, los aceites esenciales son parte del metabolismo vegetal, al ser parte de los metabolitos secundarios.<sup>(4, 26-29)</sup>

Los monoterpenos y sesquiterpenos son los compuestos que se encuentran en mayor proporción en aceites esenciales. Los aceites esenciales pueden localizarse en una determinada parte del material vegetal, por ejemplo, flores, hojas, tallo, frutas, raíces o toda la planta. Finalmente, las esencias se producen en glándulas especiales formadas por células secretoras arregladas para formar una bolsa donde se acumula el aceite esencial.<sup>(26, 28)</sup>

Por otro lado, los aceites esenciales según la naturaleza química de los componentes mayoritarios se clasifican como: monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides. Esta variación en la composición química es conocida como quimiotipo, una entidad químicamente distinta que se diferencia en los metabolitos secundarios que indican el componente mayoritario en una esencia.<sup>(27, 29)</sup>

#### **1.3.1.-MONOTERPENOS, SESQUITERPENOS Y FENILPROPANOS EN ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales se biosintetizan a partir de metabolitos primarios que se encuentran dentro de las plantas. En consecuencia, a la biosíntesis de terpenos, se tienen una diversidad de moléculas naturales pertenecientes a monoterpenos (Figura N°3), sesquiterpenos (Figura N°4) y fenilpropanos (Figura N°5), formando parte de la mezcla compleja que son los aceites esenciales.<sup>(29)</sup>

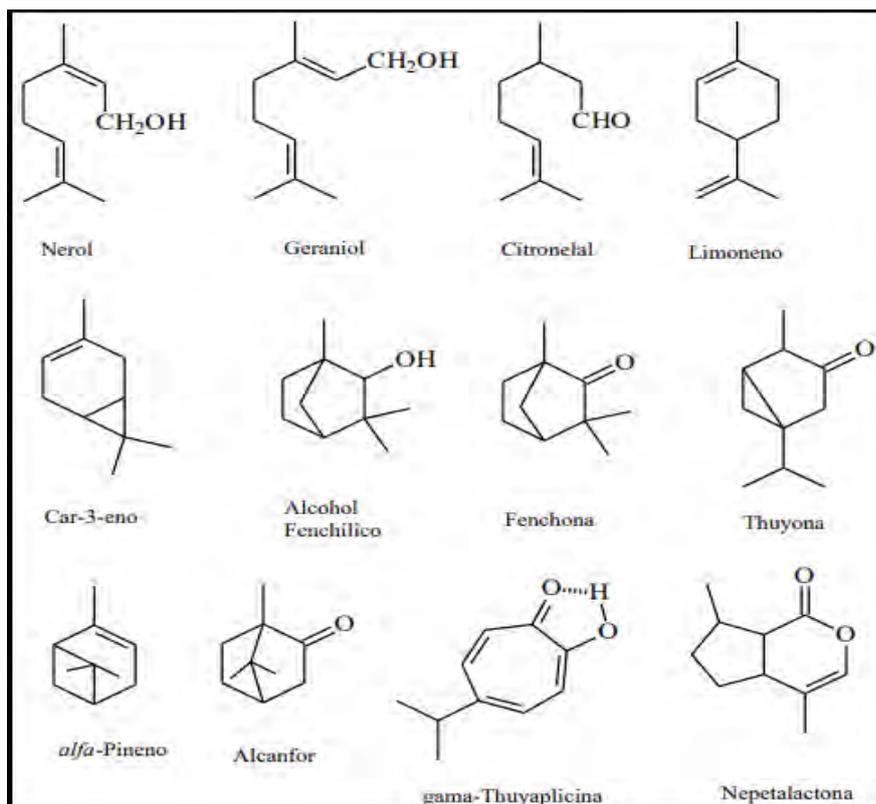


Figura N°3.-Monoterpenos de Aceites esenciales. <sup>30</sup>

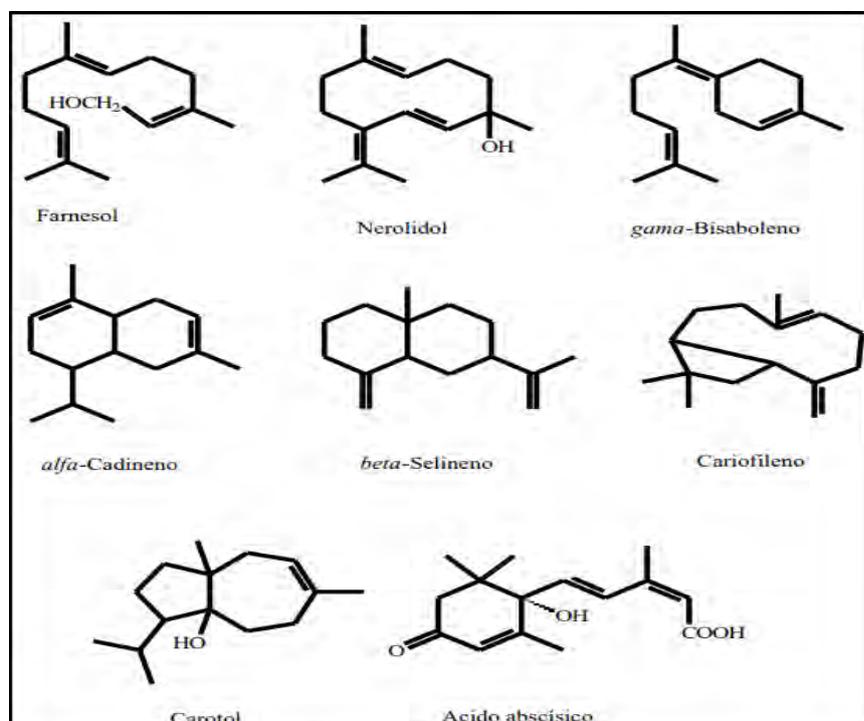


Figura N°4.-Sesquiterpenos de Aceites esenciales. <sup>30</sup>

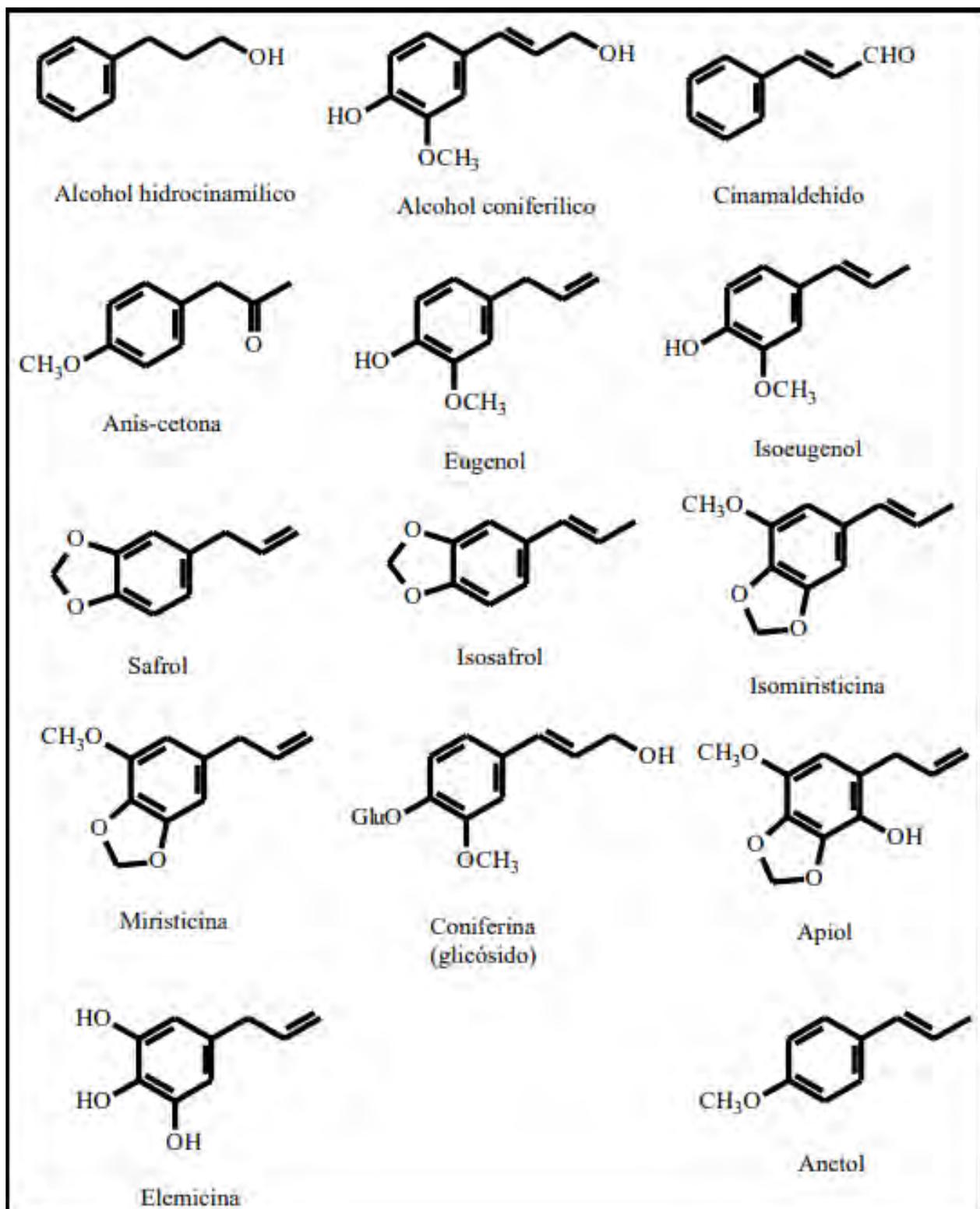


Figura N°5.-Fenilpropanos de Aceites esenciales.<sup>30</sup>

### **1.3.2- EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como: arrastre de vapor, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, extracción por fluidos supercríticos, entre otros métodos. Por ejemplo, el método de arrastre de vapor con trampa de clewenger se aplicó para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

#### **1.3.2.1.- EXTRACCIÓN MEDIANTE ARRASTRE DE VAPOR**

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal fresca es cortada en trozos pequeños, confinada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado mediante inyección de vapor directa, conocida como vapor de arrastre. Después, la esencia así arrastrada en estado gaseoso se condensa y al pasar a estado líquido, tiende a formar 2 fases, lo que facilitara la separación de los componentes aceitosos y acuosos, en este proceso cada componente genera su presión de vapor y estas se igualan facilitando el proceso de condensación. Esta técnica es muy utilizada porque no requiere tecnología sofisticada. <sup>(29)</sup>

### **1.3.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales se caracterizan por las propiedades organolépticas, físicas y químicas que poseen de manera particular, los cuales nos indican la calidad del aceite esencial obtenido. Por ejemplo, se miden parámetros organolépticos (olor, color, sabor), físicos (densidad) y químicos (índice de acidez), entre otros.

#### **1.3.3.1.-CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

Las características organolépticas son todas aquellas que podemos determinar a través del uso de nuestros sentidos. Se describe el olor, color, sabor y aspecto de los aceites obtenidos, puesto que estas características contribuyen a la definición de la calidad de los mismos. <sup>(30)</sup>

#### **1.3.3.2.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS**

Entre las características físicas de los aceites esenciales se destacan la densidad, el índice de refracción y el poder rotatorio. <sup>(4)</sup>

- Densidad. - La densidad es una magnitud referida a la cantidad de masa contenida en un determinado volumen, y puede utilizarse en términos

absolutos o relativos. Cabe resaltar que, la densidad absoluta es la densidad normal que conocemos. <sup>(31)</sup>

- Índice de refracción. -El índice de refracción es una medida que determina la reducción de la velocidad de la luz al propagarse por un medio homogéneo. De forma más precisa, el índice de refracción es el cambio de la fase por unidad de longitud, esto es, el número de onda en el medio será  $n$  veces más grande que el número de onda en el vacío.
- Índice de rotación óptica. -El índice de rotación óptica se determina mediante la polarimetría, una técnica no destructiva, rápida y reproducible. La polarimetría consiste en medir la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa. La rotación óptica viene determinada por la estructura molecular y la concentración de moléculas quirales. Por lo cual, un compuesto es considerado ópticamente activo si la luz linealmente polarizada sufre una rotación cuando pasa a través de una muestra de dicho compuesto. Cada sustancia ópticamente activa tiene su propia rotación específica. <sup>(32)</sup>
- Solubilidad. -la solubilidad es la máxima cantidad de soluto que se disolverá en una cantidad determinada de disolvente a una temperatura determinada, desde el punto de vista químico las sustancias serán solubles, ligeramente solubles, insolubles.

### **1.3.3.3.-CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS**

Las características químicas a destacar son el índice de acidez, índice de ésteres, índice de saponificación e índice de fenoles.

- Índice de acidez (IA) se encarga de medir el grado de hidrólisis de una grasa, es decir, cuantos ácidos grasos libres se obtienen por reacción de hidrólisis, debido a que la cantidad de ácidos grasos libres favorecen la oxidación de un producto, deteriorándolo. Por lo que, IA se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para neutralizar la acidez contenida en un gramo de aceite esencial. <sup>(33, 34)</sup>
- Índice de ésteres (IE) mide el grado de esterificación de ácidos grasos libres, en otras palabras, la cantidad de ésteres formados por reacción de grasa y alcoholes, dando lugar a la formación de enlaces éster. Por lo

tanto, el IE se define como el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para saponificar los ésteres contenidos en un gramo de aceite esencial. (33, 34)

- Índice de saponificación (IS) es un dato específico de cada grasa y aceite natural que da a conocer la proporción total de triglicéridos. Se basa en la reacción química de saponificación donde se obtienen como productos ácidos grasos (en medio ácido) o jabón (en medio básico) y glicerina como subproducto (en ambos medios). Por lo que, El IS es la cantidad, en mg, de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres y saponificar los ésteres presentes en 1,0 g de muestra. (33, 34)

Por otro lado, se realizó el análisis fitoquímico preliminar para el reconocimiento de metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial, mediante el uso de reacciones de determinación por la variación de color y formación de precipitado, por ejemplo: determinación de alcoholes mediante reacciones de precipitación con coloración amarilla, determinación de aldehídos y cetonas por formación de precipitado rojo, naranja; entre otras determinaciones. (26)

#### 1.4-LA CROMATOGRAFIA

La cromatografía es un método de separación físico basado en la diferencia de distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles (fase móvil y fase estacionaria). En el cual, las moléculas de soluto de la mezcla son retenidas en la fase estacionaria y arrastradas por la fase móvil. Por lo cual, si los componentes de la mezcla presentan diferentes afinidades por alguna de las fases, sus velocidades medias de avance a lo largo del sistema varían (Figura N°6).

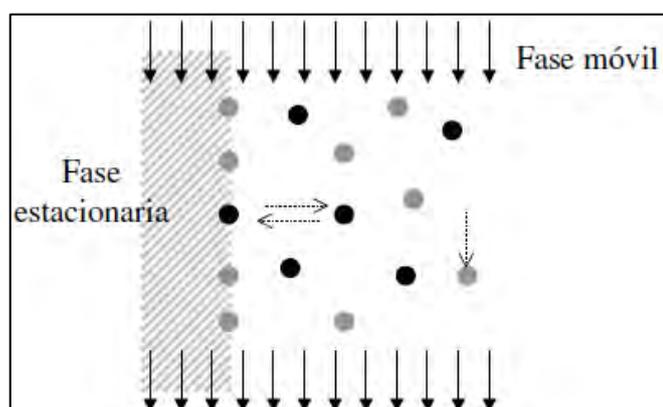


Figura N°6.-Fase móvil y Fase estacionaria en cromatografía. (35)

Por otro lado, la afinidad existente se determina los enlaces que presenta la mezcla (fuerzas de tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno o transferencia de carga). Además, los componentes que sean fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán más lentamente a lo largo de dicha fase que aquellos que se unen débilmente. Por lo tanto, la variación de movilidad en los componentes de la mezcla se distribuye en bandas discretas, y son analizadas de forma cualitativa o cuantitativa usando detectores adecuados.

En resumen, La cromatografía se caracteriza por ser una técnica extremadamente versátil, que permite la separación de mezclas como la purificación de productos, la determinación del grado de pureza de un compuesto, el seguimiento de reacciones, la detección y caracterización de compuestos. Cabe resaltar que, otra ventaja de este método es la pequeña cantidad de muestra que se usa. <sup>(35)</sup>

#### **1.4.1.- CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica que se caracteriza por tener una gran capacidad de separación y sensibilidad en el análisis de compuestos volátiles. En particular, esta técnica tiene la capacidad de separar una mezcla en estado gaseoso estableciendo sus límites de uso, en base a la estabilidad térmica de cada compuesto. Además, GC se usa para separar compuestos con un peso molecular debajo de 1000 y con una temperatura de 400°C.

El equipo de cromatografía de gases cuenta con una fuente de gas, sistema de inyección, horno, columna cromatográfica, sistema de detección y un sistema de registro. Cabe resaltar que, la naturaleza que tiene el gas usado en cromatografía de gases no influye el proceso de separación de la muestra, debido a que no influye en el proceso de sorción-desorción o partición que se realiza en la columna cromatográfica. La función del horno del equipo de cromatografía es mantener la columna del equipo termostatazada a una temperatura determinada.

La separación en GC requiere de una pequeña cantidad de muestra volátil o semi-volátil, la cual transporta la muestra al equipo mediante una corriente de gas inerte a altas temperaturas, en este proceso el dispositivo de inyección se

encarga de vaporizar la muestra e incorporarla a la corriente del gas portador que va hacia la columna. Posteriormente, la corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica, en este proceso comienza la separación de la mezcla mediante un mecanismo de partición, adsorción, o ambos. Después, la mezcla una vez separada pasa a intervalos discretos y por un sistema de detección adecuado.

El sistema de detección se encuentra en la salida de la columna cromatográfica, el detector tiene la capacidad de indicar la elución de un componente y proporcionar una señal proporcional a la cantidad del componente detectado de forma simultánea. Cabe resaltar que, el detector usado en cromatografía de gases es de tipo diferencial, es decir tiene la capacidad de distinguir cuando solo pasa por ahí el gas portador y responder cuando el gas portador se encuentra mezclado con una sustancia elucidada en la columna (Figura N°7).<sup>(36)</sup>

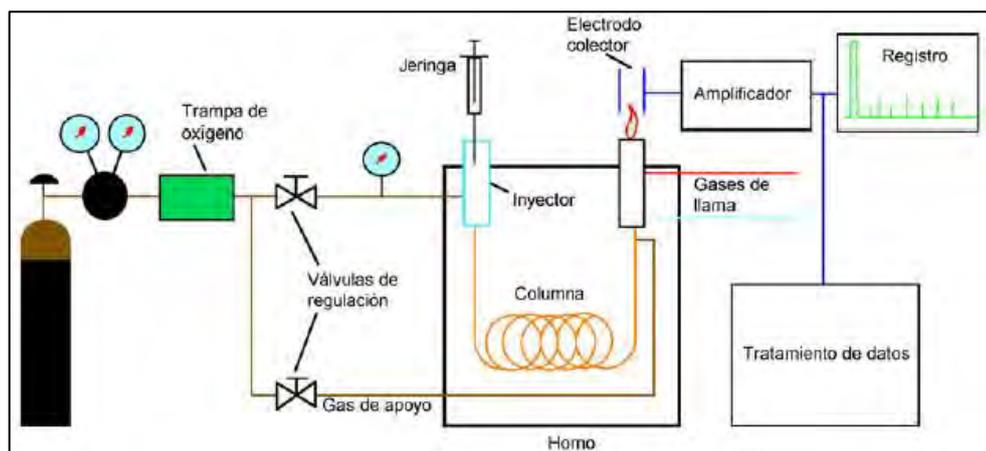


Figura N°7.- Esquema de cromatografía de gases (GC).<sup>36</sup>

Por otro lado, la espectrometría de masas (MS), es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, elucidar estructuras moleculares de compuestos orgánicos y determinar sus propiedades químicas, por si solo o en combinación con técnicas espectrofotométricas. La detección de compuestos con esta técnica, se caracteriza por que pequeñas cantidades de muestra nos permite obtener información importante, desde el peso molecular hasta la estructura de la muestra.<sup>(37, 38)</sup>

La espectrometría de masas se basa en la formación de iones a partir de la desintegración de moléculas que se encuentran en fase gaseosa mediante bombardeo de electrones en la cámara de ionización del equipo. Luego, las moléculas se rompen en una serie de fragmentos, siempre que una misma molécula se rompa en las mismas condiciones nos dará el mismo tipo y número de fragmentos y constituyen la fragmentación patrón. Es decir, en este proceso los núcleos atómicos se separan en función de su relación entre masa y carga ( $m/z$ ), gracias a este proceso se pueden conocer que es la muestra por comparación. <sup>(37, 38)</sup>

La intensidad relativa de los distintos picos, permite deducir la proporción en que cada componente se encuentra en la muestra. El pico del espectrograma que aparece con valor más elevado de  $m/z$  corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón nos permite determinar con rapidez y precisión la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula. <sup>(37, 38)</sup>

El pico mayor del espectrograma de masa se llama pico base. Normalmente la altura de este pico se toma como valor cien. Las intensidades de los demás picos se expresan en porcentajes de la intensidad del pico base. Por lo cual, el MS obtiene información sobre la presencia y abundancia de los diferentes iones. Además, estos iones son identificables en función a una determinada estructura química que es comparada con una base de datos. (Figura N°8) <sup>(37, 38)</sup>

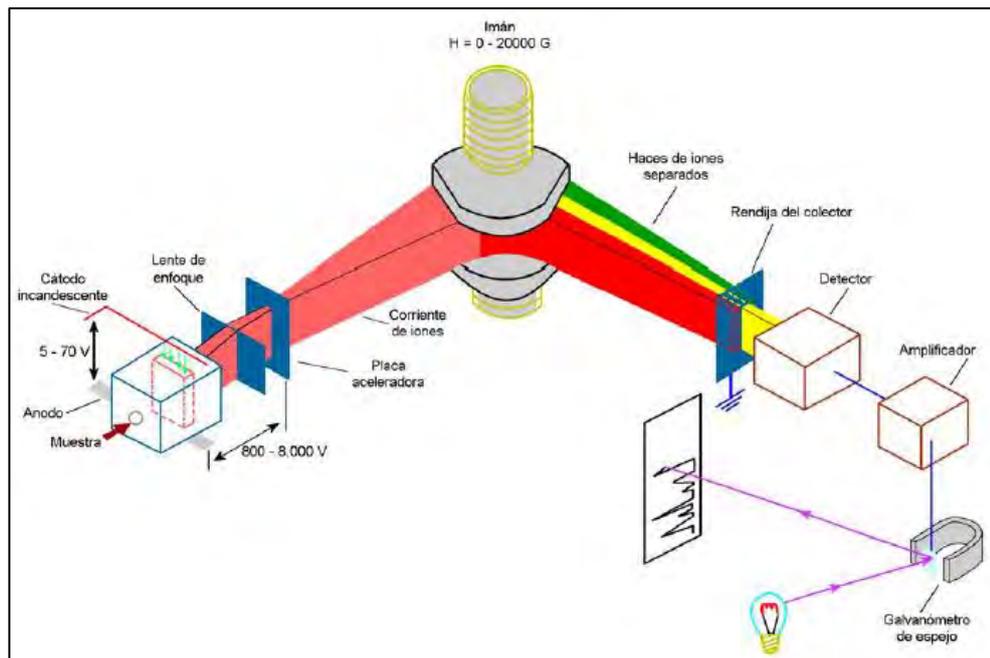


Figura N°8.- Esquema de espectrómetro de masas.<sup>38</sup>

El acoplamiento de estas dos técnicas GC y MS, requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. Aunque, el único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

Finalmente, la GC-MS hace que una mezcla de compuestos volátiles inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica. Luego, obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas, en el cual cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su espectro de masas correspondientes. (38, 39)

En resumen, GC es una técnica de separación muy versátil que tiene la capacidad de separar mezclas complejas. Esta técnica acoplada a MS como sistema de detección, aumenta la capacidad de detección de moléculas de forma muy eficaz por la sensibilidad que presenta. Por lo cual, hace de la GC-MS un gran equipo de identificación de moléculas. (36, 38, 39)

## **1.5.- BACTERIAS**

### **1.5.1.- ESTRUCTURA**

Estructuralmente, las bacterias son células procariotas de 0,1 o 0,2 micrómetros de diámetro, carentes de núcleo celular y organelas. El citoplasma bacteriano contiene el ADN cromosómico, ácido ribonucleico mensajero (ARN<sub>m</sub>), ribosomas, proteínas y metabolitos. Cabe mencionar, que el ácido desoxirribonucleico (ADN) de estas, es una molécula única circular y se encuentra dispersa en el citoplasma en una zona denominada nucleoide. La célula también tiene plásmidos que son pequeñas moléculas extra cromosómicas que proporcionan ventaja selectiva (resistencia) frente a antibióticos.<sup>(40)</sup>

Además, poseen ribosomas 70s que se encargan de la síntesis proteica, estos ribosomas están conformados por dos subunidades ribosómicas 30s y 50s. Debido a la ausencia de carioteca, el proceso de transcripción y traducción se encuentran acoplados, es decir, a medida que se sintetiza el ARNm es traducido por los ribosomas que se acoplan a él.

La clasificación bacteriana se puede llevar a cabo desde el punto de vista macroscópico y microscópico:

Desde el punto de vista macroscópico, se observa que medios de crecimiento son favorables para una bacteria, la formación de colonias incluyendo sus características propias (color, olor, forma, tamaño), también, su capacidad de resistencia a antibióticos, capacidad de fermentar azúcares, lisar eritrocitos e hidrolizar lípidos.<sup>(40)</sup>

Por otro lado, el punto de vista microscópico resalta la forma que tiene una bacteria (coco, bacilo, curvo, espiral), si llega a formar agregados (diplococos y cúmulos en forma de racimo) y la capacidad de captar la tinción de Gram. La prueba de tinción de Gram permite diferenciar si una bacteria es grampositiva o gramnegativa si presentan coloración morada (el colorante cristal violeta es retenido por la gruesa capa de péptidoglucanos) o rojas (el colorante no es atrapado por la capa de péptidoglucanos y adquieren la coloración de safranina).

La membrana citoplasmática de procariontes es similar a la de eucariotes, contiene proteínas de transporte, bombas de iones, pero no contiene colesterol. Asimismo, cumple la función de transporte de sustancias, producción de energía. La cara interna de la membrana contiene filamentos proteicos tipo actina que ayudan a dar forma a la bacteria y la formación de tabique en división celular.

Externamente, rodeando la membrana citoplasmática las bacterias poseen una pared celular, hecha a base de peptidoglucano (mureína), que favorece su existencia en ambientes hostiles. La mureína proporciona rigidez, por lo cual, da forma a cada célula bacteriana. Si la capa de peptidoglucanos es delgada requiere de una membrana externa. La pared de peptidoglucanos es vital para la existencia de las bacterias, ya que su degradación (mediante lisozimas) provocaría la formación de un protoplasto dando lugar a una lisis celular por la diferencia en la presión osmótica. <sup>(40)</sup>

Las bacterias con una gruesa capa de péptidoglucanos (mureína) están acompañados de ácidos teicoicos esenciales en viabilidad celular, estos ácidos son considerados factores de virulencia. Debido a que, en medio intercelular de sus huéspedes desencadenan respuestas inmunitarias semejantes a endotoxinas.

Por otra parte, las bacterias con una delgada capa de péptidoglucanos poseen doble membrana, una interna y otra externa, también un espacio periplásmico caracterizado por contener enzimas. Esta pared se encuentra atravesada por sistemas de secreción, los cuales liberan y captan distintas sustancias que contribuyen la adherencia bacteriana y proliferación intracelular, incrementando los factores de virulencia.

La membrana externa es una barrera impermeable para moléculas de gran tamaño como la lisozima y moléculas hidrófobas, por ejemplo, algunos antimicrobianos. Asimismo, recalcar que la zona externa de esta membrana está formada por lipopolisacáridos (LPS) los cuales actúan como endotoxinas y se desprenden en el medio de cultivo o hospedador produciendo fiebre y pueden provocar shock. <sup>(40)</sup>

Algunas bacterias (grampositivas o gramnegativas) se encuentran rodeadas por unas capas laxas de proteínas o polisacáridos denominadas cápsulas, las cuales no intervienen en su crecimiento, pero están relacionadas en su sobrevivencia. Debido a que, es un poco antigénica y antifagocítica. Además, actúa frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como detergentes, facilitando su adherencia a superficies. <sup>(40)</sup>

#### **1.5.1.2.-SÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO DE LA PARED CELULAR**

El componente principal de la pared celular es el péptidoglicano, este compuesto se forma por una sucesión lineal de un disacárido formado por N-acetil glucosamina (NAG) enlazado con N-acetil muerina (NAM), mediante enlace glucosídico beta 1-4. Además, recordar que la NAM está unida a cuatro aminoácidos (L-alanina, D-glutamato, aminoácido diamínico: lisina, ácido diamino-pimélico o ácido diamino-butírico, D-Alanina) mediante enlace peptídico en el carbono tres.

El disacárido formado por NAG y NAM es el monómero del peptidoglicano, este disacárido forma una cadena unida por enlaces beta 1-4. La estabilidad de las cadenas del péptidoglicano se debe a que, los aminoácidos de una cadena formada se unen con otra cadena, mediante la formación de enlaces peptídicos entre aminoácidos de cadenas distintas. Mencionar que, el entrecruzamiento con el péptido se forma entre la amina libre del aminoácido tipo diamino y la D-alanina situada en la cuarta posición de otra cadena. La forma precursora del péptido posee una D-alanina adicional que se libera durante la formación del entrecruzamiento, es decir, el precursor presenta 5 aminoácidos. <sup>(40)</sup>

La síntesis del polímero de peptidoglicano es un proceso que se lleva en cuatro pasos. Primero, moléculas precursoras se sintetizan en el citoplasma bacteriano. Por un lado, se sintetiza el NAM inactivo y el NAG inactivo, ambos son activados mediante el nucleótido uridin difosfato (UDP), el tetrapéptido que se observa en el monómero (disacárido) es sintetizado en el interior de la célula y también se une al NAM. En resumen, en un primer paso se obtienen NAG, NAM acompañado de tetrapeptidos en estado activo, todo esto en el citoplasma bacteriano. <sup>(40)</sup>

Posteriormente, los precursores formados son transferidos a un transportador lipídico ubicado en la membrana citoplasmática, conocido como bactoprenol. El primero en llegar es el UDP-NAM que se une con el bactoprenol, liberando de esta manera el monofosfato uridina (UMP). Luego, llega el UDP-NAG por acción de una transferasa, liberando el NAG para que forme enlace glucosídico con NAM, de esta manera, se obtiene el disacárido monómero de peptidoglicano (NAM-NAG) unido con el bactoprenol. <sup>(40)</sup>

Luego, para que el monómero disacárido se encuentre en la parte externa, el bactoprenol por acción de una flipasa, sufre un proceso de flip-flop para ubicarse en la monocapa exterior de la membrana celular. El proceso descrito es llevado a cabo varias veces para obtener numerosos disacáridos por fuera de la membrana.

El disacárido se une a una cadena polipeptídica mediante la acción de unas enzimas conocidas como transglucosilasas que utilizan como fuente de energía para la reacción un enlace pirofosfato formado entre el disacárido y el bactoprenol. El pirofosfato de bactoprenol se transforma de nuevo en fosfato de bactoprenol y se recicla. Mencionar que, el proceso de reciclaje del uso de bactoprenol puede ser inhibido. <sup>(40)</sup>

A continuación, esos varios disacáridos por fuera de la membrana se polimerizan formando una cadena de disacáridos. Esta larga cadena que contiene aminoácidos en el carbono 3 del NAM, se entrecruza con otra cadena adyacente mediante la formación de puentes peptídicos. El proceso de entrecruzamiento es conocido como transpeptidación, el cual es catalizado por transpeptidasas unidas a la membrana. Por otro lado, unas enzimas D-carboxipeptidasas se encargan de limitar el grado de entrecruzamiento al eliminar las D-alaninas terminales extra.

Las transpeptidasas y carboxipeptidasas son conocidas como proteínas de unión de la penicilina (PBP). Resaltar que, la extensión (polimerización) y entrecruzamiento de los péptidoglicanos son necesarios para el crecimiento y a división celular debido a que el peptidoglucano está sometido a unos procesos de síntesis y degradación constantes. Por otro lado, las autolisinas son importantes en la determinación de la forma de la bacteria. La inhibición de la

síntesis o el entrecruzamiento del peptidoglucano no detiene a las autolisinas, sino que su acción debilita la malla y la estructura bacteriana hasta ocasionar la lisis y la muerte celulares. <sup>(40)</sup>

### **1.5.2.-DIVISIÓN CELULAR**

El proceso de división celular en bacterias (células procariotas), es sencillo comparado con la división celular en células eucariotas. El proceso de división celular en bacterias es conocido como fisión binaria. La fisión binaria inicia con replicación del cromosoma bacteriano. Asimismo, la producción de dos células hijas requiere los componentes de la pared celular aumenten y se amplíe el tamaño de la misma, seguido de la formación de un tabique que dividirá las bacterias hijas en dos células.

Este tabique está compuesto por dos membranas separadas por dos capas de peptidoglucano. La formación del tabique comienza en la zona media de la célula, en un punto definido por la presencia de complejos proteicos unidos a un anillo proteico filamentoso que tapiza el interior de la membrana citoplásmica. El tabique crece a partir de zonas opuestas hacia el centro de la célula y provoca la separación de las células hijas. Este proceso requiere la presencia de unas transpeptidasas especiales (PBP) y otras enzimas. Una separación incompleta del tabique puede hacer que las bacterias permanezcan unidas y formen cadenas como vemos en estreptococos o adquirieran forma de racimos por ejemplo los estafilococos. <sup>(40)</sup>

### **1.5.3.- AGENTES ANTIBACTERIANOS**

Se denomina agentes antibacterianos a aquellos medicamentos que tienen la capacidad de matar o detener el crecimiento de bacterias. Este efecto se debe a la capacidad que tienen de inhibir la síntesis de: pared celular, proteínas o ácidos nucleicos.

La inhibición de síntesis de la pared celular bacteriana es el mecanismo más común para los antibióticos, entre ellos se conocen la vancomicina, la daptomicina, la bacitracina, la isoniazida, el etambutol, la cicloserina y la etionamida. <sup>(40)</sup>

### **1.5.3.1.- ANTIBIÓTICOS B-LACTAMICOS**

En la síntesis de peptidoglicanos, uno de los procesos más importantes es la transpeptidación o entrecruzamiento, el cual da estabilidad a la unión de dos cadenas adyacentes de polímeros de NAM-NAG. La construcción de las cadenas y el entrecruzamiento están catalizadas por las enzimas transpeptidasas, transglucosilasas, carboxipeptidasas también la denominación de proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, del inglés penicillin-binding proteins), porque son las dianas de los antibióticos b-lactámicos. Cuando las bacterias en crecimiento quedan expuestas a estos antibióticos, el antibiótico en cuestión se une a PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano. Esto, a su vez, activa autolisinas que degradan la pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana. Así, los antibióticos b-lactámicos actúan como agentes bactericidas. <sup>(40)</sup>

#### **1.5.3.1.1.- CEFALOSPORINAS Y CEFAMICINAS**

Las cefalosporinas son antibióticos B-lactámicos derivados del ácido 7-aminocefalosporánico. Por otro lado, las cefamicinas están estrechamente relacionadas con las cefalosporinas, excepto que contienen oxígeno en lugar de azufre en el anillo dihidrotiazínico, lo que las hace más estables a la hidrólisis por las B-lactamasas.

Las cefalosporinas y las cefamicinas tienen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas; sin embargo, tienen un espectro antibacteriano más amplio, son resistentes a muchas B-lactamasas. Un agente antibacteriano de esta clase es la cefalexina. <sup>(40)</sup>

#### **1.5.3.1.2.- GLUCOPÉPTIDOS**

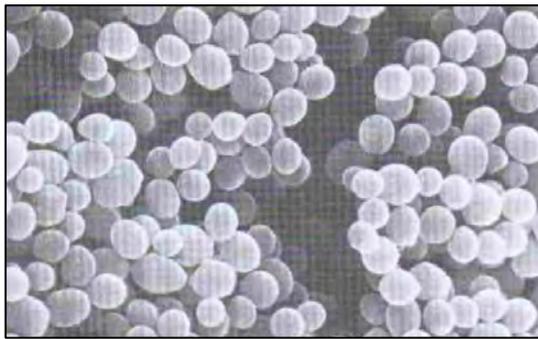
La vancomicina es un glucopéptido complejo que desestructura la síntesis de peptidoglucano de la pared celular en las bacterias grampositivas en crecimiento. La vancomicina interactúa con los extremos D-alanina-D-alanina de las cadenas laterales del pentapéptido, con lo que interfiere estéricamente en la formación de los puentes entre las cadenas de peptidoglucano.

La vancomicina es inactiva frente a bacterias gramnegativas, porque la molécula es demasiado grande y no puede pasar a través de los poros de la membrana externa y alcanzar el sitio diana del peptidoglucano. <sup>(40)</sup>

#### 1.5.4.-BACTERIAS DEL GENERO *Staphylococcus*

Los cocos grampositivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas.

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que estos cocos grampositivos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas (Figura N°9). Sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. <sup>(40)</sup>



**Figura N°9.-** Bacterias *Staphylococcus* en forma de racimos.<sup>28</sup>

Generalmente los estafilococos tienen un diámetro de entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$ , son inmóviles y capaces de crecer en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbicamente en presencia de una elevada concentración de sal y a temperaturas entre 18-40°C. En la actualidad, el género comprende 45 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. Cabe mencionar que, esta familia se caracteriza por incluir bacterias patógenas de importancia clínica. <sup>(40)</sup>

##### 1.5.4.1.-TAXONOMÍA

El Genero *Staphylococcus* sistemáticamente se ordena de la siguiente manera:

Reino: *Eubacteria*.

Phylum: *Firmicutes*.

Clase: *Bacilli*.

Orden: *Bacillales*.

Familia: *Staphylococcaceae*.

Género: *Staphylococcus*. (Rosenbach, 1884)

#### 1.5.4.2.- ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS *Staphylococcus*

La cápsula es la capa más externa de la pared celular estafilocócica se puede recubrir de una cápsula de polisacárido. La cápsula protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis de estos microorganismos por los leucocitos polimorfonucleares (PMN).<sup>(40)</sup>

La mayor parte de los estafilococos producen una biopelícula hidrosoluble laxa (capa de limo o biopelícula) formada por monosacáridos, proteínas y pequeños péptidos en una cantidad que depende de factores genéticos y de las condiciones de crecimiento. Esta sustancia extracelular une las bacterias a tejidos y cuerpos extraños, como catéteres, injertos, prótesis valvulares y articulares y derivaciones. Esta propiedad es particularmente importante para la supervivencia de los estafilococos coagulasa-negativos, los cuales son relativamente avirulentos.

Por otro lado, se tiene el peptidoglucano que representa la mitad de la pared celular en peso, el peptidoglucano está formado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de NAM y NAG. Las cadenas laterales de oligopéptidos están unidas a las subunidades de NAM y se entrecruzan por medio de puentes peptídicos. Por ejemplo, las cadenas de glucanos de *S. aureus* se entrecruzan mediante puentes de pentaglicina unidos a L-lisina en una cadena oligopeptídica y a la D-alanina en la cadena adyacente.

La capa de peptidoglucano en microorganismos grampositivos es gruesa lo que confiere una mayor rigidez a la pared celular. Las enzimas que catalizan la construcción de la capa de peptidoglucano se llaman proteínas ligadoras de penicilina porque son las dianas para las penicilinas y otros antibióticos β-lactámicos.<sup>(40)</sup>

Por otro lado, el ácido teicoico, es un fosfolípido cuya función es unirse de forma covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de peptidoglucano, a través de una unión lipofílica a la membrana citoplásmica. De esta manera, es posible la unión de los *Staphylococcus* a superficies mucosas por su específica a la fibronectina.<sup>(40)</sup>

La proteína A se encarga de unirse a la capa de peptidoglucano o a la membrana citoplásmica y formar una unión especial con el receptor hierro (Fe) de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG4, lo que previene de forma eficaz la eliminación inmunitaria del microorganismo mediada por anticuerpos, como mecanismo de protección.<sup>(41)</sup>

Según algunos autores, las partes más importantes de una bacteria de *Staphylococcus* son la capsula, el ácido teicoico y la proteína A que presentan (Figura N°10). Debido a que, estas definen las funciones que realizan estos microorganismos.<sup>(41)</sup>

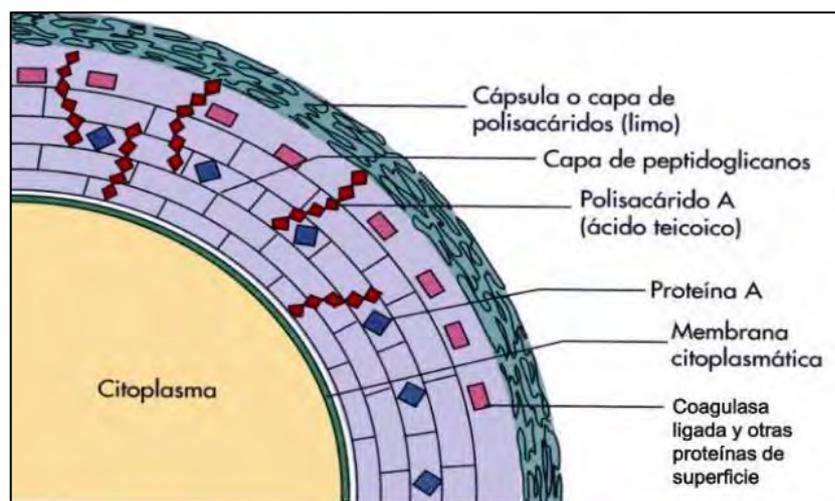


Figura N°10.-Estructura pared celular *Staphylococcus*.<sup>43</sup>

#### 1.5.4.3.-ESPECIES DE IMPORTANCIA CLÍNICA

Actualmente, *Staphylococcus* tiene 40 especies y 24 sub-especies a nivel mundial. Entre ellas se han encontrado 3 especies de importancia clínica, por la diversidad de enfermedades que producen, estas son:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus saprophyticus*<sup>(42)</sup>

*Staphylococcus aureus* pertenece a la flora normal de la piel y mucosa, exhibe beta hemólisis alrededor de sus colonias y su patogenicidad está asociada a la proteína A que posee. Las colonias de *S. aureus* se caracterizan por la coloración amarillenta que presenta, debido a los pigmentos carotenoides que se forman

durante el crecimiento de las bacterias en la sangre. Además, se caracteriza por ser el único *Staphylococcus* que tiene la capacidad de transformar el fibrinógeno en fibrina formando coágulos, siendo coagulasa positivo.

*Staphylococcus aureus* es considerada una bacteria muy patógena, su patogenicidad depende de la cápsula celular que posee, de sus enzimas y de sus toxinas, sin la mediación de células presentadoras de antígeno, resultando en la liberación de citoquinas. Por lo cual, este microorganismo produce efectos sistémicos como fiebre, hipotensión, lesiones en piel, shock, fallo multi-orgánico y muerte.<sup>(43)</sup>

Por otro lado, *S. epidermidis* es un integrante normal de la flora en superficie corporal. Esta bacteria se caracteriza por ser coagulasa negativa, no presentar hemólisis, y ser sensible a la novobiocina.<sup>(41)</sup>

La especie *Staphylococcus epidermidis*, se considera una causante de bacteriemia, endocarditis sobre válvula nativa o válvula protésica, osteomielitis, infección de tracto urinario, meningitis en pacientes portadores de válvulas de derivación de líquido cefalorraquídeo (LCR), peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal e infecciones de prótesis articulares y de catéteres. Por otro lado, la especie *Staphylococcus saprophyticus* es considerado el agente causal más frecuente de infección urinaria no complicada en mujeres jóvenes con actividad sexual.<sup>(43)</sup>

#### **1.5.4.4.-ENFERMEDADES RELACIONADAS A *S. aureus* Y *S. epidermidis***

Aunque, *S. aureus* es una bacteria que se encuentra en la flora normal del ser humano que habita en la piel y cavidad nasal se considera la especie más virulenta entre todas las existentes. Debido a que, produce una amplia gama de enfermedades. Por ejemplo, impétigo, absesos y celulitis, intoxicación alimentaria, y en menor frecuencia produce neumonía, endocarditis, osteomielitis y síndrome del shock toxico (Figura N°11).

*S. epidermidis* puede producir flebitis al colonizar catéteres intravenosos en pacientes hospitalarios, por otro lado, si la colonización se produce en válvulas cardiacas se produce endocarditis precoz y tardia. Eventualmente, produce bacteremia y sepsis.<sup>(41)</sup>



Figura N°11.- Síndrome de shock tóxico (Enfermedad producida por *S. aureus*).<sup>40</sup>

### 1.5.5.-INHIBICIÓN BACTERIANA

Las bacterias patógenas poseen sensibilidad a los agentes antimicrobianos, cuando el bactericida no afecta el proceso de infección, se define a la bacteria como resistente a dicho antimicrobiano. Gracias a la sensibilidad que tienen las bacterias los bactericidas se clasifican como: compuestos de amplio espectro o espectro reducido. Los bactericidas de espectro reducido afectan a un conjunto determinado de bacterias y los de amplio espectro actúan contra dos o más conjuntos de bacterias.<sup>(44)</sup>

### 1.5.6.-ANTIBIOGRAMA

El antibiograma disco-placa es una técnica usada para determinar la sensibilidad de bacterias frente a diversos antibióticos, esta técnica está basada en la investigación de Bauer, Kirby y colaboradores. Este método consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados de antibióticos. El antibiótico que se encuentra en el disco impregnado se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar, posteriormente el antibiótico se desplaza radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración, mientras que la placa petri se incuba de 18 a 24 horas.

Los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición después de la incubación. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se

aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Cabe resaltar que, el método disco-placa no permite una lectura directa del valor de la CMI. Posteriormente, se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

Para determinar la CMI de una cepa, se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).<sup>(45)</sup>

## **CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1.- MATERIALES**

#### **2.1.1.- MUESTRA VEGETAL**

Especie vegetal *Senecio saxicola* Wedd. "Maycha" (parte aérea: flores, hojas, tallos tiernos) procedentes del Distrito de Ocongate.

#### **2.1.2.- MATERIAL BIOLÓGICO**

- Cepa de *Staphylococcus aureus*.
- Cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

#### **2.1.3.-MATERIALES, INSTRUMENTOS Y EQUIPOS**

##### **MATERIALES DE CAMPO**

- Cámara fotográfica.
- Cinta de embalaje.
- Cuaderno de campo.
- Etanol al 70%.
- Lapiceros.
- Papel kraft.
- Plumón indeleble.
- Segaderas.
- Tijeras para podar.

## MATERIALES DE LABORATORIO

- Algodón.
- Anillos para soporte universal.
- Asa de kohle.
- Asa de siembra.
- Baguetas.
- Barbijo.
- Bureta.
- Capilares.
- Desecador.
- Embudos de vidrio.
- Erlenmeyer de 100-200 mL.
- Frascos color ambar 10-20 mL.
- Jeringas 10 mL.
- Goteros.
- Gradilla.
- Guantes.
- Matraces de 100-500 mL.
- Mechero bunsen.
- Micropipetas.
- Nueces para soporte universal.
- Papel filtro marca Whatman, grado 3.
- Papel filtro.
- Papel kraft 70 x 100 cm.
- Picnómetro de 10 mL.
- Pinzas.
- Pipetas graduadas de 1.5 -10 mL.
- Placa Petri 100 X 15 mm.
- Probetas de 25-100 mL.
- Soporte universal.
- Termómetro de 100°C.
- Tubos de ensayo.

- Vaso de precipitados de 50-250 mL.
- Viales 1-20 mL.

## **INSTRUMENTOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO**

- Balanza analítica marca Swiss Made, modelo LX220A.
- Equipo de hidrodeshilacion de tipo Clevenger Movilab.
- Estufa marca Thermo Scientific, modelo OGS 100.
- Baño maría 0-100°C marca Ovan, modelo BHM5E.
- Manta calefactora 50-370°C marca Nahita Serie 655.
- Centrifuga de 1500-4500 r.p.m. marca Powerspin, modelo DX UNC-C8724.
- Refractómetro ABBE marca OPTIKA, modelo 2WAJ.
- Polarímetro marca Rudolph research analytical, modelo Autoplo 1.
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas marca Thermo Scientific, modelo Trace 1310.
- Autoclave de capacidad 16 L, marca Numak, modelo LDZM-80KCS.
- Horno Pasteur marca Dalvo modelo TDM/6.
- Refrigeradora marca Samsung, modelo RT29K5710S8.

## **REACTIVOS**

- Acetato de etilo Q.P. EMSURE®
- Acetona Q.P. EMPARTA®
- Ácido clorhídrico 5N Combi-Titrisol®
- Ácido fosfórico 99% EMSURE®
- Ácido sulfúrico 95-99% EMPARTA®
- Agar Mueller-Hinton MERCK®
- Agua destilada.
- Carbonato de sodio anhidro EMSURE®
- Cefalexina Normon®
- Cepas estándar de *S. aureus* y *S. epidermidis*.
- Cloroformo Q.P. EMPARTA®
- Cloruro férrico anhidro MERCK®
- Etanol 96% EMPROVE®

- Etanol absoluto EMPARTA®
- Éter etílico Q.P. EMSURE®
- Fenolftaleína
- Hidróxido de potasio en lentejas EMPROVE®
- Hidróxido de sodio en lentejas EMSURE®
- Metanol Q.P. EMPARTA®
- n –heptano Q.P EMSURE®
- Permanganato de potasio anhidro EMPLURA®
- Reactivo de Brady.

### **MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar Muller-Hilton.
- Agar Manitol salado.

### **ANTIBIÓTICOS DE CONTROL**

- Vancomicina 30 µg.
- Cefalexina 30 µg.

## **2.2.- METODOS**

### **2.2.1.- TIPO DE INVESTIGACIÓN**

La investigación es del tipo descriptivo y experimental.

Describe, a través de métodos y técnicas de laboratorio las características fisicoquímicas más comunes y la composición química del aceite esencial por el método instrumental de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de fitoquímica de la Escuela profesional de Química.

Experimental, debido a que a través de pruebas microbiológicas se determinó la capacidad inhibitoria del aceite esencial contra *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*. Las pruebas experimentales se desarrollaron en el Laboratorio de microbiología de la Escuela Profesional de Biología.

## 2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### A. Diseño experimental para evaluar el ensayo de la actividad antibacteriana “*in vitro*”.

Para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola*, se siguió el siguiente diseño experimental con grupo de control de la siguiente manera:

**Tabla 1- Actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* (St16447) y *S. aureus* (M5-7).**

Grupo	Estimulo	Observación.
G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
G <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>7</sub>	X <sub>7</sub>	O <sub>7</sub>
G <sub>8</sub>	X <sub>8</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>9</sub>	X <sub>9</sub>	O <sub>9</sub>
G <sub>10</sub>	X <sub>10</sub>	O <sub>10</sub>
G <sub>11</sub>	X <sub>11</sub>	O <sub>11</sub>
G <sub>12</sub>	X <sub>12</sub>	O <sub>12</sub>
G <sub>13</sub>	X <sub>13</sub>	O <sub>13</sub>
G <sub>14</sub>	X <sub>14</sub>	O <sub>14</sub>

#### Dónde:

- G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>,..., G<sub>14</sub>: Cepas aisladas tanto de *S. epidermidis* como *S. aureus* sembrados en placa Petri por triplicado.
- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>,..., X<sub>12</sub>: Son las diferentes concentraciones (1, 5, 3...y 100 ug/mL) del aceite esencial de *S. saxicola wedd.*
- X<sub>13</sub>: Concentración del antibiótico Cefalexina (30 ug/mL)
- X<sub>14</sub>: Concentración del antibiótico Vancomicina (30 ug/mL).
- O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>,..., O<sub>12</sub>: observación y medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el aceite esencial de *S. saxicola*.
- O<sub>13</sub>: observación y medición de los halos de inhibición producidos por el antibiótico Cefalexina.
- O<sub>14</sub>: observación y medición de los halos de inhibición producidos por el antibiótico Vancomicina.

### 2.2.3.- PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.

El procedimiento metodológico se llevó a cabo de acuerdo al siguiente diagrama (Figura N°12):

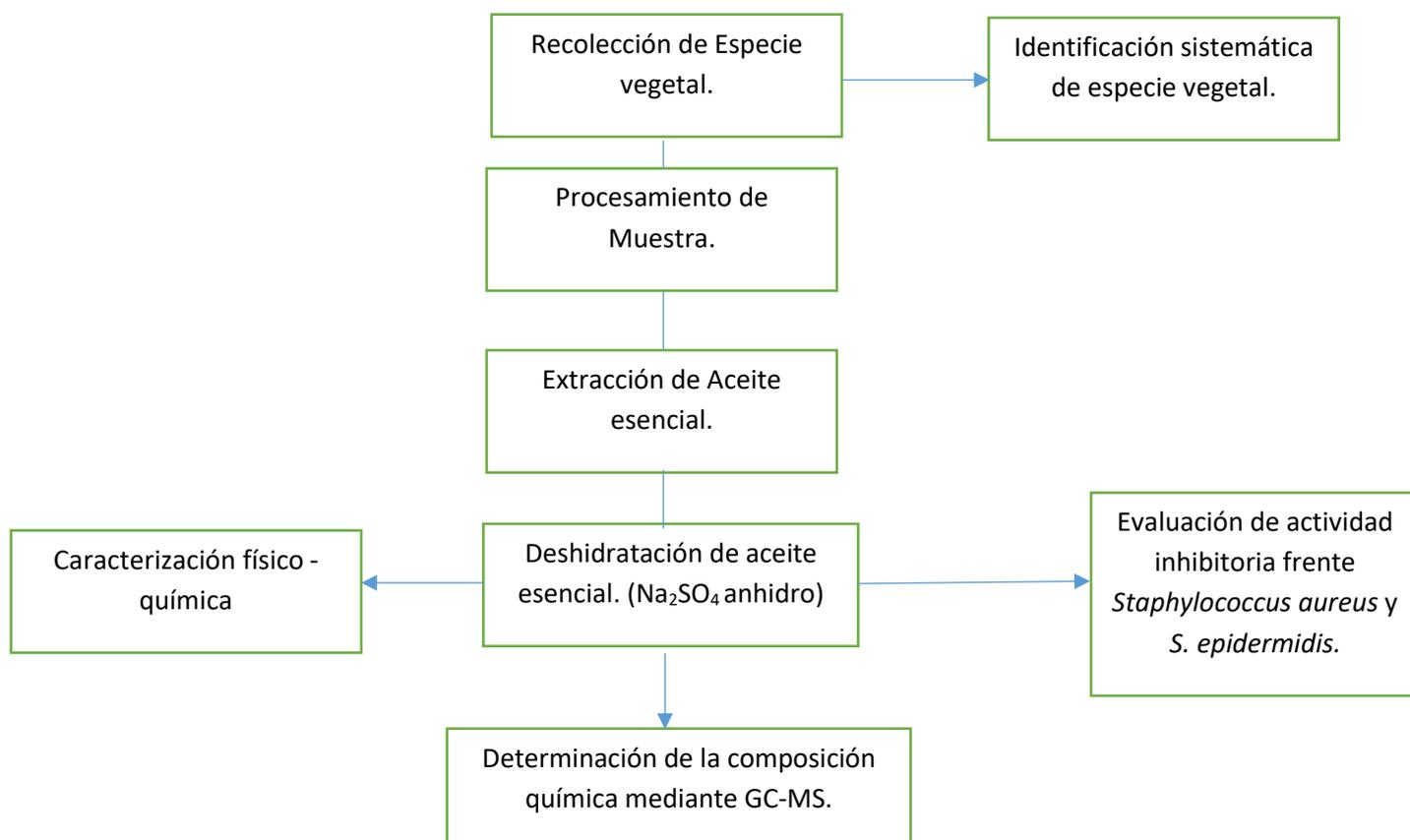


Figura N° 12.- Diagrama de flujo del trabajo experimental

### 2.2.4.-RECOLECCION Y PREPARACIÓN DE ESPECIE *S. saxicola*

La especie vegetal *S. saxicola* se recolecta en el mes de agosto, posterior a su etapa de floración (mayo-julio) en el Abra de Pirhuayani, parte más alta del valle de Ocongate, parte de la ruta turística del Ausangate, que se ubica en el Distrito de Ocongate (Figura N° 13), Provincia de Quispicanchis, Región del Cusco. Ubicado en el kilómetro 93 del corredor vial Interoceánico Sur. Tramo II en el Distrito de Ocongate a 4725 m.s.n.m. Las muestras vegetales fueron recolectadas de zonas áridas y pedregosas en su estado silvestre, de las cuales se recolectaron las partes aéreas sanas que no presenten daño. Las muestras recolectadas se colocaron en bolsas de papel Kraff, libre de impurezas, restos de otras especies vegetales y tierra, transportándose a Laboratorio para su procesamiento y selección.

Previamente a la recolección, se determinó que la especie vegetal recolectada sea una especie aromática. La forma más práctica para reconocer si una especie vegetal

posee aceite esencial es frotar las hojas del material vegetal. Si se desprende líquido aromático la especie vegetal posee aceite esencial. (46)

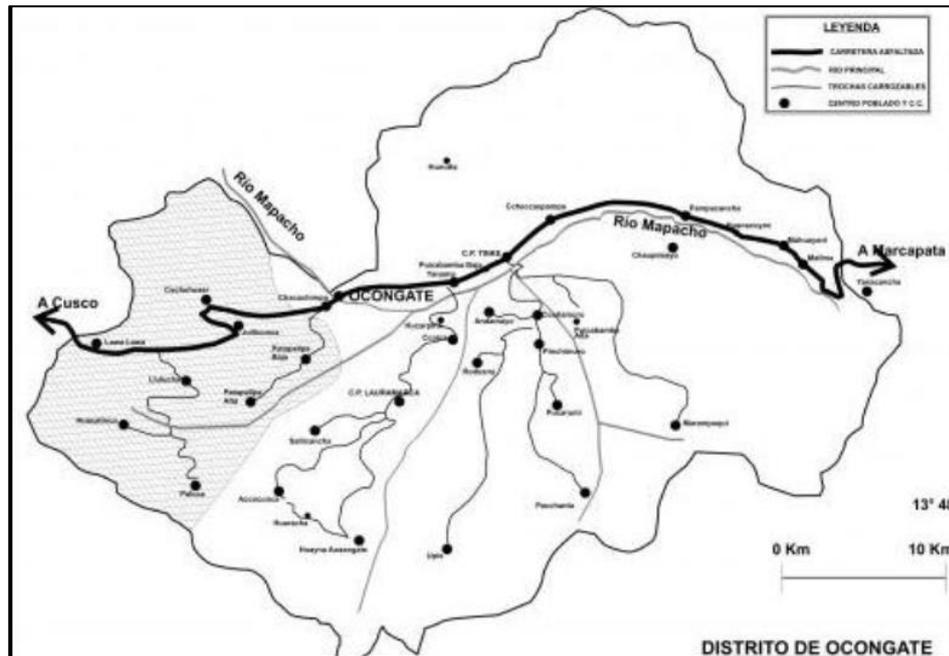


Figura N°13.- Mapa del Distrito de Ocongate. <sup>2</sup>

El material vegetal recolectado fue limpiado y seleccionado, para la obtención de una muestra homogénea libre de contaminantes y en buen estado. Posteriormente, se seleccionó las hojas, talluelos, tallos tiernos y flores de *S. saxicola* en buen estado (parte aérea), las partes seleccionadas se trozaron y trasvasaron al equipo de hidrodestilación por trampa de Clevenger para la obtención de aceites esenciales. (46)

### 2.2.5.-OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La destilación por arrastre de vapor se usa para separar el aceite aromático que contienen las especies vegetales, la técnica se fundamenta en la igualdad de presiones generadas (la presión del vapor de agua se iguala con la presión de vapor del aceite) y salen juntos al alcanzar un estado de equilibrio, lo cual permite su extracción.

#### Procedimiento:

Se colocó 125 g de la especie vegetal en el equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger, usando 1400 mL de agua. Cuyo vapor arrastra el aceite esencial de las plantas. Luego de la destilación, el aceite esencial se recolecto en la trampa de

Clevenger como mezcla aceite-agua, donde fue separado por su diferencia de densidades, encontrándose el aceite en la parte superior por ser inmisible. Mediante pipetas Pasteur se trasvasa el aceite esencial a un frasco color ámbar, y se tomó nota del volumen de aceite obtenido y peso de muestra usado, obtenido para realizar el porcentaje de rendimiento. Para captar el exceso de agua que tiene el aceite esencial se agregó sulfato de sodio anhidro (1 g por cada 10 mL de muestra).<sup>(46)</sup>

El porcentaje de rendimiento se obtuvo del peso total de la muestra fresca y el peso del aceite obtenido mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{volumen de aceite obtenido(mL)}}{\text{peso de la muestra(g)}} \times 100$$

## 2.2.6.-DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

**Solubilidad.** -La solubilidad es una de las propiedades físicas más sencillas de medir. Se funda en el hecho que “lo semejante disuelve a lo semejante”. Debido a que, una disolución se realiza cuando la interacción entre el soluto y el disolvente liberan una energía similar a la que requieren para vencer las fuerzas de atracción entre partículas soluto-soluto y solvente-solvente. Por lo cual, las partículas que componen el soluto se dispersan entre las partículas del disolvente.

- **Procedimiento de medición:** para determinar la solubilidad de los aceites esenciales se disolvió 0.2 mL de aceite esencial en 1mL de disolvente (agua, etanol, acetona, cloroformo, acetato de etilo, entre otros), siendo la muestra: ligeramente soluble, insoluble.

**Densidad Relativa.** -Es la relación que existe entre la masa y el volumen de sustancia a experimentar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

- **Procedimiento de medición:** se usó un picnómetro seco al cual se trasvaso el aceite esencial (hasta llenarlo) y se llevó a baño maría con una temperatura de 20°C durante 5 minutos, dicho procedimiento se repitió 2 veces más. De igual manera, se repite la técnica, pero usando agua destilada en vez de aceite, se anotó los resultados obtenidos.

**Índice de refracción.** -El índice de refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y seno del ángulo de refracción de un rayo de luz con longitud de onda determinada., que pasa desde el aire a través del aceite esencial manteniendo la temperatura constante.

- **Procedimiento de medición:** Se usó un refractómetro calibrado con agua destilada a 20°C con un  $n_D$  igual a 1.333, luego se colocó una gota de aceite esencial en el prisma del equipo y lee el índice de refracción a 20°C. <sup>(46)</sup>

**Rotación óptica.** -Técnica basada en la medida de la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa.

**Procedimiento de medición:** Se trasvaso 1 mL de la muestra de aceite esencial en el tubo de contención y se disolvió en 10 mL de etanol absoluto,

llenándolo por completo, luego se cierra herméticamente el tubo. Posteriormente se lleva la muestra al polarímetro y se midió la rotación óptica.  
(46)

**Características organolépticas.** – Mediante pruebas organolépticas se determinó el aspecto, color, aroma y sabor que presenta el aceite esencial.

**Índice de acidez.** -Se expresa como los mg de hidróxido de potasio (KOH) necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en un gramo de aceite.

- **Procedimiento de medición:** Se pesó 1 g de aceite esencial en un Erlenmeyer de 100 mL, luego se agregó 15 mL de alcohol del 95% neutralizado, se agregó 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con solución alcohólica de KOH 0.1N. se anotó el volumen gastado y se tuvo en cuenta la siguiente fórmula.

$$I. A. = \frac{5.6 \times Vg}{G}$$

**Dónde:** Vg es volumen gastado, G=peso de muestra, 5.6 son los gramos de KOH (0.1N).<sup>(46)</sup>

**índice de ésteres.** –Mide la cantidad de derivados de ácido carboxílico en los cuales el grupo hidroxilo (-OH) se sustituye por un grupo alcoxilo (-RO). Es decir, esteres, (combinación de un ácido carboxílico y un alcohol), los ésteres tienen a menudo olores muy agradables.

- **Procedimiento de medición:** Se pesó 1 g de aceite esencial en un matraz y se añadió 5 mL de etanol absoluto y 5 gotas de fenolftaleína al 1 %, se tituló con solución alcohólica de KOH (0.1N) (Y1). Luego, se añadió 10 mL de solución alcohólica de KOH (0.5 N), se refluxo una hora en baño maría, se añadió 3 gotas de fenolftaleína y título con solución etanólica de ácido clorhídrico (0.5N) (Y2). Finalmente, se efectuó una determinación en blanco sin aceite esencial (Y3) .<sup>(46)</sup>

$$I. E = \frac{(Y3 - Y2) \times 28.5}{W}$$

**Dónde:** Y2 es el volumen gastado en muestra, Y3 es el volumen gastado en blanco, W es el peso de la muestra. 28.05 representa los g de KOH (0.5 N).

**índice de saponificación.** -Es una medida de ácidos grasos libres y combinados que existen en la grasa y es directamente proporcional a su masa molecular media. Se define como el “número de mg de KOH necesarios para saponificar 1 g de

grasa". Cantidad de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) necesarios para neutralizar los ácidos libres y saponificar los esteres de un gramo de muestra

- **Procedimiento de medición:** Transfirió 1,5 a 2 g de muestra a un Erlenmeyer de 250 mL y agregar 25 mL de KOH alcohólico 0.5 N. Calentar en un baño de vapor, con un refrigerante adecuado para mantener el reflujo durante 30 minutos. Agregar 1 mL de fenoptaleina y titular el hidróxido de potasio en exceso con ácido clorhídrico. El índice de saponificación se relaciona con los otros índices mediante la siguiente formula:

$$I. S. = I. A. + I. E.$$

**Donde:** I.A. es índice de acidez, I.E. es el índice de Ésteres.<sup>(46)</sup>

### **2.2.7.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUÍMICOS MEDIANTE GC-MS**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica de elucidación estructural usada para determinar la composición química de muestras volátiles. La GC-MS para el presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Profesional de Química.

#### **Procedimiento:**

Se trasvaso 500 µL de aceite esencial a un vial de 1 mL, aforar con n-Heptano para el análisis. La determinación de la composición química del aceite esencial se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas con una columna cromatográfica (30 m x 0.25 mm de diámetro y espesor de 0.25 µm). Por otro lado, se usó Helio como gas portador con un flujo de 1 mL/min a volumen constante.

La muestra (solución de aceite esencial en n-Heptano) se inyectó al equipo a través del inyector a 260°C en el cual es analizado. La temperatura del horno del CG se programa con una temperatura inicial de 60°C hasta una temperatura final de 260°C. La muestra corre durante un tiempo de 50 min. además, los compuestos obtenidos se identifican aplicando un sistema computarizado.<sup>(22)</sup>

## **2.2.8.-EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE LA TECNICA KIRBI-BOUER MODIFICADA.**

### **2.2.8.1.-FUNDAMENTO**

La técnica de Kirby-Bauer modificada es una técnica cualitativa utilizada para determinar la sensibilidad de un microorganismo (bacteria) mediante la realización de un antibiograma. Los antibiogramas son métodos *in vitro* que determinan la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio. La técnica Kirby-Bauer aplica el método de difusión en agar de un antibiótico para determinar la sensibilidad de las bacterias frente a un antibiótico.

El método de difusión en discos consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida de los diferentes antibióticos. Las placas se incuban por 18 - 24 horas a 35 - 37°C. Durante la incubación el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

La determinación de sensibilidad de un microorganismo en forma resumida se da en los siguientes pasos:

A.-Sobre la preparación de solución del Mc Farland.

Preparación y ajuste del estándar de 0.5 de Mc Farland.

B.-Sobre la preparación del inóculo.

- Aislamiento bacteriano en manitol salado.
- Siembra de bacteria en medio líquido (caldo BHI)
- Comparar turbidez del inóculo con estándar 0.5 de Mc Farland.
- Incubar las placas de agar MH con 4 mm de profundidad previamente inoculados, a 37°C por 24 horas.

- Medir halo de inhibición.

### **2.2.8.2.-PREPARACIÓN DE MATERIALES**

**Esterilización de hisopos y placas Petri.** – Las placas Petri se lavaron con agua y detergente, se enjuagó con agua destilada. Luego, se dejó secar en medio ambiente boca abajo. Por otro lado, los hisopos se esterilizaron dentro de un frasco de plástico a fin de evitar la absorción de agua. Finalmente, ambos materiales fueron envueltos en papel kraft y esterilizados en autoclave a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos.

**Recuperación de cepas de *Staphylococcus*.** - Las cepas de *Staphylococcus* se encontraban criogenizadas en tubos de centrifuga de 1.5 mL en refrigeración, para su recuperación se requirió activarlos en agar manitol salado.

**Preparación del Agar Manitol Salado.** – Se preparó el medio (deshidratado) en base a las indicaciones del fabricante, el medio se esterilizo en autoclave y dejó enfriar. Luego, se distribuyó entre 20 a 30 mL del medio en cada placa Petri de 10 cm de diámetro (estériles).

**Activación de cepas.** – Las cepas de *Staphylococcus* se trasvasaron a placas con manitol salado haciendo uso de asa microbiológicas e incubaron a 37°C durante 24 horas.

### **2.2.8.3.-PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (0.5 MAC. FARLAND) PARA EL INÓCULO**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario ( $BaCl_2$ ) como estándar.

#### **Preparación del estándar de turbidez:**

- Agregar 0.5 mL de una solución de  $BaCl_2$  0.048 M ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  al 1,175% p/v) a 99.5 mL de una solución de  $H_2SO_4$  0.18 M (0.36 N) (1% v/v) en constante movimiento para mantener la suspensión. Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 de Mac Farland.

- Distribuir de 4 a 6 mL en tubos con tapa de rosca, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- Ajustar bien las tapas y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
- Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.
- Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.

#### 2.2.8.4.-PREPARACION DE DISCOS DE ACEITE ESENCIAL (AE)

**Preparación de Concentraciones de AE.** Las diferentes concentraciones de aceites esenciales se prepararon en base a la siguiente tabla, usando como disolvente etanol absoluto, todas las concentraciones se preparan en tubos de centrifuga de 1.5 mL esteriles:

**Tabla 2- Concentración de aceites esenciales para antibiograma**

N°	Concentración de aceite esencial (%)	Aceite esencial (µL)	Disolvente (etanol absoluto) (µL)
1	0.25	2.5	997.5
2	0.5	5	995
3	1	10	990
4	2	20	980
5	5	50	950
6	7	70	930
7	10	100	900
8	15	150	850
9	35	350	650
10	50	500	500
11	75	750	250
12	90	900	100
13	100	1000	-

**Preparación de discos.** – Los discos se obtuvieron a partir de perforar papel filtro Whatman N° 4, posteriormente los discos (6 mm de diámetro) fueron esterilizados en autoclave a 121°C. Por otro lado, las aplicaciones de las diferentes concentraciones de aceites esenciales sobre los discos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad. Además, cabe resaltar que, en cada disco se aplicó una cantidad de 10 µL de aceite esencial (5 µL por cada cara) con ayuda de micropipetas, este proceso se lleva a cabo el día de la prueba microbiológica dos horas antes, debido a que los discos deben encontrarse secos y conteniendo el aceite esencial.

#### **2.2.8.5.-PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA ENSAYO MICROBIOLÓGICO**

**Preparación del Agar Muller Hilton (MH).** –Para el desarrollo de este proceso se tuvo en cuenta que, para el desarrollo de la parte experimental se requiere llenar cada placa Petri con 30 mL del agar preparado (placa de 10 cm de diámetro), obteniendo un grosor de 4 mm de agar en la placa. En base a lo cual se realizaron los cálculos respectivos.

Posteriormente, se prepara el medio (deshidratado) en base a las indicaciones del fabricante, en esta etapa del procedimiento se pesa la cantidad necesaria y disuelve la muestra con agua destilada, luego, se esteriliza el medio en autoclave por 15 minutos a 121°C, y deja enfriar hasta que alcance una temperatura de 45-50°C. Después, se reparte el medio en las placas petri (previamente esterilizadas). Se deja enfriar las placas y guarda en condiciones estériles hasta su uso. Estas placas luego de ser utilizadas deben ser descartadas.

#### **2.2.8.6.- PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN BACTERIANA**

##### **2.2.8.6.1.- INOCULACIÓN**

##### **2.2.8.6.2.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

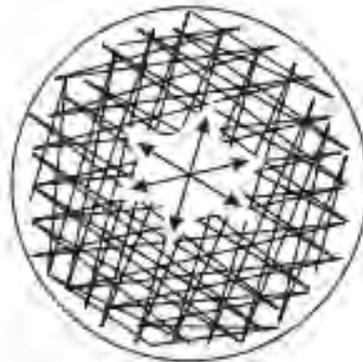
Seleccionar una colonia aislada (diferenciada), de un cultivo en placa. Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transvasarlo a un tubo que contiene de 5 mL de caldo cerebro corazón (BHI). Incubar el caldo a una temperatura de 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0.5 de la escala de Mc. Farland (por lo general 6 Hrs, en el cual presenta ligera turbidez visible). Estandarizar la turbidez del inóculo diluyéndolo con solución salina, se lee la densidad del inóculo usando un espectrofotómetro a 620 nm, hasta que alcance una

D.O. entre 0.08 a 0.13 unidades lo que equivale 0.5 en la escala de Mc. Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

Por otro lado, el ajuste de la turbidez se puede realizar mediante comparación visual con el estándar Mc. Farland 0.5. Para realizar este paso correctamente usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

#### **2.2.8.6.3.-INOCULACIÓN DE LAS PLACAS**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión ajustada, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Inocular (sembrar) la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura N° 14). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.



**Figura N°14.-** Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.

#### **2.2.8.7.-APLICACIÓN DE LOS DISCOS**

Colocar los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Distribuir los discos uniformemente, tres discos de una concentración determinada por placa en el cual se encuentren a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se

difunden rápidamente. Cada disco con concentración determinada se realiza por triplicado.

Se realizó un control de susceptibilidad utilizando discos de Cefalexina (Cefalexina Normon®) (30 µg) y Vancomicina (Vancomicina en compuestos genéricos) (30 µg) para las cepas de *Staphylococcus*. Posterior al proceso de incubación se comparan los halos de inhibición.

#### **2.2.8.8.-INCUBACIÓN**

El proceso de incubación se realiza 15 minutos después de aplicar los discos con aceite esencial, luego recién las placas son incubadas en posición invertida a 37°C durante 24 horas.

#### **2.2.8.9.-LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un vernier (o regla). Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa Petri con una luz transmitida localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. Para *Staphylococcus* spp. se usa luz transmitida, manteniendo la placa arriba de la luz debido a que, permite examinar un posible ligero crecimiento de cepas resistentes (a Oxacilina/Meticilina o Vancomicina) dentro de los halos aparentes de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia.

El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Sin embargo, las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Los diámetros de inhibición son interpretados basándose en la siguiente Tabla (tabla 3). La sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

**Tabla 3- Parámetros para la medición de los halos.**

<b>Nula (-)</b>	Diámetro inferior a 8mm
<b>Sensibilidad limite (+)</b>	Diámetro comprendido entre 8 a 14 mm
<b>Sensibilidad media (++)</b>	Diámetro entre 14 y 20 mm
<b>Sensibilidad alta (+++ )</b>	Diámetro superior a 20 mm

El cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio se aplica la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Efecto inhibitorio} = \frac{\text{Medida del diametro de inhibición.}}{\text{Diametro halo de inhibición control positivo.}} \times 100$$

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.-DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

##### 3.1.1.- PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

El aceite esencial se obtuvo de las flores, hojas y tallos tiernos de *S. saxicola*. por arrastre de vapor, la extracción del A.E. se realizó mediante hidrodestilación, un proceso conocido para obtener el aceite esencial de una planta aromática.

La tabla 4, muestra el porcentaje de extracción del aceite esencial.

**Tabla 4.-Porcentaje de extracción del aceite esencial de *S. saxicola***

Número de determinaciones	1	2	3
Volumen (mL)	11.4	11.7	11.6
Peso de muestra (g)	150	150	150
Tiempo (Hrs)	9	9	9
Rendimiento (%)	7.6	7.8	7.7
Rendimiento promedio (%)	7.7		

Según los resultados obtenidos en la tabla 4, se aprecia un rendimiento promedio de 7.7 % para el aceite esencial de *S. saxicola*. extrayendo 34.7 mL de aceite esencial por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger. En comparación al trabajo de investigación realizado por Alderete, H., (2017) en el cual se extrajo los aceites esenciales de las especies *S. nutans* Sch. Bip, *S. calvus* Cuatrec y *S. chiquianensis* Cabrera se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0.97, 0.42 y 0.03 % respectivamente para las tres especies pertenecientes al género *Senecio*.<sup>(24)</sup>

Por otro lado, Chen Y., (2009) en su estudio sobre la composición química del aceite esencial de *S. scandens* obtuvo un rendimiento de 0.79 %.<sup>(14)</sup> Arancibia L., (2010) estudio los aceites esenciales de las especies *Senecio mustersii* y *S. subpanduratus* en el cual reporto un porcentaje de rendimiento de 0.71 y 0.81 % respectivamente.<sup>(18)</sup> Además, El Harawy S., (2008) obtuvo un porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Senecio rowleyanus* Jacobs de 0.1 % mediante hidrodestilación<sup>(10)</sup>. Aunque, el porcentaje de rendimiento obtenido de la especie *S. saxicola* en comparación a otras especies del mismo género (*Senecio*) es elevado, coincide con lo citado por Bandoni A., (2002) algunas especies vegetales presentan un porcentaje

de rendimiento alto entre 3 a 4 %.<sup>(4)</sup> Por lo que, se llega a la conclusión que es posible encontrar especies vegetales con rendimientos elevados.

### **3.1.2.-CARACTERISTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola***

El aceite esencial obtenido fue sometido a distintas pruebas organolepticas con el fin de evaluar los parámetros de la calidad del mismo.

La tabla 5, muestra las propiedades organolépticas del aceite esencial de *S. saxicola*.

**Tabla 5.-Propiedades organolépticas del aceite esencial de *S. saxicola*.**

<b>Especie vegetal</b>	<b><i>S. saxicola</i></b>
<b>Aspecto</b>	Líquido ligeramente viscoso
<b>Color</b>	Amarrillo translucido
<b>Olor</b>	Característico
<b>Sabor</b>	Astringente

Según la tabla 5, el A.E. de *S. saxicola* presento un aspecto ligeramente viscoso, coloración amarillenta, sabor astringente y aroma característico; estas características fueron similares a las que reporta Bermúdez (2009), quien menciona que generalmente los aceites esenciales presentan coloración ligeramente amarilla hasta transparente, y que desprenden aroma<sup>(27)</sup>.

De igual manera, otras especies del genero *Senecio* tienen características similares. Por ejemplo, El Hawary (2008) reporta que el aceite esencial de *S. rowleyanus* presenta coloración amarillenta, aroma agradable, sabor amargo<sup>(10)</sup>. También, Mohammadhosseini M., (2010) reporta que la especie *S. gallicus* presenta coloración amarillenta y un aroma picoso.<sup>(19)</sup>

Por otro lado, el aroma que presenta un aceite esencial se debe a la compleja composición química en monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos que posee. Bandoni A. (2000) aconseja discriminar los compuestos mayoritarios (mayor al 1 o 0.5 %) de los compuestos minoritarios contenidos en una esencia. Además, indica que a veces, las notas olfativas características de las esencias están dadas por los componentes minoritarios y no por los principales<sup>(4)</sup>. Por lo que, se puede mencionar que probablemente los compuestos mayoritarios del A.E. de *S. saxicola* son los responsables del aroma por la abundancia que presenta.

### 3.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

Las propiedades fisicoquímicas del A.E. se evaluaron en el laboratorio de fitoquímica haciendo uso de los diferentes materiales y equipos de laboratorio. El ensayo de solubilidad se realizó disolviendo 0.2 mL de A.E. en 1 mL de disolvente. La tabla 6, muestra la solubilidad del aceite esencial de *S. saxicola* frente a diferentes disolventes en polaridad creciente.

#### 3.2.1.-PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

Tabla 6.-Solubilidad del aceite esencial de *S. saxicola*

Disolvente	Solubilidad
Agua	-
Metanol	+
Etanol 40%	+
Etanol 60%	+
Etanol 90%	++
Etanol absoluto.	+++
Cloroformo	+++
Acetona	+++
Acetato de etilo	+++
Éter etílico	+++

Leyenda:

- **Insoluble:** -
- **Poco soluble:** +
- **Soluble:** ++
- **Muy soluble:** +++

De acuerdo la tabla 6, la solubilidad del aceite esencial de *S. saxicola* frente a diferentes disolventes en polaridad creciente, los resultados demuestran una insolubilidad en agua, poca solubilidad en disolventes polares (metanol, etanol 40%, etanol 60%), buena solubilidad en etanol 90%, etanol absoluto y gran solubilidad del aceite esencial en disolventes apolares (cloroformo, acetona, acetato de etilo, éter etílico). Los resultados obtenidos respaldan lo reportado por Bermúdez (2009) donde menciona que los aceites esenciales son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Además, de ser liposolubles y ser muy poco o insoluble en agua. <sup>(27)</sup>

### 3.2.2.-CARACTERISTICAS FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

La tabla 7, muestra las propiedades físicas del aceite esencial de *S. saxicola*.

**Tabla 7.-Propiedades físicas del aceite esencial de *S. saxicola***

<b>Aceite esencial de <i>S. saxicola</i>.</b>	
<b>Densidad relativa. (g/mL)</b>	0.9706
<b>Rotación óptica.</b>	- 0.175°
<b>Índice de refracción.</b>	1.518

De acuerdo a la tabla 7, el aceite esencial de *S. saxicola*, presento una densidad relativa de 0.97, un índice de refracción de 1.518 y rotación óptica de -0.175. Bermúdez (2009) en su estudio sobre el uso industrial de las plantas aromáticas y medicinales reporto que los aceites esenciales tienen densidad menor a la del agua y que casi siempre poseen poder rotatorio y un índice de refracción elevado.<sup>(27)</sup>

Sobre los resultados obtenidos Domínguez (1973) indica que la densidad e índice de refracción son datos de gran utilidad debido a que permiten hacer una deducción de sus componentes. Aceites esenciales con una densidad mayor de 0.9 y un índice de refracción mayor de 1.47, presentan compuestos oxigenados alicíclicos u oxigenados aromáticos <sup>(28)</sup>. El aceite esencial de *S. saxicola* presenta una densidad relativa de 0.97 y un índice de refracción de 1.518, por tanto, presenta compuestos oxigenados alicíclicos u oxigenados aromáticos. El Hawarry (2008) reporto para la especie *S. rowleyanus* un índice de refracción de 1.482 teniendo 25 compuestos identificados por GC-MS siendo el 99.95 % de la composición química del aceite esencial, del cual 45 % de los compuestos reportados eran compuestos oxigenados (sesquiterpenos con grupos funcionales alcohol).<sup>(10)</sup>

Por otro lado, García E., (2017) indico que la rotación óptica viene determinada por la estructura molecular y la concentración de moléculas quirales de una sustancia ópticamente activa. El A.E. de *S. saxicola* presento una rotación observada de - 0.175° (Levógiro), los componentes mayoritarios son probablemente son los responsables de la rotación obtenida, concordando con Pumaylle K., (2012), quien indico que los diferentes valores de rotación óptica entre muestras aromáticas probablemente estén relacionados a la presencia de componentes mayoritarios.<sup>(22)</sup>

(32)

### 3.2.3.-CARACTERISTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

La tabla 8, muestra las propiedades químicas del aceite esencial de *S. saxicola*.

**Tabla 8.-Propiedades químicas del aceite esencial de *S. saxicola***

<b>Aceite esencial de <i>S. saxicola</i>.</b>	
<b>Índice de acidez. (IA) mg KOH/g aceite esencial</b>	0.7106
<b>Índice de saponificación. (IS) mg KOH/g aceite esencial</b>	0.2018

De acuerdo a la tabla 8, las propiedades químicas del aceite esencial de *S. saxicola*, presenta un índice de acidez de 0.7106 y un índice de saponificación de 0.2018.

Según la bibliografía, Bandoni A. (2000) menciona que, el índice de acidez nos da la cantidad de hidróxido de potasio (KOH) necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres. El resultado obtenido 0.7106 indica que en la mezcla de metabolitos terpenicos y fenilpropanos que es un aceite esencial presenta grupos funcionales de carácter ácido que neutralizan una sustancia básica como el KOH.<sup>(4)</sup>

De igual manera, el índice de saponificación es la cantidad de hidróxido de potasio (KOH) necesarios para la neutralización de los ácidos grasos contenidos en un gramo de grasa. Por este parámetro se evalúa la pureza del aceite, ya que un índice de saponificación alto indica una alta pureza del aceite vegetal. Por lo cual, el resultado obtenido 0.2018 indica una cantidad muy baja, en la cual hay pocos grupos funcionales oxigenados, cabe resaltar que los resultados obtenidos están relacionados con la composición química del aceite esencial de *S. saxicola*.<sup>(4)</sup>

### 3.3.-DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

#### 3.3.1.-PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola*

En la Figura N°15 se observa el cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases.

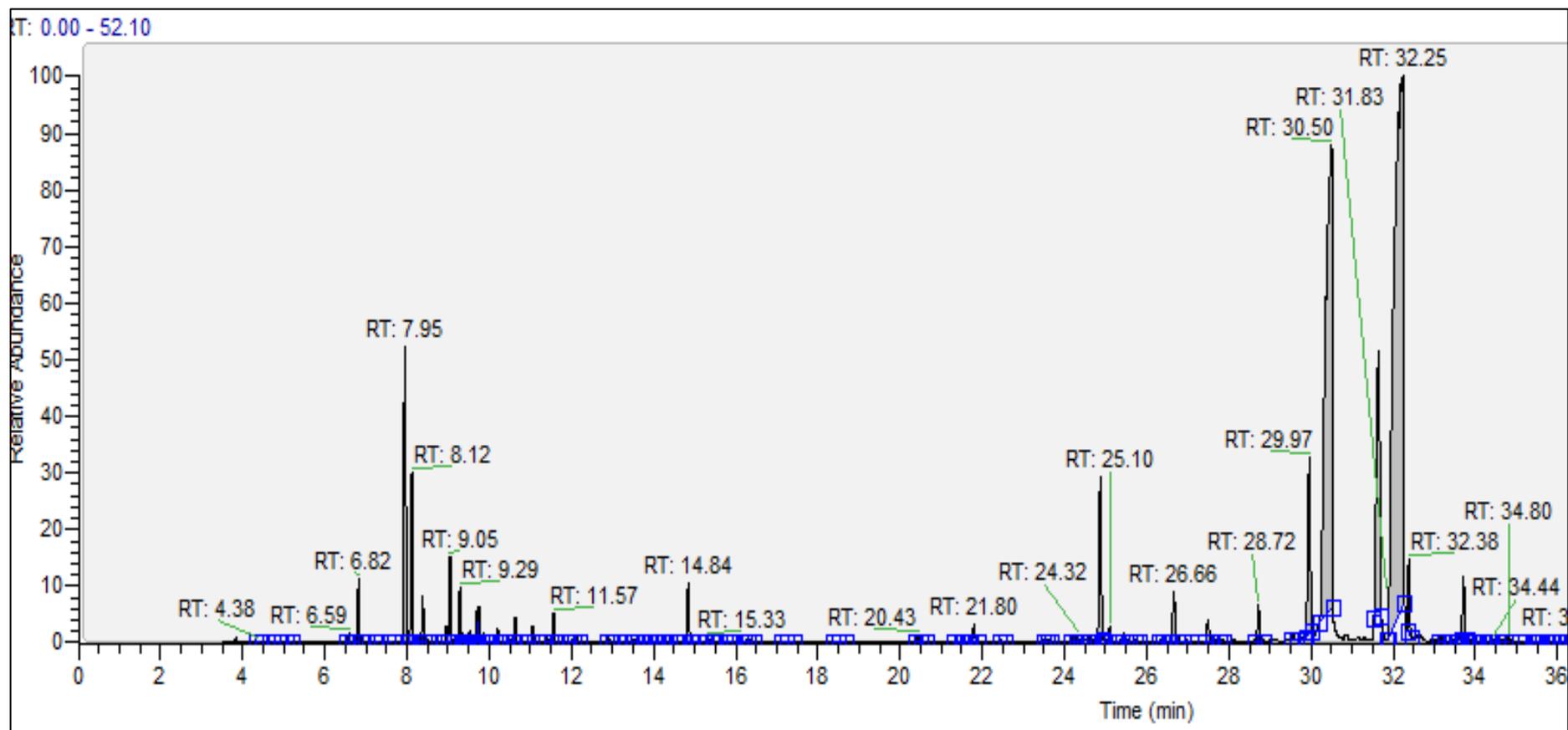


Figura N° 15.-Cromatograma *S. saxicola*.

La tabla 9, muestra la composición química del aceite esencial de *S. saxicola* determinada mediante GC-MS, aunque se identificó de 55 compuestos, solo se tomó en cuenta 33, debido a que algunos presentaron porcentaje de presencia bajo.

**Tabla 9.-Composición química del aceite esencial del *S. saxicola*.**

N°	NOMBRE DEL COMPUESTO	RT	%
1	a-felandreno	6.59	0.1
2	a-pineno	6.82	0.76
3	4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano	7.95	<b>4.65</b>
4	a-pineno	8.12	2.21
5	a-mirceno	8.38	0.54
6	a-felandreno	8.95	0.2
7	3-careno	9.05	1.15
8	2-careno	9.29	0.7
9	o-cimeno	9.36	0.1
10	1-metil-3-(1-metiletil)-benceno	9.53	0.14
11	D-limoneno	9.69	0.39
12	4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano	9.75	0.42
13	trans-a-cimeno	9.85	0.11
14	3,7-dimetil-(Z)-1,3,6-octatrieno	10.21	0.16
15	c-terpineno	10.64	0.33
16	2-metil-5-(1-metiletil)-(1a,2a,5a)-Biciclo[3.0.1]hexan-2-ol	11.06	0.23
17	3-metil-6-(1-metiletilidieno)-ciclohexeno	11.57	0.39
18	5-isopropil-2-metilbiciclo[3.1.0]hexan-2-ol	12.11	0.1
19	terpinen-4-ol	14.84	0.87
20	2,6-dimetil-2,6-octadieno	20.43	0.1
21	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1metiletenil)-(1s-(1a,2a,4a))-ciclohexano	21.8	0.25
22	1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-[1s-(1a,7a,8aa)]-Naftaleno	24.87	<b>2.73</b>
23	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-tetrametilbiciclo[8,1,0]-undeca-2,6-dieno	25.1	0.23
24	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1metiletenil)-(1s-(1a,2a,4a))-ciclohexano	25.45	0.16
25	4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidronaftalen-1-ol	26.66	0.8
26	decahidro-1,1,7-trimetil-4-metilen-[1ar-(1aa,4aa,7a,7aa,7ba)]-1-H-Cicloprop[e]azulen-7-ol	27.49	0.35
27	(1R,7S,E)-7-Isopropil-4,10-dimetilenciclodec-5-enol	28.72	0.62
28	Ni	29.97	<b>3.47</b>
29	(3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidronaftaleno-1(8aH)	30.5	<b>24.97</b>
30	9-cedranona	31.65	<b>7.17</b>
31	3,4,4a,5,6,7-hexahidro-4a,5-dimetil-3-(1-metiletenil)-[3S-(3a,4aa,5a)]-1(2H)-naftalenona	32.25	<b>41.4</b>
32	Ni	32.38	0.87
33	4,4a,5,6,7,8-hexahidro-4a,5-dimetil-3-(1-metiletilidien)-(4ar-cis)-2(3H)-naftalenona	33.71	0.97

**Dónde:** ni: compuesto no identificado, RT: Tiempo de retención, %: Porcentaje de abundancia.

La composición química del A.E. de *S. saxicola* Wedd, procedente de Ocongate, se determinó mediante GC-SM, la espectrometría de masas formo iones a partir de la desintegración de moléculas gaseosas por bombardeo de electrones en la cámara de ionización del equipo. Las moléculas se fragmentaron y al romperse en las mismas condiciones dieron el mismo tipo y número de fragmentos y constituyen la fragmentación patrón.

Los núcleos atómicos se separaron en función de su relación entre masa y carga (m/z), gracias a este proceso se pueden conocer que es la muestra por comparación, además, teniendo en cuenta los tiempos de retención (RT) de los diferentes compuestos, se determinó como compuestos mayoritarios los siguientes compuestos químicos (Figura N° 16):

- 4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo [3,1,0]hexano (Figura N° 16-a) con un porcentaje de 4.65 % identificado mediante GC-MS (Figura N° 17-a).
- 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-[1s-(1a,7a,8aa)]-Naftaleno (Figura N° 16-b) con un porcentaje de 2.73 % identificado mediante GC-MS (Figura N° 17-b).
- (3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidro naftaleno-1(8aH) (Figura N° 16-c) con un porcentaje de 24.97% identificado mediante GS-MS (Figura N° 17-c).
- 9-cedranona (Figura N° 16-d) con un porcentaje de 7.17% identificado mediante GC-MS (Figura N° 17-d).

Según la revisión bibliográfica, la composición química un aceite esencial del genero *Senecio* está conformada por una mezcla compleja de moléculas orgánicas de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos<sup>(26)</sup> como: 1,3-Ciclohexadieno, 4-terpinenol,  $\alpha$ -mirceno, o-cimeno, p-cimeno, pulegona, sabineno, timol,  $\alpha$ -cupreneno,  $\alpha$ -curcumeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\alpha$ -zeribereno,  $\alpha$ -zingibereno,  $\beta$ -myrceno,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -pineno, entre otras. De los cuales  $\alpha$ -mirceno y o-cimeno se encuentran en la composición del A.E. de *S. saxicola*.<sup>(6, 7, 13, 18-23)</sup>

En comparación al trabajo de Alderete H., (2017) en el cual se extrajo los A.E. de las especies *S. nutans* Sch. Bip, *S. calvus* Cuatrec y *S. chiquianensis* Cabrera se obtuvieron 1-isopropil-4-metil biciclo[3,1,0]hexano y gamma-terpineno. Del cual 1-isopropil-4-metil biciclo[3,1,0]hexano también se encuentra en la composición química del A.E. de *S. saxicola*, aunque reportado como 4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo [3,1,0]hexano con mayor porcentaje en la composición 4.65 %. Por lo que, se puede mencionar este compuesto frecuente en plantas del genero *Senecio*, pese a los factores climáticos, tipos de suelo, o zonas geográficas de recolección.

Respecto a los espectros de masa (MS) de la Figura N°17, se aprecia una serie de picos dentro de un plano cartesiano en el cual el eje de las abscisas indica la relación  $m/z$  (masa de cada fragmento relacionada a la carga), mientras que el eje de las ordenadas indica la abundancia relativa de los iones radicales (número de colisiones producidos en el equipo relacionado a la abundancia) de la molécula obtenida por el equipo.

Todo espectro tiene un pico más amplio (pico base), la relación  $m/z$  indica las unidades de masa atómica de un determinado fragmento cargado, ante la ausencia de nitrógeno en una molécula aparece un último pico que indica la relación masa con carga par (ion molecular), el ion molecular indica la masa atómica total de la molécula.

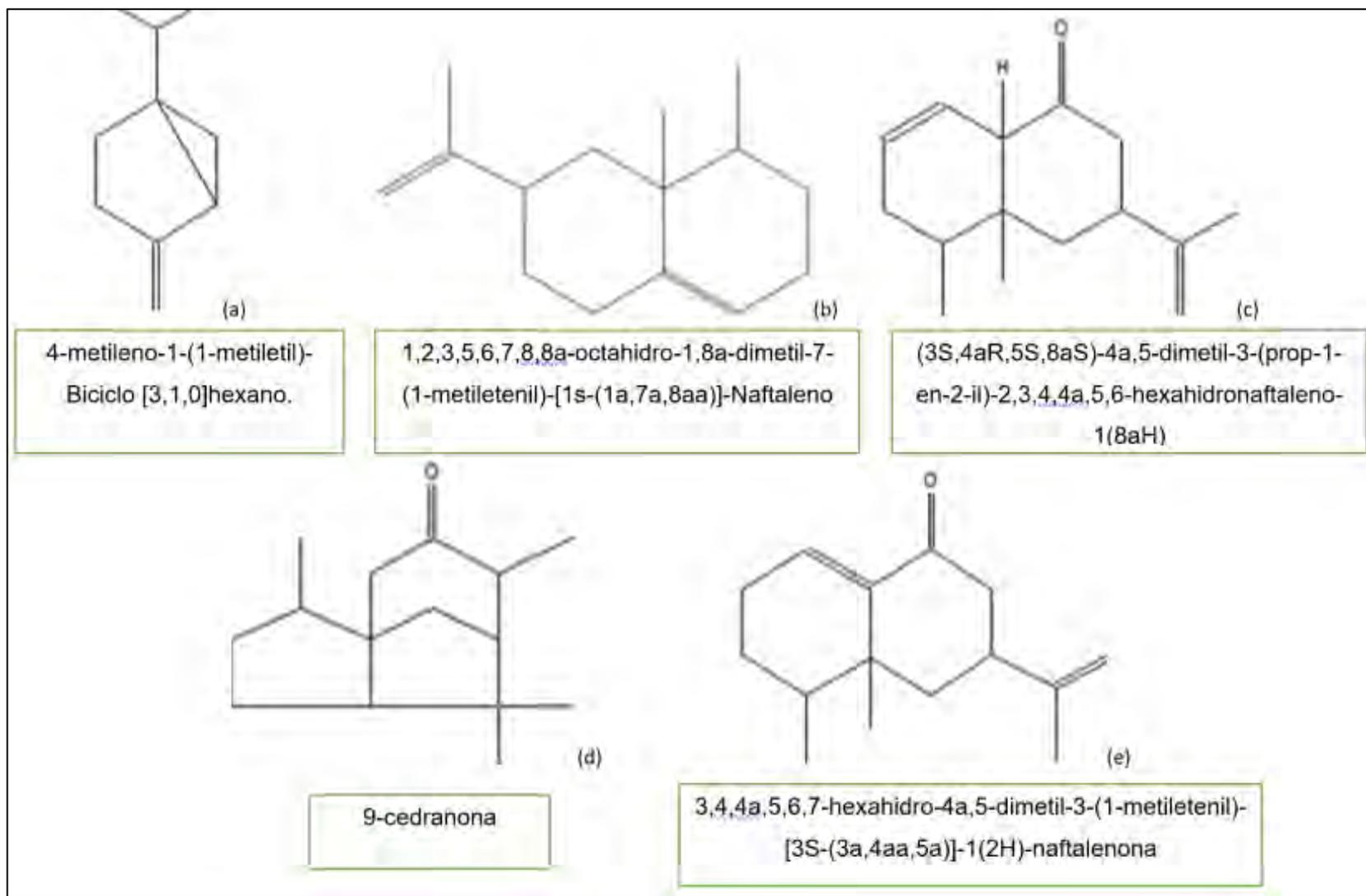


Figura N° 16.- compuestos químicos mayoritarios del aceite esencial.

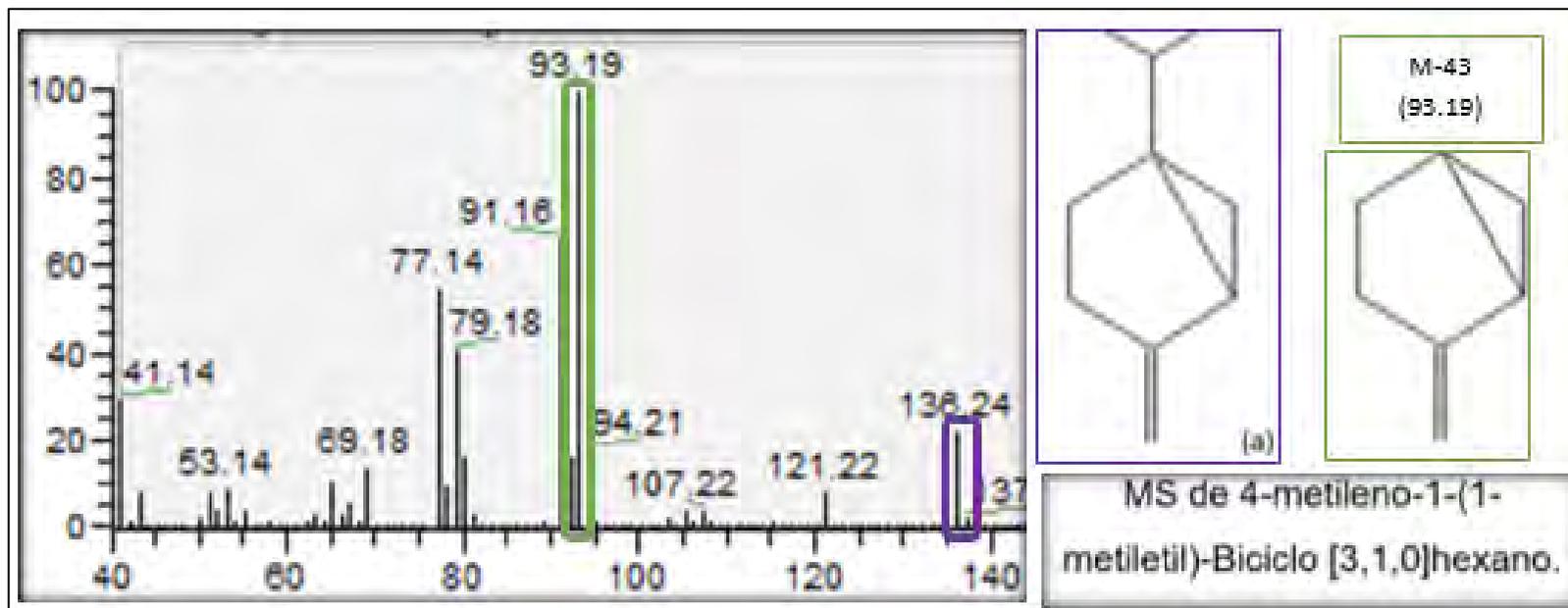


Figura N° 17-a.-MS de 4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo [3,1,0]hexano.

La Figura N°17-a es el MS obtenido por el equipo GC-MS, se aprecia el pico ion molecular (barra morada) con un valor de 136.24 lo cual corresponde al peso molecular del compuesto neutro (figura lateral en cuadro morado), la gráfica también muestra el pico base (barra verde) con un valor de 93.19 siendo este el fragmento más abundante (M-43, figura lateral en cuadro verde). El fragmento molecular más abundante perdió el radical isopropil en comparación a la molécula neutra.

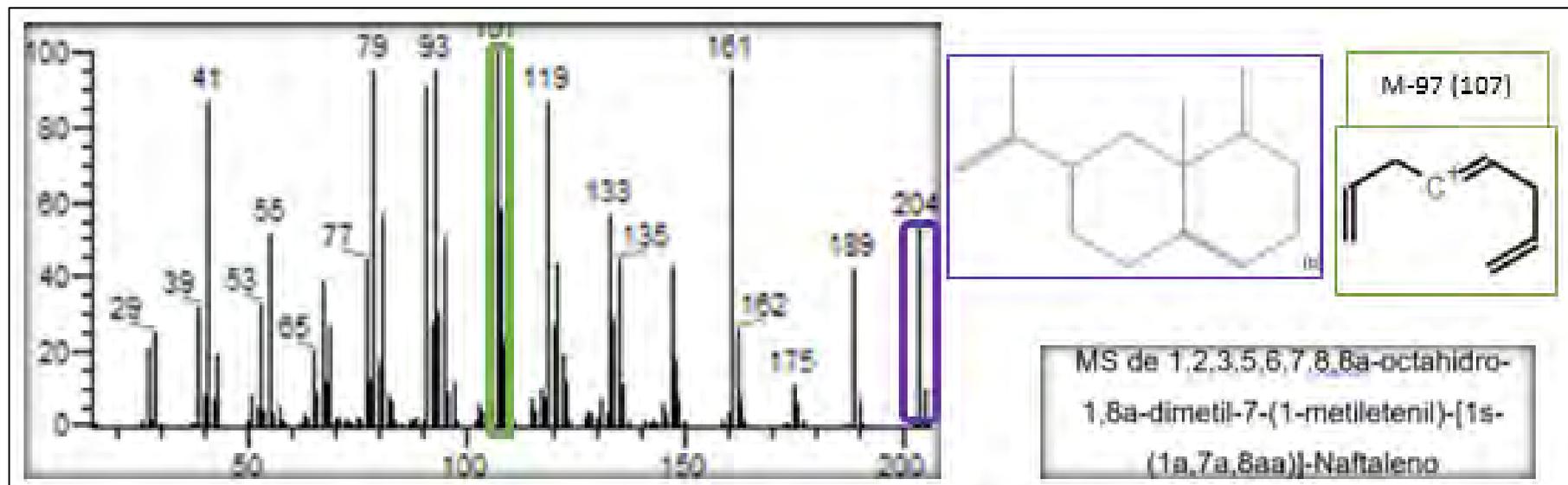


Figura N° 17-b.-MS de 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-[1s-(1a,7a,8aa)]-Naftaleno.

La Figura N°17-b es el MS obtenido por el equipo GC-MS, se aprecia el pico ion molecular (barra morada) con un valor de 204 lo cual corresponde al peso molecular del compuesto neutro (figura lateral en cuadro morado), la gráfica también muestra el pico base (barra verde) con un valor de 107 siendo este el fragmento más abundante (M-97, figura lateral en cuadro verde). El fragmento molecular más abundante coincide con partes de la estructura cíclica del Naftaleno de la molécula neutra.

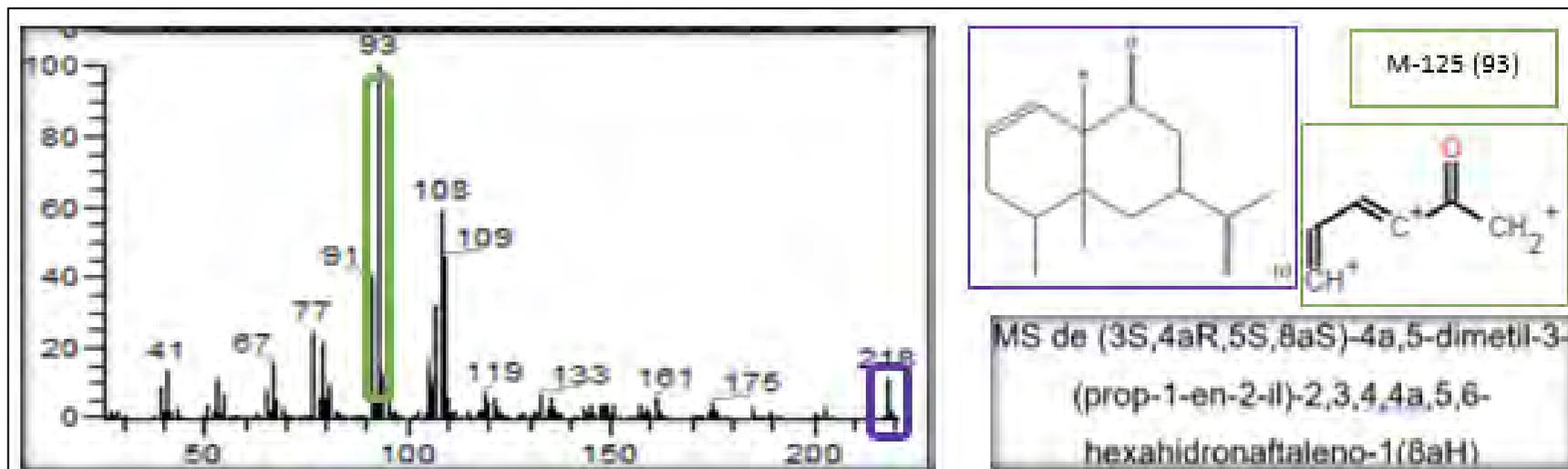


Figura N° 17-c.-MS de (3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidro naftaleno-1(8aH).

La Figura N°17-c es el MS obtenido por el equipo GC-MS, se aprecia el pico ion molecular (barra morada) con un valor de 218 lo cual corresponde al peso molecular del compuesto neutro (figura lateral en cuadro morado), la gráfica también muestra el pico base (barra verde) con un valor de 93 siendo este el fragmento más abundante (M-125, figura lateral en cuadro verde). El fragmento molecular más abundante contiene el átomo de oxígeno siendo similar a la molécula neutra.

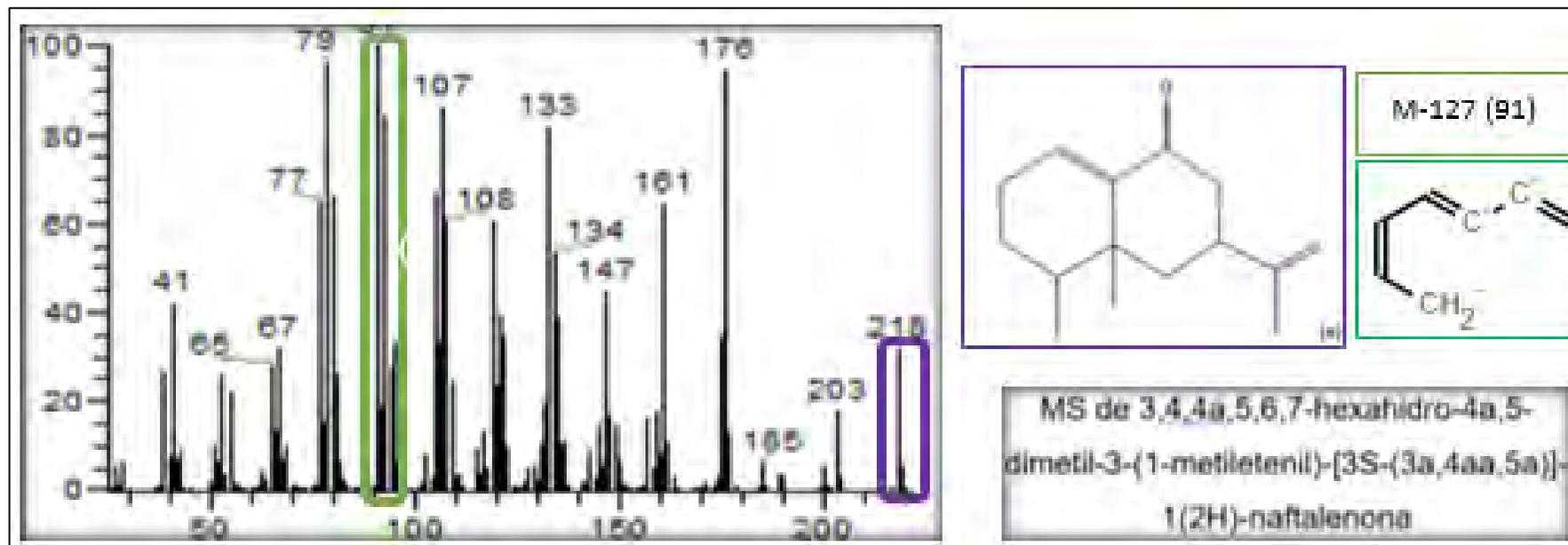


Figura N° 17-d.-MS de (3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidro naftaleno-1(8aH).

La Figura N°17-d es el MS obtenido por el equipo GC-MS, se aprecia el pico ion molecular (barra morada) con un valor de 218 lo cual corresponde al peso molecular del compuesto neutro (figura lateral en cuadro morado), la gráfica también muestra el pico base (barra verde) con un valor de 91 siendo este el fragmento más abundante (M-127, figura lateral en cuadro verde). El fragmento molecular más abundante perdió los grupos radicales que acompañaban a la cadena cíclica incluyendo la molécula de oxígeno en comparación a la molécula neutra.

### 3.4.-DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola* Wedd

#### 3.4.1.- DEL DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola* Wedd. FRENTE AL CONTROL POSITIVO, EN LAS CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis* Y *Staphylococcus aureus*

Tabla 10.-Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola* Wedd, frente a *Staphylococcus epidermidis* (St16447)

N°	Concentración (%)	Diámetro de Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>S. epidermidis</i> .			
		1G	2G	3G	Promedio*
1	0.25	0	0	0	6
2	0.5	0	0	0	6
3	1	9.02	9.10	9.00	9.04
4	2	9.36	9.40	9.45	9.40
5	5	9.50	9.93	9.73	9.72
6	7	9.97	9.48	9.91	9.79
7	10	9.77	10.08	9.69	9.85
8	15	9.27	10.33	10.20	9.93
9	35	10.39	10.12	10.21	10.24
10	50	11.24	11.27	11.10	11.20
11	75	11.95	11.90	11.59	11.81
12	90	10.87	14.28	12.87	12.67
13	100	10.80	11.09	11.71	11.02

Donde:

**1G:** Primer grupo de halos.

**2G:** Segundo grupo de halos.

**3G:** Tercer grupo de halos.

(\*) El promedio incluye el diámetro de los discos de aceite esencial.

En la tabla 10, se observan los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola* Wedd a diferentes concentraciones. Los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de aceite esencial los diámetros de los halos de inhibición aumentan, estos van desde 9.04 mm a una concentración de 1 % y con un valor máximo representativo se encuentra a concentración de 90 % con un halo de inhibición de 12.67 mm frente a las cepas de *S. epidermidis* (St16447).

**Tabla 11.-Determinación del grado de sensibilidad de *Staphylococcus epidermidis* (St16447) a diferentes concentraciones del aceite esencial de *S. saxicola* Wedd**

N°	Concentración (%)	Grado de sensibilidad		
		Sensibilidad límite, entre 8 a 14 mm (+)	Sensibilidad media, entre 14 a 20 mm (++)	Sensibilidad alta, más de 20 mm (+++)
1	0.25	-	-	-
2	0.5	-	-	-
3	1	9.04	-	-
4	2	9.40	-	-
5	5	9.72	-	-
6	7	9.79	-	-
7	10	9.85	-	-
8	15	9.93	-	-
9	35	10.24	-	-
10	50	11.20	-	-
11	75	11.81	-	-
12	90	12.67	-	-
13	100	11.02	-	-

La tabla 11, muestra el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición. Los halos de inhibición obtenidos por el aceite esencial de *S. saxicola* wedd (concentraciones de 1% hasta 100%) encajan en el límite de sensibilidad (9 – 14 mm). El nivel de sensibilidad límite indica que el aceite esencial presenta una mínima actividad antibacteriana, esto se debe en gran parte a su composición química y la forma de actuar como mezcla de las mismas sobre la bacteria de *Staphylococcus*.

La tabla 12, muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados de la actividad antibacteriana con concentraciones estandarizadas del aceite esencial de *S. saxicola wedd* frente a la cepa de *S. epidermidis*.

**Tabla 12.-Análisis de Varianza (ANOVA) de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola wedd* frente a la cepa de *S. epidermidis* (St16447)**

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter – grupos</b>	2104.11	14	150.29	492.49	0.00
<b>Intra – grupos</b>	9.16	30	0.31		
<b>Total</b>	2113.27	44			

**Fuente:** Procesamiento de datos estadísticos 2019.

**Dónde:**

**gl** = Grados de libertad

**F** = Distribución de Fisher

**Sig.** = Significancia

Se observa que el valor de significancia es 0.00, un valor que está por debajo de 0.05 ( $\alpha < 0.05$ ), por lo que se puede afirmar que existe diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

En la tabla 13, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Scheffé utilizando un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla 13.-Prueba de Post hoc de Scheffé de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola wedd* frente a la cepa de *S. epidermidis* (St16447).**

Concentración (%)	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	4
0.25	3	0.00	-	-	-
0.5	3	0.00	-	-	-
1	3	-	9.04	-	-
2	3	-	9.40	-	-
5	3	-	9.72	9.72	-
7	3	-	9.79	9.79	-
10	3	-	9.85	9.85	-
15	3	-	9.93	9.93	-
35	3	-	10.24	10.24	-
100	3	-	11.20	11.20	11.20
50	3	-	11.20	11.20	11.20
75	3	-	-	11.81	11.81
90	3	-	-	-	12.67
<b>Sig.</b>		1.00	0.12	0.16	0.70

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**Fuente:** Procesamiento de datos estadísticos 2019.

Se observa que existen cuatro subconjuntos diferenciados cada uno de un tipo de tratamiento, indicándose la media de cada grupo, en el cuarto subconjunto se observa el valor máximo de halo de inhibición, correspondiente de 12.67 mm, corresponde a la concentración del aceite esencial a concentración de 90 %.

**Tabla 14.-Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio saxicola* Wedd frente a *Staphylococcus aureus* (M5-7)**

N°	Concentración (%) de los discos.	Diámetro de Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>S. aureus</i> ..			
		1G	2G	3G	Promedio*
1	0.25	0	0	0	6
2	0.5	0	0	0	6
3	1	10.97	10.95	10.85	10.92
4	2	11.34	11.79	11.67	11.56
5	5	12.22	12.37	12.30	12.30
6	7	12.96	12.89	12.88	12.91
7	10	12.86	12.94	12.96	12.92
8	15	12.90	13.07	12.94	12.97
9	35	12.97	13.06	13.06	13.03
10	50	13.04	13.00	13.07	13.03
11	75	17.96	18.02	17.84	17.94
12	90	13.70	13.48	13.57	13.58
13	100	12.85	12.78	12.94	12.86

**Donde:**

**1G:** Primer Grupo de Halos.

**2G:** Segundo Grupo de Halos.

**3G:** Tercer Grupo de Halos.

(\*) El promedio incluye el diámetro de los discos de aceite esencial.

En la tabla 14, se observan los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola* Wedd a diferentes concentraciones. Los resultados muestran halos de inhibición desde 10.92 mm a una concentración de 1 % y con un valor máximo representativo se encuentra a concentración de 75 % con un halo de inhibición de 17.94 mm frente a las cepas de *S. aureus* (M5-7).

**Tabla 15.-Determinación del grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* (M5-7) a diferentes concentraciones del aceite esencial de *S. saxicola wedd*.**

N°	Concentración (%)	Grado de sensibilidad		
		Sensibilidad límite, entre 8 a 14 mm (+)	Sensibilidad media, entre 14 a 20 mm (++)	Sensibilidad alta, más de 20 mm (+++)
1	0.25	-		
2	0.5	-		
3	1	10.92		
4	2	11.56		
5	5	12.30		
6	7	12.91		
7	10	12.92		
8	15	12.97		
9	35	13.03		
10	50	13.03		
11	75		17.94	
12	90	13.58		
13	100	12.86		

La tabla 15, muestra el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición. El halo de inhibición obtenido por el aceite esencial de *S. saxicola wedd* (concentración de 75%) encaja en el rango de sensibilidad media (14 – 20 mm). El nivel de sensibilidad media (concentración al 75%) indica que el aceite esencial presenta una buena actividad antibacteriana, esto se relaciona a la composición química del A.E. y la forma de actuar ante la bacteria de *Staphylococcus*.

La tabla 16 muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados de la actividad antibacteriana con concentraciones estandarizadas del aceite esencial de frente a la cepa de *S. aureus*.

**Tabla 16.-Análisis de Varianza (ANOVA) para la actividad antibacteriana del aceite esencial de frente a la cepa de *S. aureus* (M5-7).**

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	2328.55	14	166.33	1160.77	0.00
<b>Intra-grupos</b>	4.30	30	0.14		
<b>Total</b>	2332.85	44			

Fuente: Procesamiento de datos estadísticos 2019.

**Dónde:**

**gl** = Grados de libertad

**F** = Distribución de Fisher

**Sig.** = Significancia

Se observa que el valor de significancia es 0.00, un valor que está por debajo de 0.05 ( $\alpha < 0.05$ ), por lo que se puede afirmar que existe diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del aceite esencial.

En la tabla 17, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Scheffé utilizando un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$ .

**Tabla 17.-Prueba de post hoc de Scheffé para la actividad antibacteriana del aceite esencial de frente a la cepa de *S. aureus* (M5-7).**

Concentración (%)	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
0.25	3	0.00				
0.5	3	0.00				
1	3		10.92			
2	3		11.60	11.60		
5	3		12.30	12.30	12.30	
100	3			12.86	12.86	
7	3			12.91	12.91	
10	3			12.92	12.92	
15	3			12.97	12.97	
35	3			13.03	13.03	
50	3			13.04	13.04	
90	3				13.58	
75	3					17.94
<b>Sig.</b>		1.00	0.21	0.16	0.30	1.00

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**Fuente:** Procesamiento de datos estadísticos 2019.

Se observa que existen cinco subconjuntos grupos diferenciados cada uno de un tipo de tratamiento, indicándose la media de cada grupo, en el quinto subconjunto se observa el valor máximo de halo de inhibición, correspondiente de 17.94 mm, corresponde a la concentración de del aceite esencial a concentración de 75 %.

**3.4.2. DEL EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *S. saxicola* wedd. FRENTE AL CONTROL POSITIVO, EN LAS CEPAS DE *Staphylococcus epidermidis* Y *Staphylococcus aureus***

La tabla 18, muestran los porcentajes de Inhibición del aceite esencial de *S. saxicola* wedd, frente a *S. epidermidis* y *S. aureus* respecto a Vancomicina, a diferentes niveles de concentración.

**Tabla 18.-Efecto inhibitorio del aceite esencial de *S. saxicola* wedd, frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, respecto a Vancomicina.**

Concentración (%)	% de Inhibición frente a <i>S. epidermidis</i>	% de Inhibición frente a <i>S. aureus</i>
0.25	34.4	29.81
0.5	34.4	29.81
1	51.83	54.25
2	53.9	57.43
5	55.73	61.1
7	56.14	64.13
10	56.48	64.18
15	56.94	64.43
35	58.72	64.73
50	64.22	64.73
75	67.72	89.12
90	72.65	67.46
100	63.19	63.88

De acuerdo a la siguiente figura (Figura N° 18), observamos que:

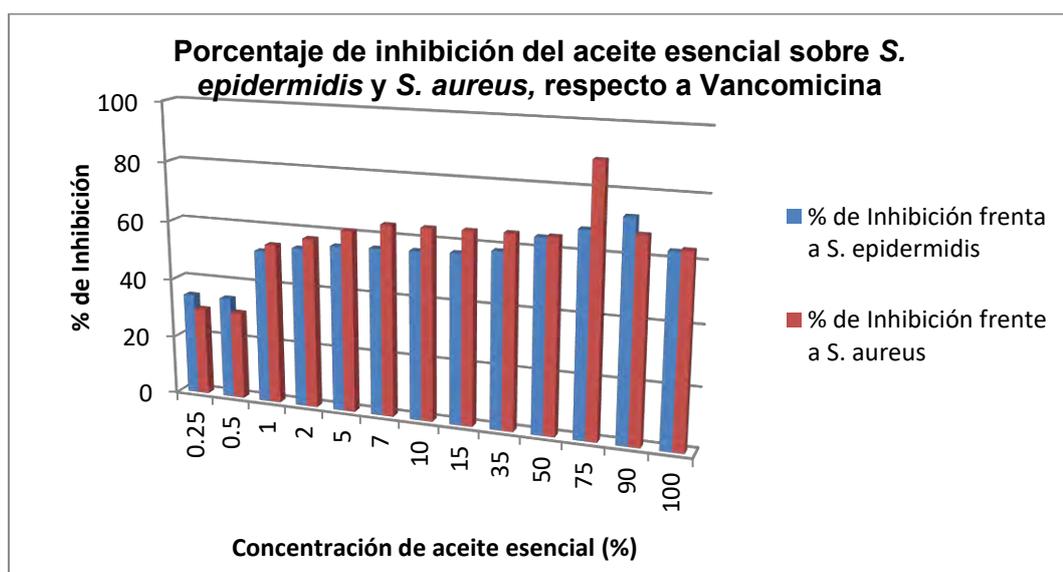


Figura N° 18- Porcentaje de inhibición del aceite esencial sobre *S. epidermidis* y *S. aureus*, respecto a Vancomicina.

- A 0.25 % y 90 % de concentración de aceite esencial tienen un 34.4 % y 72.65 % de Inhibición, respectivamente, frente a *S. epidermidis*.
- A 0.25 % y 75 % de concentración de aceite esencial tienen un 29.81 % y 89.12 % de Inhibición, respectivamente, frente a *S. aureus*.

La tabla N° 19, muestran los porcentajes de Inhibición del aceite esencial de *S. saxicola wedd*, frente a *S. epidermidis* y *S. aureus* respecto a Cefalexina, a diferentes niveles de concentración.

**Tabla 19.-Efecto inhibitorio del aceite esencial de *S. saxicola wedd*, frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, respecto a Cefalexina.**

Concentración (%)	% de Inhibición frente a <i>S. epidermidis</i>	% de Inhibición frente a <i>S. aureus</i>
0.25	19.65	18.83
0.5	19.65	18.83
1	29.61	34.27
2	30.79	36.28
5	31.84	38.61
7	32.07	40.52
10	32.26	40.55
15	32.53	40.71
35	33.54	40.9
50	36.69	40.9
75	38.68	56.31
90	41.5	42.62
100	36.1	40.36

De acuerdo a la siguiente figura (Figura N° 19), observamos que:

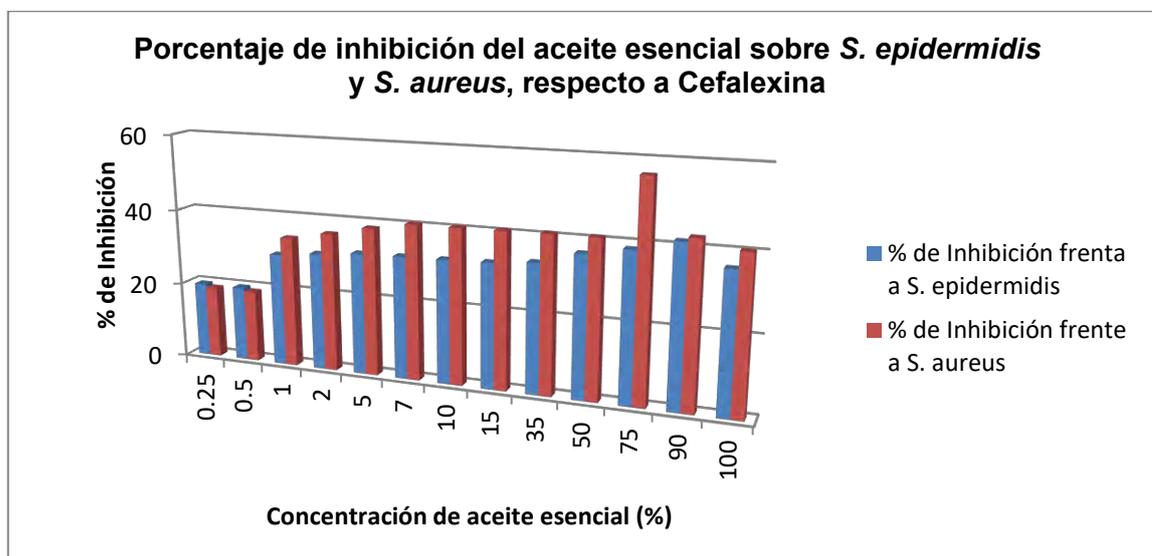


Figura N° 19-Porcentaje de inhibición del aceite esencial sobre *S. epidermidis* y *S. aureus*, respecto a Cefalexina.

- A 0.25 % y 90 % de concentración de aceite esencial tienen un 19.65 % y 41.5 % de Inhibición, respectivamente, frente a *S. epidermidis*.
- A 0.25 % y 75 % de concentración de aceite esencial tienen un 18.83 % y 56.31 % de Inhibición, respectivamente, frente a *S. aureus*.

Los resultados para la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio saxicola wedd*, fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Los resultados de esta prueba fueron:  $\alpha = 0.000$  y  $\alpha = 0.000$  para la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Estos resultados muestran que hubo alguna diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre las medias de los tratamientos. Por tanto, se procedió a la aplicación de la prueba de comparación Múltiple de Scheffé utilizando un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$ . Así se determinó que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. saxicola wedd*, es dosis dependiente.

De los resultados obtenidos, respecto a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *S. saxicola wedd* frente a *Staphylococcus aureus* se obtuvo un halo de inhibición significativo del crecimiento microbiano, evidenciando un diámetro de 12.67 mm. Respecto a la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* también se obtuvo un halo de inhibición significativo del crecimiento microbiano, evidenciando un diámetro de 17.94 mm.

Según el estudio, el grado de sensibilidad bacteriana se clasificó en nulo (inferior o igual a 8 mm), sensibilidad límite (8 a 14 mm), sensibilidad media (14 a 20 mm) y sensibilidad alta (superior a 20 mm). La concentración del aceite esencial al 90 % ejerce mayor efecto a *Staphylococcus epidermidis* (St16447) teniendo sensibilidad límite con 12.67 mm de diámetro. Por otro lado, la concentración de aceite esencial de 75 % ejerce mayor efecto a *Staphylococcus aureus* (M5-7) teniendo sensibilidad media con 17.94 mm de diámetro. Los porcentajes de inhibición

De los resultados del porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial de *S. saxicola Wedd*, las concentraciones de 90 % y 75 % tuvieron mayor porcentaje de inhibición frente a *S. epidermidis* y *S. aureus*, con el 72.65 % y 89.12 %, respectivamente comparado con vancomicina. Las concentraciones de 90 % y 75 % tuvieron mayor porcentaje de inhibición frente a *S. epidermidis* y *S. aureus*, con el 41.5 % y 56.31 %, respectivamente, comparado con cefalexina.

Por tanto, de los resultados del presente estudio se evidenció que el aceite esencial de *S. saxicola wedd*, presentó actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *S. aureus*, en sus diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 15, 35, 50, 75,

90 y 100 %), este hallazgo demuestra que *S. saxicola wedd*, presenta principios bioactivos que participan en la inhibición del crecimiento bacteriano.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvo el extracto de aceite esencial con un rendimiento promedio de aceite esencial de 7.7 %. Con un aspecto ligeramente viscoso, olor característico, color amarillo translucido y sabor Astringente.
- 2.- Se caracterizó el aceite esencial por sus propiedades fisicoquímicas, organolépticas y solubilidad. Los datos obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas fueron: Densidad 0.9706 g/mL, Índice de refracción 1.518, Rotación óptica (-) 0.175, Índice de acidez 0.7106, Índice de saponificación 0.2018; con una buena solubilidad en etanol absoluto, cloroformo, acetona, acetato de etilo y éter etílico.
- 3.- Se elucidó 55 componentes químicos mediante GC-MS del aceite esencial, siendo los mayoritarios 4-metileno-1-(1-metiletil)-Biciclo[3,1,0]hexano (4.65%), 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-[1s(1a,7a,8aa)]-Naftaleno (2.73%), (3S,4aR,5S,8aS)-4a,5-dimetil-3-(prop-1-en-2-il)-2,3,4,4a,5,6-hexahidronaftaleno-1(8aH) (24.97%), 9-cedranona (7.17 %), 3,4,4a,5,6,7-hexahidro-4a,5-dimetil-3-(1-metiletenil)-[3S-(3a,4aa,5a)]-1(2H)-naftalenona (41.4%).
- 4.- El aceite esencial presento un efecto inhibitorio con un halo máximo de inhibición de 12.67 mm y 41.5 % de inhibición a la concentración de 90 % frente a *Staphylococcus epidermidis* (St16447); y un halo máximo de inhibición de 17.94 mm y 89.12 % de inhibición a la concentración de 75 % frente a *Staphylococcus aureus* (M5-7).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rado Janzic BEGA, Michael; Tupayachi Herrera, Alfredo. Bioprospección de especies medicinales en el corredor vial Interoceánico Sur. Tramo II. Distrito de Ocingate. Cusco.2009.
2. Ocongate. CdcdAA. PLAN DE DESARROLLO CONCERTADO DEL DISTRITO DE OCONGATE (2007 -2018). Municipalidad Distrital de Ocongate, Quispicanchis-Cusco- Perú.; 2007.
3. Weddell H. Chloris Andina vol. 1. P Bertrand, Paris. 1855.
4. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina Editorial Universidad Nacional de la Plata. 2000.
5. Vision T, Dillon M. Sinopsis de Senecio L.(Senecioneae, Asteraceae) para el Perú. Arnaldoa. 1996;4(1):23-46.
6. Balzaretto V, Arancibia A, Marchiaro A, Arce M, Feijóo M. Variation in the composition of the essential oil of Senecio filaginoides DC. Molecules. 2000;5(3):459-61.
7. De Feo V, Urrunaga Soria E, Urrunaga Soria R, Senatore F. Chemical composition of essential oils of Senecio nutans Sch.-Bip.(Asteraceae). Flavour and fragrance journal. 2003;18(3):234-6.
8. Doral G, Wink M. Chemical composition and biological activity of the essential oils of Senecio aegyptius var. discoideus Boiss. Zeitschrift fuer Naturforschung C. 2002;57(5-6):434-9.
9. Baser K, Demirci B. The essential oil of Senecio farfarifolius Boiss. et Kotschy growing in Turkey. Journal of Essential Oil Research. 2004;16(6):558-9.
10. El Hawary S, Galal A, Yousif M, Kirillos F. GC-MS and bioactivity of the essential oil of Senecio rowleyanus Jacobs. Pharmacognosy magazine. 2008;4(16):273.
11. Dambolena J, Zunino M, Banchio E, Lucini E, Biurrun F, Rotman A, et al. Essential oil composition of three species of Senecio from Argentina. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2008;11(6):623-7.
12. Oladipupo LA, Adebola OO. Chemical composition of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two Senecio polyanthemoides Sch. Bip. samples from South Africa. Molecules. 2009;14(6):2077-86.
13. González Silvia B, Bandoni Arnaldo L, van Baren Catalina DLL, Paola CJD. EL ACEITE ESENCIAL DE "CHARCAO": SENECIO BRACTEOLATUS VAR. BRACTEOLATUS HOOK. ET ARNOTT. Naturalia. 2009:28.
14. Chen Y-G, Yang J-H, Zhang Y, Liu Y. Chemical composition of the essential oil of Senecio scandens flowers. Chemistry of natural compounds. 2009;45(1):114-5.
15. Usta A, Üçüncü O, Cansu TB, Terzioğlu S, Yayli N. Chemical composition of the essential oils from flowers of Senecio vernalis and Senecio platyphyllus var. platyphyllus. Asian journal of chemistry. 2009;21(8):6369.
16. Murari AL, Carvalho FHd, Heinzmann BM, Michelot TM, Hörner R, Mallmann CA. Composition and antibacterial activity of the essential oils of Senecio crassiflorus var. crassiflorus. Química Nova. 2008;31(5):1081-4.
17. Üçüncü O, Kahriman N, Terzioğlu S, Karaoğlu S, Yayli N. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from flowers of Senecio othonnae, s. racemosus, and s. nemorensis. Natural product communications. 2010;5(5):831-4.

18. Arancibia L, Naspi C, Pucci G, Arce M. Aromatic plants from Patagonia: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Senecio mustersii* and *S. subpanduratus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2010;9(2).
19. Mohammadhosseini M, Pazoki A, Zamani HA, Akhlaghi H, Nekoei M. Chemical composition of the essential oil from aerial parts of *Senecio gallicus* Chaix growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2010;13(6):704-9.
20. Arrabal C, Martínez FG, Paz MA, Guerrero SG. Chemical composition of essential oil of *Senecio coincy*, an endemic species of the Central Iberian Peninsula. *Natural product communications*. 2011;6(1):123-6.
21. Kahriman N, Tosun G, Terzioglu S, Karaoglu SA, Yayli N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the flower, leaf, and stem of *Senecio pandurifolius*. *Records of Natural Products*. 2011;5(2):82.
22. Pumaylle KO, Quiroz LRP, Luján DLB, Paz RJS. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (*Wiskataya*). *Scientia Agropecuaria*. 2012;3(4):291-302.
23. Murillo Choque BM, Soncco Arque C. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de chacha koma (*Senecio nutans* Schultz-Bip) de Patahuasi-Arequipa durante el almacenamiento de la hamburguesa de Carne de Vacuno: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2017.
24. Alderete Espejo H. Actividad antimicrobiana, antioxidante in vitro y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú.
25. Rodríguez R, Marticorena C, Alarcón D, Baeza C, Cavieres L, Finot V, et al. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica*. 2018;75:1-430.
26. De Ugaz OL. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición: Univ Católica Perú; 1994.
27. Bermudez M. Uso industrial de plantas Aromáticas medicinales. Unpublished ingeniería, Universidad Politécnica de Madrid. 2009.
28. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica 1973.
29. Martínez A. Aceites esenciales. In: Antioquia Ud, editor. Medellín, Colombia 2003. p. 34.
30. Montoya G. Aceites esenciales una alternativa de diversificación para el eje cafetero. Primera edición 2010.
31. Legaz R. Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible 2010.
32. Martínez EMG. Aplicación de la polarimetría a la determinación de la pureza de un azúcar. 2017.
33. Administración Nacional de Medicamentos AyTM. Farmacopea argentina. 7 ed. Argentina 2013. 2745 p.
34. Rodríguez J, Ruiz L, Santoyo S, Miranda L. Determinación del índice de acidez y acidez total de cinco mayonesas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, I. 2015;2:843-9.
35. Sevilla UPdO. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA (CC) Y CAPA FINA (TLC). *Fundamentos de Química*. Sevilla, España 2015.
36. Naturales MNdC. Cromatografía de Gases. España: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2015.

37. Payá AC. Fundamentos y funciones de la espectrometría de masas. Valencia, mayo. 2006.
38. Naturales MNdC. Espectrometría de Masas. España: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 2015.
39. Gutiérrez Bouzán M, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Gutiérrez, MC; Droguet, M" La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor" Boletín Intexter, juliol 2002, núm 122, p 35-41. 2002.
40. Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica: Elsevier Brasil; 2015.
41. Macedo M, Mateos S. Temas de bacteriología y virología médica 2006.
42. Muñoz EB. Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en staphylococcus epidermidis en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción del primer brote de staphylococcus aureus linezolid resistente: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
43. Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, et al. Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos: Especies más frecuentes y factores de virulencia. Revista chilena de infectología. 2013;30(5):480-8.
44. Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología.: McGraw Hill-Interamericana. Madrid, España; 1999.
45. García J, Cantón R, García E, Gómez M, Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2000.
46. Quispe Quispe P, Vilca A, Mérida S. Evaluación del efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial de Artemisia Absinthium L.(Ajenjo) In vivo y Ex vivo 2011.

## ANEXOS.

### ANEXO N° I.-IDENTIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA  
CERTIFICACION**

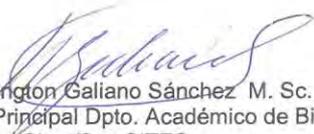
El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ) certifica que la Alumna Leonard Rodrigo Huanca Camacho Código 130091, de la Facultad Ciencias. Escuela Profesional de Química, ha, sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas a tratamiento taxonómico. En la clasificación APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group) su determinación taxonómica corresponde a:

***Senecio saxicola* Wedd.** Familia: Asteraceae. Nombre Común: "Maycha"

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteraneae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Senecio* L.
- Especie: ***Senecio saxicola* Wedd.**

Lo que se certifica para los fines concernientes al caso.

Cusco, 29 de agosto del 2018

  
Washington Galiano Sánchez M. Sc., Dr. (c).  
Prof. Principal Dpto. Académico de Biología  
Experto Científico CITES

c.c. Archivo.

## ANEXO FOTOGRÁFICO



**Foto N° 01:** Zona de recolección de la muestra vegetal especie *Senecio saxicola* Wedd.  
"Maycha", Abra de Pirhuayani – Ocongate, a 4725 m.s.n.m.



**Foto N° 02:** Selección y recolección de la especie *Senecio saxicola* Wedd. "Maycha"



**Foto N° 03:** Preparación de las muestras de la especie *Senecio saxicola* Wedd.



**Foto N° 04:** Peso de la muestra vegetal para el % de rendimiento.



**Foto N° 05:** Preparación de la muestra para la extracción del aceite esencial.



**Foto N° 06:** Proceso de extracción del aceite con el método de Hidrodestilación.



**Foto N° 07:** Obtención del aceite esencial medido con la escala de Clevenger



**Foto N° 08:** Determinación de rendimiento del aceite esencial (AE).



**Foto N° 09:** Determinación de la densidad del AE mediante un picnómetro.



**Foto N° 10:** Solubilidad del AE en diferentes solventes de polaridad creciente.



**Foto N° 11:** Medición del índice de refracción del AE mediante el refractómetro ABBE.



**Foto N° 12:** Medición de la rotación óptica mediante un polarímetro



**Foto N° 13:** Medición del índice de acidez, viraje de la titulación a un color rosa tenue.



**Foto N° 14:** Medición del índice de saponificación, proceso de ebullición y reflujo.



**Foto N° 15:** Preparación del aceite esencial para la cromatografía.



**Foto N° 16:** Preparación de la muestra para cromatografía.



**Foto N° 17:** Columna capilar HP-5MS con medidas de (30mx 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m).



**Foto N° 18:** Determinación de la composición química mediante CG-MS, temperatura inicial a 60°C



**Foto N° 19:** Preparación y esterilización de materiales para actividad antibacteriana.



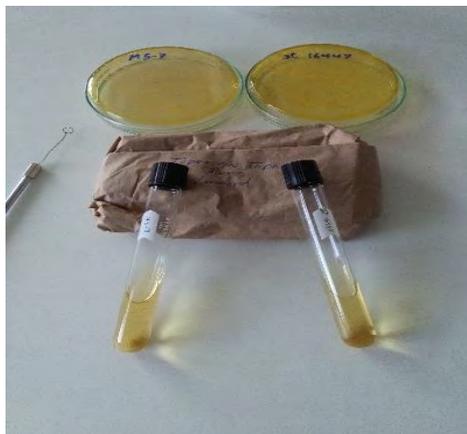
**Foto N° 20:** Preparación del manitol salado para para activar cepa criogenizada



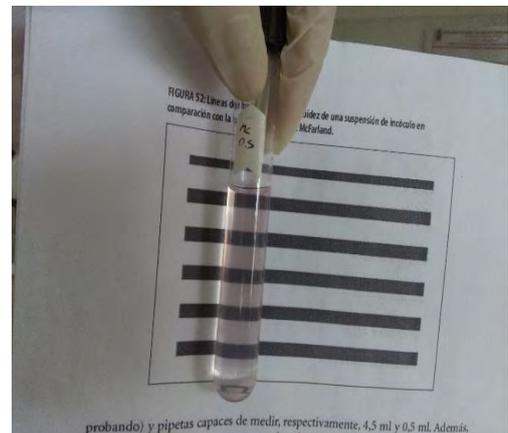
**Foto N° 21:** Sembrado en las placas.



**Foto N° 22:** Crecimiento de cepa activada.



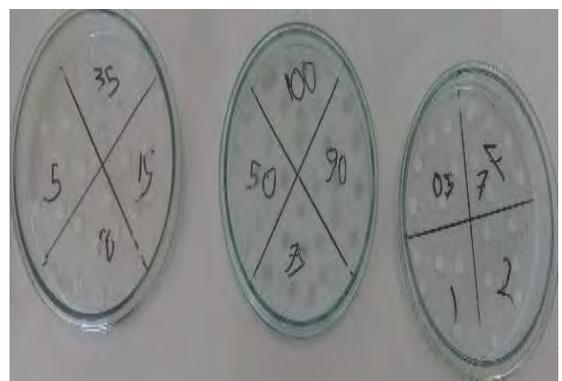
**Foto N° 23:** Muestras de *Staphylococcus* diluidos en caldo BHI



**Foto N° 24:** Ajuste de la turbidez del inoculo de acuerdo 0.5 de la escala de Mc. Farland



**Foto N° 25:** Concentraciones diferentes del aceite esencial.



**Foto N° 26:** Preparación de los discos con las diferentes concentraciones



**Foto N° 27:** Preparación de las placas Petri para la actividad antibacteriana del aceite esencial.



**Foto N° 28:** Halos de inhibición de la concentración al 5 % de aceite esencial.



**Foto N° 29:** Halos de inhibición de la concentración al 10 % de aceite esencial.



**Foto N° 30:** Halos de inhibición de la concentración al 15 % de aceite esencial.



**Foto N° 31:** Halos de inhibición de la concentración al 35 % de aceite esencial.



**Foto N° 32:** Halos de inhibición de la concentración al 50 % de aceite esencial.



**Foto N° 33:** Halos de inhibición de los fármacos patrón: Vancomicina y Cefalexina