

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



TESIS DE PREGRADO

**Actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de
palo santo (*Bursera graveolens*) sobre los microorganismos
presentes en el pez aguja (*Kajikia audax*)**

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL
DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**BACH. KEVIN CARLOS NOEL MARTINEZ
BACH. JOSE EDINSON OVIEDO CASARIEGO**

TUMBES, PERU

2019



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



Actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) sobre los microorganismos presentes en el pez aguja (*Kajikia audax*).

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL
DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**Bach. KEVIN CARLOS NOEL MARTINEZ
EJECUTOR**

**Bach. JOSE EDINSON OVIEDO CASARIEGO
EJECUTOR**

**Dr. JAVIER QUEREVALÚ ORTIZ
ASESOR**

**MSc. ROSA LILIANA SOLIS CASTRO
CO-ASESORA**

TUMBES-PERU

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DEL ACEITE ESENCIAL DE PALO
SANTO (*Bursera graveolens*) SOBRE LOS MICROORGANISMOS
PRESENTES EN EL PEZ AGUJA (*Kajikia audax*).**

PRESENTADO POR:
Bach. KEVIN CARLOS NOEL MARTINEZ
Bach. JOSE EDINSON OVIEDO CASARIEGO

JURADO EVALUADOR:

**Dr. GERARDO JUAN FRANCISCO CRUZ
CERRO**

Presidente

Mg. JOSÉ LUIS CABRERA REYES

Secretario

**Mg. JORGE OSVALDO ECHEVARRIA
FLORES**

Vocal



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS



.....
CAMPUS UNIVERSITARIO S/N "LA CRUZ"
SECRETARIA ACADÉMICA
TUMBES - PERU

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

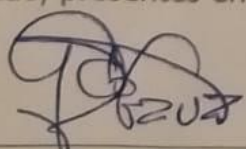
En Tumbes, a los Once día (s) del mes de noviembre de dos mil diecinueve, se reunieron en el Aula F-1 del Pabellón "F" de la Ciudad Universitaria de la UNTUMBES, los integrantes del jurado designados, según Resolución N° 107-2018//UNTUMBES-VRACAD-FCA-D (29-08-2018) y Resolución 004-2019/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D (15-01-2019) donde se aprueba el Proyecto de Tesis y ratifica el jurado; con el objeto de evaluar la sustentación de la tesis denominada: **Actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) sobre los microorganismos presentes en el pez aguja (*Kajikia audax*)**, para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial. Cuyo Asesor de la mencionada tesis es el Dr. JAVIER QUEREVALU ORTIZ.

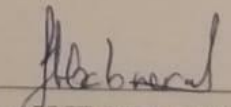
A las Once horas con Quince minutos y, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el presidente del jurado dio por iniciado el acto.

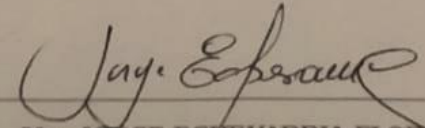
Luego de la exposición del trabajo, la formulación de preguntas y la deliberación del jurado lo declararon APROBADO por UNANIMIDAD con el calificativo de MUY BUENO.

Por lo tanto los Bachilleres: **NOEL MARTINEZ KEVIN CARLOS** y **OVIDO CASARIEGO JOSE EDINSON**, quedan aptos para que el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Tumbes, les expida el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial de conformidad con lo estipulado en el Artículo 90 del Estatuto de la Universidad Nacional de Tumbes y a lo normado en el Reglamento de Grados y Títulos.

Siendo las doce horas con cinco minutos, el presidente del jurado dió por concluido el presente acto académico y para mayor constancia de lo actuado firman en señal de conformidad todos los integrantes de este jurado, presentes en el acto de sustentación.


Dr. GERARDO JUAN FRANCISCO CRUZ CERRO
Presidente


Mg. JOSE LUIS CABRERA REYES
Secretario


Mg. JORGE ECHEVARRIA FLORES
Vocal

AGRADECIMIENTO

Agradecemos inmensamente a Dios porque sin el nada en la vida es posible; A nuestros queridos padres por sus irrepetibles e incansables consejos y su apoyo incondicional que han hecho de nosotros grandes personas, por su afecto y amor que han logrado que seamos profesionales de muchos éxitos y metas por cumplir.

Al Dr. Javier Querevalú Ortiz por su ayuda como asesor de tesis.

Nuestro cordial agradecimiento a la MSc. Rosa Liliana Solís Castro por su gran y entusiasta apoyo como nuestra co-asesora de tesis, por compartir todos sus conocimientos y experiencias que nos acompañaran en toda nuestra vida profesional.

A la Universidad Nacional De Tumbes nuestra principal casa de estudios donde pudimos formarnos como profesionales de calidad en la escuela académico profesional de agroindustrias durante toda nuestra pasantía por las aulas y por brindarnos las facilidades para el uso de laboratorios.

A toda la plana docente que pudo compartir todo su conocimiento y sus exigencias; al Dr. Gerardo Juan Francisco Cruz, al Mg. José Luis Cabrera Reyes a la Ing. Gloria Ochoa. A todas nuestras amistades que nos acompañaron, apoyaron y brindaron sus conocimientos para la redacción y ejecución del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mi familia, quienes han sido el motivo de mi inspiración dándome siempre todo su apoyo, permitiéndome saber que en medio de todas las dificultades que se pueden presentar en la vida, todo es posible si se hace con esfuerzo y perseverancia.

A mi madre Giovanna Edith Martinez Bustamante por todo su cariño y paciencia que me acompaña en todo mi recorrido como persona.

A mi padre Carlos Enrique Noel Urbina por darme un ejemplo de cómo ser un hombre de bien y luchar siempre sin rendirse.

A mi hermana Karen Lohana Noel Martinez y a Lilla Dorottya Bagi por brindarme todo su apoyo incondicional y darme esperanzas para cumplir todo lo que me propongo.

También a mis profesores que con su experiencia y capacidad como profesionales me han formado estrictamente y me han motivado para cumplir todas las metas trazadas a lo largo de mi camino como profesional.

Y por último también a mis amigos los que estuvieron conmigo cuando las cosas se pusieron difíciles y me pudieron brindar sus consejos para seguir adelante con mis metas.

Kevin Carlos Noel Martinez

A Dios, por la vida y el cuidado que nos brinda a mí y a mi familia en nuestra vida diaria.

A mi madre Carmen Casariego de Oviedo quien me brinda su amor, su apoyo incondicional y es la persona que ha hecho posible que cumpla esta meta.

A mis hermanas María y Leydi, a mi hermano Jhunior, quienes comparten mi vida diaria y me han ayudado en mi formación profesional.

José Edinson Oviedo Casariego

INDICE

AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA.....	vi
INDICE.....	viii
INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTADO DEL ARTE.....	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS.....	8
2.2.1. Aceites esenciales	8
2.2.1.1. Composición química de los aceites esenciales	8
2.2.1.2. Síntesis de los aceites esenciales	9
2.2.1.2.1. Terpenos	9
2.2.1.2.2. Fenilpropanoides/bezoides.....	10
2.2.1.3. Clasificación de los aceites esenciales.....	11
2.2.1.3.1. Consistencia	11
i. Las resinas.....	12
ii. Las oleorresinas	12
iii. Gomorresinas.....	12
2.2.1.3.2. Origen	12
2.2.1.4. Características químicas de los aceites esenciales	13
2.2.1.5. Características físicas de los aceites esenciales	13
2.2.1.6. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	14
2.2.1.7. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	15
2.2.1.7.1. Método de dilución.....	17
2.2.1.7.2. Método de difusión en agar	17
2.2.1.8. Métodos de extracción de aceites esenciales	18
2.3. Palo Santo (<i>Bursera graveolens</i>).....	19
2.3.1. Descripción taxonómica:	19
2.3.2. Hábitat.....	20
2.3.3. Descripción botánica	20
2.4. Pez Aguja (<i>Kajikia audax</i>).....	20
2.4.1. Taxonomía	21
2.4.2. Composición del pescado	22
✓ Agua	22
✓ Lípidos	22
✓ Proteínas	22
✓ Carbohidratos	23
✓ Minerales.....	23
2.4.3. Deterioro del pescado por microorganismos.....	23

2.4.3.1. Norma Nacional para productos hidrobiológicos crudos (frescos, refrigerados, congelados, salpessos o ahumados en frío)	24
3. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1. Materiales y Equipos:	25
3.1.1. Materiales experimentales	25
3.1.2. Material de laboratorio	25
3.1.3. Reactivos	26
3.1.4. Equipos.....	26
3.2. Método de investigación	26
3.3. Proceso de extracción del aceite esencial de palo santo (<i>Bursera graveolens</i>).....	28
3.4. Caracterización química del aceite esencial de palo santo	29
3.5. Características fisicoquímicas del aceite esencial	29
3.5.1. Rendimiento del aceite esencial	29
3.5.2. Obtención de la densidad	30
3.5.3. Índice de refracción	30
3.6. Aislamiento de microorganismo.	30
3.7. Preparación de la solución madre del aceite esencial	32
3.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) método de dilución en tubos.....	32
A. Preparación del inóculo	32
B. Concentración mínima inhibitoria.....	32
C. Concentración mínima bactericida	33
4. RESULTADOS Y DISCUSION	34
4.1. Características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial (<i>Bursera graveolens</i>)	34
4.2. Cromatografía de gases del aceite esencial de palo santo <i>B. Graveolens</i> .	35
4.3. Microorganismos aislados	38
4.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y concentración Mínima Bactericida (CMB).....	39
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES.....	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46
8. ANEXOS	56
Anexo 1: Anexo fotográfico	56
Anexo 2. Formulas estructurales	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos que determinan la actividad antimicrobiana de los aceites	15
Tabla 2. Composición del pescado	22
Tabla 3. Resumen de la Norma Nacional de criterios microbiológicos de los productos hidrobiológicos crudos (frescos, refrigerados, congelados, salpresos o ahumados en frío).....	24
Tabla 4. Características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i>	34
Tabla 5. Composición química del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> por cromatografía de gases.....	36
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima (CMB) bactericida del aceite esencial frente a microorganismos aislados de pez aguja (<i>Kajikia audax</i>).....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de las Fases del proceso experimental del proyecto.....	27
Figura 2. Flujograma de la Extracción de aceite esencial por el método de arrastre de vapor.	28
Figura 3. Flujograma de las Diluciones empleadas para el aislamiento de microorganismos (DIGESA, 2008).	31
Figura 4. Absorbancia del aceite esencial de <i>Bursera graveolens</i> obtenido por el espectrofotómetro UV-VIS de doble haz.	35
Figura 5. A: <i>Enterobacterias sp</i> (MK), B y C: <i>Pseudomonas sp</i> (Ps1, Ps2, Ps3) y D: levadura (lev).	38
Figura 6. CMI (azul) y CMB (rojo) del aceite esencial de <i>B. graveolens</i> sobre <i>Enterobacter sp</i>	40
Figura 7. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de <i>B. graveolens</i> sobre <i>Pseudomonas sp</i> (Ps1).	40
Figura 8. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de <i>B. graveolens</i> sobre <i>Pseudomonas sp</i> (Ps2).	41
Figura 9. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de <i>B. graveolens</i> sobre <i>Pseudomonas sp</i> (Ps3).	41
Figura 10. CMI (azul) y CMB (rojo) del aceite esencial de <i>B. graveolens</i> sobre Levaduras.	42

RESUMEN

En esta investigación se obtuvo el aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*) por el método de arrastre de vapor, el cual se caracterizó por cromatografía de gases GC-MS, obteniendo 34 compuestos de los cuales el de mayor porcentaje fue el D-limoneno (32,6%). Asimismo, se aislaron microorganismos del pez aguja (*Kajikia audax*), para luego evaluar la actividad antimicrobiana del aceite frente a dichos microorganismos. Los microorganismos fueron identificados mediante pruebas bioquímicas y de morfología microscópica. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp* y levaduras. La CMI para *Enterobacter sp* y levadura fue de 1,62 mg/ml y 6,48 mg/ml respectivamente, mientras que ambos microorganismos mostraron la CMB de 25,92 mg/ml. Las dos cepas de *Pseudomonas sp* mostraron total resistencia frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial evaluadas.

Palabras clave: *Kajikia audax*, palo santo, aceite esencial, actividad antimicrobiana, *Bursera graveolens*.

ABSTRACT

In this research, the essential oil of holy stick (*B. graveolens*) was obtained by the method of hydrodistillation, which was characterized by gas chromatography GC-MS, obtaining 34 compounds of which the highest percentage was D-limonene (32,6%). In addition, needlefish microorganisms (*Kajikia audax*) were isolated, then evaluated the antimicrobial activity of the oil against these microorganisms. Microorganisms were identified by biochemical and microscopic morphology tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (CMB) for *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp and yeasts were determined. The WCC for *Enterobacter* sp and yeast was 1,62 mg/ml and 6,48 mg/ml respectively, while both microorganisms showed THE WBC of 25,92 mg/ml. The two strains of *Pseudomonas* sp showed full resistance to the different concentrations of the essential oil evaluated.

Keywords: *Kajikia audax*, holy stick, essential oil, antimicrobial activity, *Bursera graveolens*.

1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las enfermedades transmitidas por alimentos se originan por agentes microbianos, causando un gran impacto mundial, debido a que los principales responsables de dichas enfermedades son los microorganismos patógenos (Vázquez *et al.*, 2001).

La presencia de los microorganismos en los diferentes alimentos, ya sea que causen alteración o que produzcan enfermedades, nos lleva a buscar diferentes métodos y alternativas para poder disminuir o eliminar a los microorganismos. Uno de esos métodos es el uso de sustancias antimicrobianas de procedencia natural tales como los aceites esenciales Arias, 2013; Carhuapoma *et al.*, (2009), de los cuales se evalúa su actividad antimicrobiana frente a los diferentes tipos de microorganismos existentes en los alimentos (Lujan *et al.*, 2012; Mendez *et al.*, 2017; Fray, 2018).

En esa razón, el uso de aditivos de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos para evitar su contaminación y deterioro por efecto de microorganismos patógenos, sin que se afecte las características sensoriales del alimento. Cada vez, se descubren componentes de vegetales con propiedades antimicrobianas naturales y compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, los que se consideran potencialmente seguros para su uso en la conservación y consumo de alimentos (Sauceda, 2011).

La producción de aceites esenciales a partir del palo santo (*Bursera graveolens*), permite mejorar la calidad de vida de los pobladores de la zona rural y de aquellas comunidades que están involucradas en el manejo sostenible de las áreas de conservación; toda vez que la extracción de aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) para uso industrial en el control microbiano de alimentos les proporcionara una alternativa de mayores

ingresos económicos y de diversificación del uso del palo santo como materia prima.

Además de los mencionado anteriormente, la producción de aceites esenciales naturales beneficia a la salud, así como también los recursos naturales de nuestra región sean tomados en cuenta para su aprovechamiento sustentable, mediante colectas frecuentes de los frutos, dándole un valor agregado a este producto y evitando la deforestación indiscriminada de los bosques secos.

El uso de aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) aportaría la aplicación de nuevas tecnologías para la conservación de productos comerciales, lo cual puede brindar una nueva forma de conservar los productos hidrobiológicos en una forma más natural. La investigación emplea un producto natural obtenidos a partir de plantas forestales, en este caso el aceite de palo santo (*Bursera graveolens*) dándole un valor agregado y una aplicación específica.

El panorama expuesto en los párrafos precedentes nos han permitido formular nuestro problema de investigación en la siguiente interrogante: ¿El aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) presenta actividad antimicrobiana “*in vitro*” frente a microorganismos aislados del pez aguja (*Kajikia audax*)?

Con la finalidad de abordar de manera efectiva nuestro problema de investigación, se planteó como objetivo determinar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) frente a los microorganismos presentes en el pez aguja (*Kajikia audax*), para lo cual se realizaron las siguientes actividades: a) Obtención del aceite esencial de *Bursera graveolens* por el método de arrastre de vapor, y su caracterización química, b) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) así como de la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Bursera graveolens* frente a los microorganismos aislados en *Kajikia audax*.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. ANTECEDENTES

Arias (2013), estudio la capacidad antimicrobiana “*in vitro*” del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), obtenido mediante destilación por arrastre a vapor, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Salmonella typhi* ATCC 19430. Por el método de dilución en caldo se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,31633 mg/ml, y el (CMB) de 0,36152 mg/ml para el *Staphylococcus aureus* ATCC. Mientras para *Salmonella typhi* ATCC 19430 el (CMB) fue de 0,27114 mg/ml.

Asimismo, Sierra (2017), por destilación de arrastre a vapor con agua obtuvo el aceite esencial de anís (*Pimpinella anisum* L.) de los ecotipos Curahuasi y boliviano. También determinó la actividad antimicrobiana del aceite frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Penicillium sp*, observándose que el tratamiento T3 mostró halos de inhibición de 13 mm, 12 mm y 13 mm, respectivamente. Llegando a la conclusión que el tipo Carhuasi presentó una mejor actividad antimicrobiana, y que a concentraciones de 10000 ppm se mejoraba la actividad antimicrobiana del aceite esencial.

Carhuapoma *et al.*, (2009), evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. Obteniendo parámetros del aceite: densidad con 0,9029 g/ml, índice de refracción 1,56689° y el rendimiento 2,4 v/p. Identifico la presencia de fenoles, que serían los responsables de la actividad antimicrobiana del aceite esencial. Además, determino la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *Helicobacter pylori* se determinó por el método de dilución en microplacas, resultando 2 µg/ml. Para las demás bacterias se determinó por el método de dilución, siendo para *Shigella dysenteriae* 4 µg/ml, *S. typhi* 4 µg/mL, y *Pseudomonas aeruginosa* 9 µg/ml de CMI y 10 µg/ml de CMB.

Canales *et al.*, (2017), estudiaron a *Bursera morelensis*, conocida como "aceitillo", es un árbol endémico de México. Realizaron la investigación fitoquímica y antimicrobiana del aceite esencial de *B. morelensis*. El aceite esencial fue obtenido por destilación al vapor y se analizó usando GC-MS. Se evaluaron las actividades antibacterianas. Resultando que el aceite esencial mostro la presencia de 28 compuestos. El compuesto principal del aceite esencial fue α -felandreno (32,69%). Mostrando actividad antibacteriana contra Gram positivo y cepas negativas Las cepas más sensibles fueron *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *E. coli* (CMI 0,125 mg/ml, CMB 0,25 mg/ml). El aceite esencial era bactericida para *V. cholerae*. El aceite esencial inhibió todos los hongos filamentosos. *Fusarium monilifome*.

Merino (2011), ha comentado que se ha demostrado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de salvia (*Salvia officinalis variedad alba*) (10, 5, 2,5 J.1L de aceite esencial de salvia) encapsulado en maltodextrina (0,72g), frente a *Staphyloccus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* y *E. coli*. Indicándose que dicha actividad antibacteriana de debe a los componentes presentes en el aceite esencial (cineol, 20%; limoneo, 9%; y citral, 1,2%).

Robles *et al.*, (2005), realizaron pruebas antimicrobianas de varias fracciones y extractos etanólicos de partes aéreas de *B. graveolens*. La fracción en acetato de etilo de cortezas de esta planta mostraron la mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphyloccus aureus* con una concentración de 150 mg/ml. La CMI para el extracto etanólicos de hojas frente a *S. aureus* fue de 160 mg/ml, mientras que para el de corteza fue de 190 mg/ml. La CMI del extracto etanólicos de hojas fue de 170 mg/ml y la de corteza de 180 mg/ml contra el *Bacillus subtilis*. Las CMI de las diferentes fracciones fueron de 50 mg/ml.

Fray *et al.*, (2018), evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm; *Bursera graveolens*, (Kunth) Triana y Planch, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. y *Curcuma longa* (L.), fue evaluada mediante difusión en discos, también determinaron la concentración mínima inhibidora de estos aceites frente a *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *A. niger* y *P. citrinum*; *O. quixos* y *B. graveolens* los cuales mostraron fuerte actividad antimicrobiana mientras que los otros no mostraron tanta actividad antimicrobiana el aceite esencial de *Ocotea quixos* presento mayor actividad antimicrobiana y el *E. coli* fue el microorganismo con mayor resistencia con una (CMI) de 5 µl/ml. Por otro lado, el aceite esencial de *B. graveolens* mostro una fuerte actividad sobre las bacterias con valores de (CMI) en el rango de 0,005 y 0,5 µl/ml. De todos los microorganismos estudiaron el más sensible para este aceite esencial fue el *S. aureus* que mostro la (CMI) más baja con 0,005 µl/ml.

Luján *et al.*, (2012), evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *B. graveolens* y de *Taxoduim mucronatum*. El aceite esencial de obtenido *B. graveolens* presento un aroma suave, y sabor picante en cuanto a color un amarillo intenso; el rendimiento de extracción fue de 0,10% p/p (b.h.) mientras su densidad fue de ρ : 0,8281 g/ml; su índice de refracción: 1,4790°, con y su punto de ebullición de 130-140°C esto según las normas del AOAC 920,212; 920,142; 921,08; 920,157. El método de extracción del aceite fue la destilación de arrastre de vapor de la parte aérea. El aceite fue analizado por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los principales constituyentes del aceite esencial de *B. graveolens* fueron limoneno (42,90%), β -ocimeno (17,39%), β -elemeno (11,82%), mentofurano (6,79%). La *B. graveolens* no mostro efecto antimicrobiano sobre las bacterias gran (-) *E. coli* y *Citrobacter freundii*. Por otro lado *S. aureus* solamente mostró inhibición en presencia del aceite de *B. graveolens* con una (CMB) de 7,45 mg/ml y *Bacillus subtilis* fue la bacteria más

susceptible al aceite esencial de *Bursera graveolens* inhibiéndose a una concentración de 7,29 mg/ml. En cuanto a las levaduras estas presentaron mayor porcentaje de inhibición que las bacterias, se obtuvieron concentraciones de 1,71 mg/ml a 11,99 mg/ml para 1g de suspensión bacteriana (aprox 10⁶ UFC/ml). *S. aureus* mostro inhibición con un CMB de 7,45 mg/ml y *B. subtilis* con una concentración de 7,29 mg/ml. *Saccharomises cerevisiae* mostro una mayor resistencia que *Candida utilis*.

Por su parte, Leyva *et al.*, (2007), aplicaron el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y analizado por GC-MS para obtener la composición química de aceite esencial esta fue determinada en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890 Plus. Para hojas y tallos de *Bursera graveolens* (familia Burseraceae), los componentes encontrados de mayor porcentaje en el aceite de hojas fueron limoneno (48,3%), óxido de cariofileno (13,6%) y trans-cariofileno (8,1%). Por otro lado, el aceite de los tallos dio como resultados principalmente el limoneno (42,1%), mirceno (19,8%) y mentofurano (14,7%). Los compuestos Z-b-ocimeno (14,3%) y mentofuranos presentes en el aceite de tallos, no fueron encontrados en el aceite de hojas.

También el aceite esencial se ha extraído de las ramas caídas del árbol *B. graveolens* como es el estudio de Mendez *et al.*, (2012). Quienes para probar algunas de sus propiedades, examinaron las actividades antimicrobianas del aceite de palo santo *B. graveolens* obtenidos del norte de Perú. Sobre la base de las mediciones del diámetro de la inhibición del crecimiento (Agar Disc Diffusion method), las actividades antimicrobianas que van de moderadas a altas se rebelaron contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* y *Candida albicans*. Este estudio confirma que el aceite esencial de *B. graveolens* demuestra propiedades antimicrobianas significativas. Sobre la composición de este aceite esencial, fue sometido a hidrodestilación

y análisis por cromatografía de gases equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se identificaron 26 compuestos, que representan el 67,1 % del total. El compuesto más abundante fue –Terpineno (31,57%). Por lo tanto, diferentes tipos de monoterpenos eran los componentes predominantes del aceite esencial.

Otras actividades como la actividad repelente del aceite esencial de *B. graveolens* Jacq. ex L. fue evaluada por Ruiz, *et al.*, (2018), contra *Tribolium castaneum*, aplicando el método de área de preferencia. Mostrando en sus resultados diferencias significativas ($p < 0,005$) entre el área tratada y no tratada en las dosis 0,02 y 0,2 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ después de dos horas de exposición. Dicha actividad decreció al aumentar el tiempo de exposición. El aceite esencial de *B. graveolens* podría ser un repelente efectivo contra este insecto plaga.

Young *et al.*, (2007), analizaron cuantitativamente el aceite esencial de *Bursera graveolens* (Kunth) empleando el GC FID Hewlett-Packard GC 6890. Los compuestos en los aceites fueron identificados por GC el aceite esencial fue obtenido por el método de destilado al vapor de la parte del tallo de *B. graveolens*. En el aceite se encontró que consistía en monoterpenos (78,2%) y sesquiterpenos (9,6%). El principal compuesto encontrado de *B. graveolens* fue limoneno (58,6%) y α -terpineol (10,9%).

La mayoría de las investigaciones demuestran las actividades antimicrobianas, así como de la composición química del aceite esencial de *B. graveolens*, pero pocas, por no decir escasas, determinan otras características como rendimiento, índice de refracción y absorbancia. Tal es el caso de Cruz *et al.*, (2013), quienes evaluaron el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales de *B. graveolens* y *Myroxylon peruiferum*. Los aceites esenciales fueron extraídos por arrastre de vapor, encontrando un rendimiento de 0,078%, una densidad de 0,890 g/ml, un índice de refracción

de 1.486° y una absorbancia de 293 nm. Así mismo, se analizó el aceite esencial obtenido de las hojas de *B. graveolens* mediante cromatografía de gases, encontrando que los principales componentes fueron limoneno (60,98%), β -cariofileno (7,03%), viridiflorol (2,44%), γ -elemeno (2,14%), mentofurano (1,9%) y 1-felandreno (1,68%).

2.2. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS

2.2.1. Aceites esenciales

Se definen como la combinación de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, otorgan un aroma característico a algunas flores, arboles, frutos, hierbas, especias y semillas. Son productos químicos intensamente aromáticos, no grasos, volátiles que se evaporan rápidamente y con poca densidad. Los aceites son insolubles en agua, sutilmente solubles en vinagre y completamente solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.1.1. Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se componen especialmente de terpenos y fenilpropenos: los terpenos incluyen unidades de cinco carbonos llamados isopreno (2-metil-1.3-butadiona). El isopreno se clasifica en monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$) y triterpenos ($C_{30}H_{48}$), (Xue *et al.*, 2004; Acevedo *et al.*, 2013 y Govindarajan *et al.*, 2016).

Los fenilprpenos tienen un anillo aromático de seis carbonos con una cadena lateral de tres carbonos. Se ha determinado que hay más de 1000 monoterpenos y 3000 sesquiterpenos, y solo se han descritos fenilpropenos.

También otros componentes importantes son los fenoles, esteres fenólicos, ácidos esterificados, lactonas, óxidos, acetales, aminas y compuestos con nitrógeno (Lee *et al.*, 2005) y (Ricaldi, 2006).

2.2.1.2. Síntesis de los aceites esenciales

2.2.1.2.1. Terpenos

En investigaciones químicas de aceites esenciales en el siglo XIX encontraron que los compuestos responsables de los olores delectables estaban compuestos exactamente 10 átomos de carbono a los cuales se les dio el nombre de terpenos si son hidrocarburos terpenoides contienen oxígeno y son alcoholes, cetonas o aldehídos (Ocampo *et al.*, 2008).

Se componen de la mayor clase de plantas de grandes metabolitos volátiles representantes; todos los terpenos se forman a partir de precursores universales de cinco carbonos, isopentenil difosfato (IPP) y su isómero alílico difosfato de dimetilalilo (DMAPP), que proviene de dos vías. En el citosol, se sintetiza el IPP, de tres moléculas de acetil-CoA; vía acida (MVA) mientras que en plástidos deriva del piruvato y gliceraldehído 3-fosfato a través de la vía de metil-eritritol-fosfato (MEP), (Dudareva *et al.*, 2006).

Un rango extenso de estructuras de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos cíclicos y acíclicos se producen por enzimas conocidas como las terpenosintetasas. La propiedad más dominante de estas enzimas es la facilidad para hacer productos múltiples a partir de un sustrato simple fenil-di-fosfato. En algunos estudios han logrado aislar y caracterizar hasta 100 terpenos de diferentes plantas (Martin *et al.*, 2004 y Dudareva *et al.*, 2006).

2.2.1.2.2. Fenilpropaniodes/bezoides

Estos componentes derivados de L-fenilalanina, constituyen una clase de componentes volátiles estructuralmente diversos y que además están involucrados en la reproducción y defensa de las plantas. En el primer paso de la biosíntesis de los fenilpropanoides, la L-fenilalanina (Phe) es convertida a ácido trans-cinámico en una reacción catalizada por la L-fenilalanina amonio liasa (PAL). En los siguientes pasos comparte con la vía de la síntesis de lignina/lignano la formación de fenilpropenol (monolignol). Ácidos hidroxicinámicos, aldehídos y alcoholes son formados por la vía del ácido trans-cinámico. Algunos intermediarios pueden ser convertidos a componentes volátiles como en el caso del

eugenol y el isoeugenol, de la albahaca y la petunia, los cuales son formados a partir del acetato coniferil, en una reacción catalizada por la eugenol y la isoeugenol sintetasas. Los benzoides, también se originan del ácido trans-cinámico por la vía alterna del fenilpropanoide (Boatright *et al.*, 2004).

2.2.1.3. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Vargas y Bottia, 2008)

2.2.1.3.1. Consistencia

- ✓ Esencias
- ✓ Balsamos
- ✓ Resinas

Los bálsamos son extractos naturales que son obtenidos de un árbol. Se caracterizan su alto contenido de ácido benzoico y cinámico y ésteres. Su densidad es alta, son poco volátiles y tienden a sufrir reacciones de polimerización, ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. (Vargas y Bottia, 2008).

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

i. Las resinas

Son productos defectuosos sólidos o semisólidos de naturaleza química compleja. Pueden ser de origen fisiológico o fisiopatológico. (Vargas y Bottia, 2008).

ii. Las oleorresinas

Se constituyen de mezclas homogéneas de resinas y aceites esenciales. son utilizados para nombrar los extractos vegetales obtenidos mediante el uso de solventes, esos deben estar virtualmente libres de dichos solventes. Tienden a tener el aroma de las plantas en forma muy concentrada y son líquidos muy viscosos. (Vargas y Bottia, 2008).

iii. Gomorresinas

son extractos naturales obtenidos de un árbol. Son mezclas de gomas y resinas (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.1.3.2. Origen

- ✓ Naturales
- ✓ Artificiales
- ✓ Sintéticos

Los naturales se obtienen directamente de la planta sin sufrir modificaciones químicas ni físicas. En cambio, los que son artificiales

se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia. (Vargas y Bottia, 2008).

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

2.2.1.4. Características químicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales presentan en su composición química una proporción de hidrocarburos con compuestos oxigenados como: cetonas, alcoholes, acetatos, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, etc. Se encuentran en las partes aéreas de las plantas, por otro lado, los hidrocarburos se concentran principalmente en las raíces. (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.1.5. Características físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales generalmente son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Cuando recién son destilados no presentan algún color o son levemente amarillos. La viscosidad es menor a la del agua, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcohol y disolventes orgánicos habituales, por ejemplo: éter o

cloroformo, y alcohol. Son arrastrables por el vapor de agua (Gómez y Escudero,1999).

2.2.1.6. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

El efecto que pueden tener los aceites esenciales frente a los microorganismos siempre es diferente, la actividad antimicrobiana se puede evaluar como la concentración mínima inhibitoria, esto significa determinar la concentración mínima requerida del aceite esencial de alguna planta que tenga la capacidad de detener el crecimiento de los microorganismos como pueden ser las propiedades bactericidas. O también la concentración mínima letal que asegure la eliminación de un 99.9% de toda la población de los microorganismos. Por lo tanto, se podría decir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende específicamente de: su carácter hidrófilo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al cual se desea eliminar (Fisher y Phillips, 2008).

Actualmente, la totalidad de estudios sobre los aceites esenciales han encontrado que su fase de vapor es efectiva contra distintas bacterias patógenas como: Gram negativas (López *et al.*, 2005). Investigaciones recientes han logrado dar como resultado que las propiedades se deben especialmente a los compuestos químicos que están en los aceites esenciales, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los que posiblemente son los responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales (Kalemba,

Kunicka, 2003). Diferentes investigadores aseguran que la actividad antimicrobiana depende especialmente de tres características: El carácter hidrófilo o hidrófobo, los componentes químicos que presenta y el tipo de microorganismo al que debe atacar (Kalemba y Kunicka, 2003; Solórzano *et al.*, 2012)

2.2.1.7. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Existen muchos métodos diferentes que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). La actividad y la evaluación de los antimicrobianos. En la tabla 1, se muestra los estudios con los métodos más comunes en los últimos años con el fin de determinar las CMI y así mismo la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. generalmente los métodos utilizados “*in vitro*” consisten en agregar un volumen ya especificado del aceite esencial anteriormente diluido (generalmente se usa en etanol metanol) o no. De frente en una caja Petri que contenga el medio de cultivo adecuado para los microorganismos de prueba, o sino tener el medio estéril para después poder inocular los microorganismos (López *et al.*, 2005).

Tabla 1. Métodos que determinan la actividad antimicrobiana de los aceites

Aceite esencial	Nombre científico	Microrganismo	CMI
orégano	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>staphylococcus aureus</i>	79,25 µg/ml
	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Liseria monocytogenes</i>	58 µg/ml
	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Escherichia coli</i>	79,25 µg/ml
		<i>solmomella</i>	64,25 µg/ml
	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Thypimunium</i>	52,25 µg/ml
	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	4,5 mg/ml
Eucalipto blanco	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Escherichia coli</i>	2,25
		<i>Bacillus subtilis</i>	mg/ml
Canela de cassia	<i>Cinnammomum cassia</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0,05 % p/v
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0,4 % p/v
canela	<i>Cinnammomum osmophloem</i>	<i>Salmonella sp</i>	500 µg/mL
	<i>Cinnammomum osmophloem</i>	<i>Escherichia coli</i>	250 µg/mL
	<i>Cinnammomum osmophloem</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/mL
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,03 % v/v
	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	0,03 % v/v
Tomillo	<i>Thymus zygaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	12,5 µg/l
	<i>Thymus zygaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25 µg/l
Romero	<i>Rasmarinus officinalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µg/l
Naranja	<i>Citurs sinensis var. Valencia</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	800 µg/l
Orégano mexicano	<i>Lippia berlandiere Sachauer</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	1,470.6 µg/l
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	17,5 µg/l
	<i>Cinnamomum zeylanicium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	34,9 µg/l
Tomillo	<i>Thymuus vulgaris L.</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	17,5 µg/l
	<i>Thymuus vulgaris L.</i>	<i>Liseria monocytogenes</i>	26,2 µg/l
Orégano	<i>Origanum vulgare L</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	62,5 µg/l
	<i>Origanum vulgare L</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	62,5 µg/l
Canela	<i>Cinnamomum aromaticum Nees</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/l

Fuente: Métodos de evaluación antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales (Reyes *et al.*, 2014).

2.2.1.7.1. Método de dilución

Generalmente este método es usado para bacterias y hongos, pero la modificación con caldo líquido solo se utiliza para hongos, el cultivo puede ser preparado en placas Petri o en tubos, por otro lado, los cultivos líquidos se preparan en frascos cónicos con el volumen de crecimiento inhibitorio. (Kalemba y Kunicka, 2003).

La determinación de la actividad letal del aceite esencial, los microorganismos son transferidos del caldo líquido o al agar donde no se puede observar el crecimiento en un medio nuevo. se reconoce la concentración mortal mínima, CMB para las bacterias (concentración mínima inhibitoria) y CMF para los hongos (concentración mínima fungicida). Y no tan común la CML (concentración mínima letal). (Kalemba, 2003).

2.2.1.7.2. Método de difusión en agar

Este método consiste en evaluar el grado de inhibición frente al crecimiento de los microorganismos y los cambios morfológicos. Se inocula el microorganismo

de prueba en una placa Petri con agar; son dos métodos posibles los que existen para la incorporación del aceite esencial son: 1) en disco de papel (Omer *et al.*, 1998) 2) en un pozo en medio de agar (Lis Balchin *et al.*, 1998). Normalmente el aceite esencial no se usa puro, para ello se utilizan sus soluciones. Se preparan soluciones del aceite esencial en concentraciones diferentes en las placas Petri y los discos se someten a inmersión. Luego se almacenan por un tiempo esto para que todos los mecanismos del aceite esencial se propaguen dentro del agar después se incuban. La efectividad del aceite esencial es confirmada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor del disco (Kalemba, 2003).

2.2.1.8. Métodos de extracción de aceites esenciales

Existen diferentes técnicas por las cuales se puede extraer el aceite esencial se puede, tales como la destilación con vapor, hidro difusión, maceración, la extrusión mecánica (frio). Extracción con fluido supercrítico (EFS). Los diferentes aceites esenciales extraídos por los distintos sistemas pueden ser inevitables para ser refinados o procesados. Debido a una combinación apropiada de los anteriores procesos o por redestilación, fraccionamiento, cromatografía,

cristalización, tratamiento químico, etc. Dependiendo de donde venga la materia prima y la calidad de los productos y sus especificaciones (Reid y Sarker, 2006).

2.3. Palo Santo (*Bursera graveolens*)

2.3.1. Descripción taxonómica:

Reino	: Vegetal
Division	: <i>Magnoliophyta</i> (plantas con flores)
Clase	: Dicotiledónea
Orden	: Sapindales
Familia	: <i>Burseraceae</i>
Género	: <i>Bursera</i>
Especie	: <i>Graveolens</i>
Nombre científico	: <i>Bursera graveolens</i>
Nombre común	: Palo Santo
Zona de vida	: Monte espinoso premontano tropical, matorral desértico de monte espinoso tropical
Distribución	: Mayormente se distribuye a lo largo de la costa peruana, en Tumbes, Piura, Lambayeque, Cajamarca, La Libertad (Puescas, 2010).

2.3.2. Hábitat

El Palo Santo (*Bursera graveolens*) se puede encontrar en México, Cuba, islas galápagos y al norte del Perú. Es un árbol caducifolio y crece en la parte baja de las vertientes occidentales del norte peruano, en Tumbes, 800 a 1200 m.s.n.m. Se encuentra a escasos metros de nuestro océano pacífico en el departamento de Tumbes; también se encuentra en los distritos de Papayal, Matapalo, Pampas de Hospital (Puescas, 2010).

2.3.3. Descripción botánica

El árbol de *B. graveolens* está en función de la calidad del sitio y los factores ambientales, con condiciones favorables puede llegar a tener alturas de hasta 15 metros, con copa de hasta 12 metros de diámetro, al frotar con las nuestras manos el árbol de Palo Santo se puede sentir una sensación muy agradable y refrescante, esto debido a su aroma y perfume característico empieza a extenderse, siempre acompañando a otras especies. Cuando esa foliación es exuberante y es hermoso su color verde (Puescas, 2010).

Las hojas se presentan compuestas, imparipinnadas y alternas, pueden llegar a tener entre 3 a 4 pares de folíolos, pero también hasta 9 folíolos y por su borde es aserrado-dentados. Son pequeñas bifoliadas, tienen un aroma característico a las demás partes del árbol. Esta especie inicia su proceso de floración a fines de abril, esto se en algunos sectores de la región Tumbes (Puescas, 2010).

2.4. Pez Aguja (*Kajikia audax*)

Su cuerpo está sutilmente comprimido. Extremadamente largo, robusto, y redondo en sección transversal. Nunca visiblemente elevada. Lóbulo anterior de la primera aleta dorsal afilada y más alta que el resto de la aleta. Membranas de las Aletas pélvicas no tan desarrollada, más corta que las pectorales. Las puntas de las pectorales y las primeras aletas anales

apuntadas. Pedúnculo caudal bastante comprimido (lateralmente) y ligeramente deprimido (dorsoventralmente), con fuertes quillas dobles en cada uno y una muesca poco desarrollada en las superficies dorsal y ventral. Línea lateral única pero oscurecida, especialmente en peces más grandes. Cuerpo azul oscuro dorsal y blanco plateado ventralmente; Por lo general, no hay manchas o rayas oscuras en el cuerpo en adultos, aunque pueden aparecer rayas verticales de color azul claro en algunos peces (Philippi, 1887).

2.4.1. Taxonomía

Reino	: animalia -Animal
Subkingdom	: bilateria
Infrakingdom	: Deuterostomía
Filo	: chordata – cordados
Subfilo	: vertebrata – vertebrado
Intrafilo	: Gnathostomata
Superclase	: Actinopterygii – peces con rayas espinosas
Clase	: Teleostei
Superorden	: Acanthopterygii
Orden	: Perciformes – peces como percas
Suborden	: Xiphoidei – pez lanza
Familia	: Istiophoridae – peces lanza
Género	: <i>Kajikia</i> (Hirasaka y nakamura, 1997)
Especies	: <i>Kajikia audax</i> (philippi, 1887) – marlin de rayas (Collete <i>et al.</i> , 2016).

2.4.2. Composición del pescado

La composición química varía de acuerdo a la especie y también a los individuos de una misma especie, varía de acuerdo a su edad, sexo, el medio donde se encuentran y la estación del año.

Tabla 2. Composición del pescado

Constituyente	pescado (filete)		
	Mínimo	Variación normal	Máximo
Proteínas	6	16 - 21	28
Lípidos	0,1	0,2 - 25	67
Carbohidratos	-	< 0,5	-
Cenizas	0,4	1,2 - 1,5	1,5
Agua	28	66 - 81	96

Fuentes: (Stansby, 1962; Love, 1970)

✓ **Agua**

El agua se encuentra estructurada en los músculos del pescado, el alto contenido de diferentes sustancias que favorecen disueltas en este medio, ayudan al crecimiento de microorganismos, por eso es que se pueden deteriorar rápidamente (Rodríguez, 1986).

✓ **Lípidos**

La cantidad de grasa en los peces varía dependiendo la edad, especie, el tipo de alimentación (Pérez y Salmerón, 1989).

✓ **Proteínas**

El pescado contiene un muy elevado valor de proteínas biológicas, principalmente destacan porque a parte de contener a los aminoácidos esenciales en buenas concentraciones, son

ricos en lisina y tienen un alto contenido en metionina y triptófano (Escoboza y Nieto, 1992).

✓ **Carbohidratos**

Contienen muy bajas concentraciones de carbohidratos (Pérez y Salmerón, 1989).

✓ **Minerales**

Los peces tienen una excelente reserva de minerales; contienen una buena cantidad de yodo, fósforo, y en algunas ocasiones de calcio, pero en bajas cantidades están el hierro (Escoboza y Nieto, 1992).

2.4.3. Deterioro del pescado por microorganismos

El pescado es uno de los alimentos que está más susceptible al deterioro debido a su pH, a la alta actividad de agua, al contenido de nutrientes, al contenido de lípidos insaturados, a la rápida acción destructiva de las enzimas presentes y a la alta actividad metabólica de microorganismos (Liston, 1982; Sikorski *et al.*, 1994).

Bacterias, hongos y levaduras son los principales microorganismos causantes que generan el deterioro de los alimentos, estos microorganismos pueden consumir los nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y minerales) que se encuentran en el alimento, llegando a multiplicarse cada vez más y originando sustancias que pueden ser tóxicas para el ser humano. El deterioro y la alteración microbiológica de los alimentos es muy importante debido a que estos son los causantes de enfermedades hacia el ser humano afectando así la salud pública (Barreiro *et al.*, 1994).

2.4.3.1. Norma Nacional para productos hidrobiológicos crudos (frescos, refrigerados, congelados, salpresos o ahumados en frío)

Se define la calidad de un alimento en la ausencia o presencia y también en la cantidad de microorganismos aceptables o aptos para el consumo humano cuando cumpla con los criterios microbiológicos establecidos en esta norma sanitaria. (RM. N° 615-2003-SA/DM-30/05/2003).

Tabla 3. Resumen de la Norma Nacional de criterios microbiológicos de los productos hidrobiológicos crudos (frescos, refrigerados, congelados, salpresos o ahumados en frío).

AGENTE MICROBIANO	CATEGORIA	CLASE	n	C	LIMITE POR g	
					M	M
<i>Aerobios Mesófilos</i> (30 °C)	1	3	5	3	5×10^5	10^6
<i>Escherichia coli</i>	4	3	5	3	10	10^2
<i>Saphylococcus aureus</i>	7	3	5	0	10^2	10^3
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	-----

Referencia: Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos. RM. N° 615-2003-SA/DM-30/05/2003.

En la tabla 3, se muestra los criterios microbiológicos productos hidrobiológicos crudos (frescos, refrigerados, congelados, salpresos o ahumados en frío). Se observa que la *salmonella sp* debe ser ausente en estos alimentos ya que pueden provocar problemas a quienes consumen este tipo de alimentos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales y Equipos:

3.1.1. Materiales experimentales

- Palo santo (*B. graveolens*)
- Pez aguja (*Kajikia audax*)

3.1.2. Material de laboratorio

- Bisturí.
- Micropipeta
- Vaso de precipitados.
- Termómetro.
- Pinzas.
- Matraz de fondo redondo.
- Embudo de decantación.
- Tubos de cultivo
- Agua destilada.
- Algodón.
- Frascos de vidrio.
- Cuchara espatulada de metal.
- Piseta.
- Probetas.
- Agitador orbital.
- Papel filtro.
- Tubos
- puntas para micropipetas

3.1.3. Reactivos

- Agar EMB o Endo: *Escherichia coli* y enterobacterias.
- Agar Baird Parker: estafilococos
- Agar TCBS: Vibrios
- Agar SS: Salmonelas
- Agar Sabouraud: Hongos y levaduras
- Caldo Müller Hinton-MHB (Merck, Alemania).
- Agar Müller Hinton-MHA (Merck, Alemania)
- Peptona de caseína (Merck, Alemania).

3.1.4. Equipos

- Incubadora Labnet
- Autoclave GreedMet
- Refractómetro tipo ABBE *Schmidt + Haensh*
- Espectrofotómetro UV-VIS de doble Haz Perkin Elmer Lambda 365

3.2. Método de investigación

La ejecución de este proyecto de investigación se llevó a cabo en 6 fases (Fig. 1). Primero se obtuvo el aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*) por el método de destilación de arrastre de vapor, la segunda es el aislamiento de microorganismos a partir del musculo del pez aguja (*Kajikia audax*), la tercera es la identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas y morfología microscópica. La cuarta es la caracterización del aceite esencial de *B. graveolens* por el método de cromatografía de gases, la quinta la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) por el método dilución en tubos, y como fase final fue el análisis de resultados.

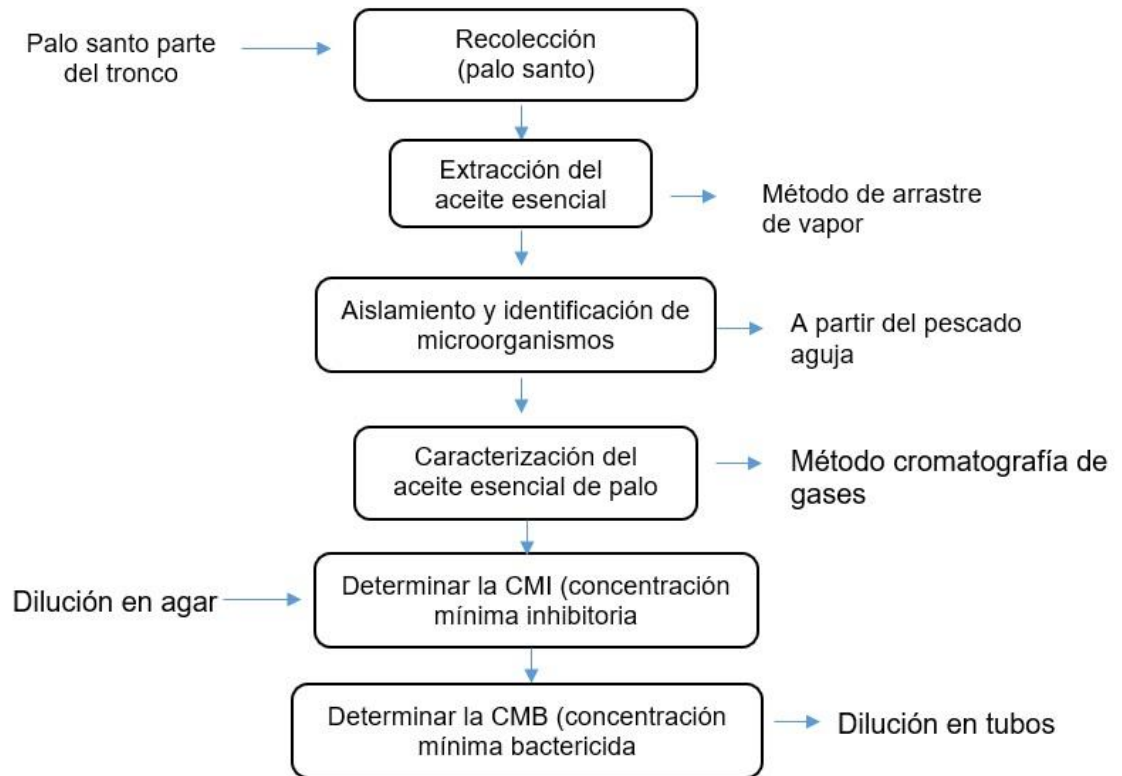


Figura 1. Flujograma de las Fases del proceso experimental del proyecto.

3.3. Proceso de extracción del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*)

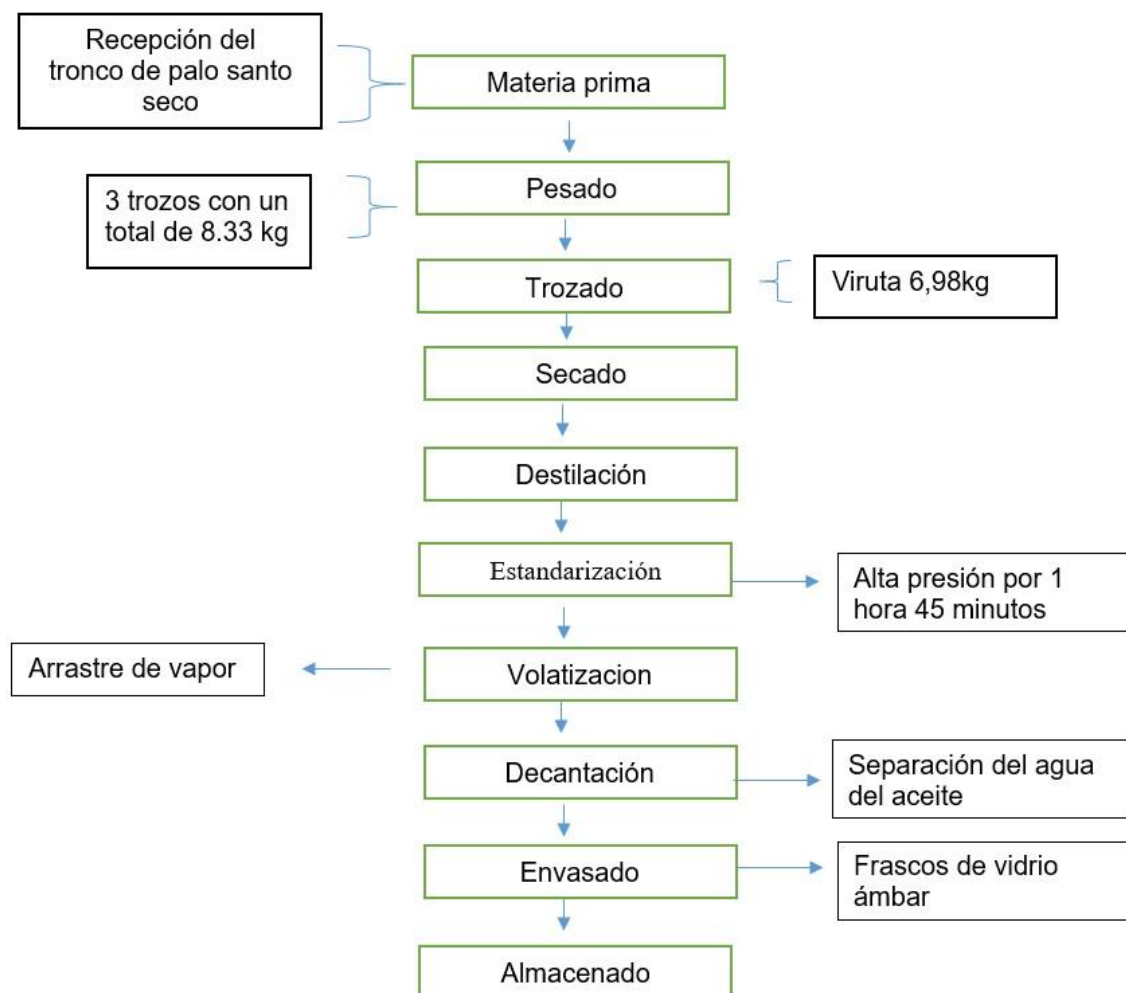


Figura 2. Flujograma de la Extracción de aceite esencial por el método de arrastre de vapor.

El proceso de extracción del aceite esencial de palo santo se realizó mediante el método “arrastre de vapor” utilizando agua, en el laboratorio de ingeniería Forestal y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de Tumbes. La materia fue obtenida del distrito de Rica Playa- - quebrada la Sesina Tumbes - Perú; estuvo conformada por 3 trozos de 2,61 kg, 3,32

kg y 2,41 kg. de los cuales con ayuda de una cepilladora eléctrica de carpintería se obtuvo en total 6,98 kg de viruta. La viruta se dispuso en una canastilla de la autoclave y sin entrar en contacto con el agua, se sometió a una fuente de calor durante 1 h 45 minutos. El vapor resultante de la autoclave circulo por el destilador, convirtiéndose en solución acuosa, de donde por diferencia de pesos se separó el aceite del agua, obteniéndose así 105 ml de aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*).

3.4. Caracterización química del aceite esencial de palo santo

La caracterización química se llevó a cabo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en la unidad de investigación en productos naturales, por cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con detector espectrofotómetro de masas Agilent Technologies 5975C. con las siguientes condiciones cromatográficas: columna J&W 122-1545.67659 DB-5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0,25 µm. Rampa de temperatura: Empieza en 40 °C y sube a 5 °C/min hasta 180 °C; 2,5 °C/min hasta 200 °C manteniéndose por 5 min y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C por 3 min. La muestra inyectada fue de 1 µl el cual fue obtenido de la mezcla de 20 µl del aceite esencial en 1 ml de diclorometano. El tiempo de la corrida fue de 54 minutos y el gas portador fue helio (1 ml/min)

3.5. Características fisicoquímicas del aceite esencial

3.5.1. Rendimiento del aceite esencial

El rendimiento del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*), se obtuvo en términos de porcentaje en peso (%) en base a la masa del material seco utilizado (Kg), utilizando la formula (Cruz *et al.*, 2013)

$$R\% = \frac{Masa.AE}{Masa.MV} \times 100$$

Donde:

R%: rendimiento en %

Masa.AE: masa de aceite esencial

Masa.MV: masa del material colocado en el extractor en g

3.5.2. Obtención de la densidad

La densidad se obtuvo utilizando un picnómetro estandarizado, este se pesó en una balanza analítica tarándolo para posteriormente vaciar la muestra de aceite esencial el resultado final sería el peso de dicha muestra (Cruz *et al.*, 2013).

3.5.3. Índice de refracción

El índice de refracción se realizó en el Laboratorio de Análisis Ambiental de la Universidad Nacional de Tumbes utilizando un refractómetro tipo ABBE *Schmidt + Haensch* (Cruz *et al.*, 2013).

3.6. Aislamiento de microorganismo.

- ✓ Se pesaron 25 g de la muestra en un recipiente previamente esterilizado y tarado.
- ✓ Luego se le adicionó 225 ml de diluyente a temperatura ambiente.
- ✓ Homogenizamos la muestra con la ayuda de un homogeneizador durante 60 segundos y se dejó sedimentar las partículas grandes por 15 minutos.
- ✓ Se transportó con una pipeta, 1 ml de la primera dilución hacia un tubo que ya debe de contener 9 ml de diluyente estéril a temperatura apropiada (Fig. 3)

- ✓ Luego se mezcló cuidadosamente con la ayuda de un homogeneizador durante un tiempo de 5 a 10 segundos así se consigue la dilución 10^{-2} .
- ✓ Se repitió el método anterior tomando 1ml de la dilución 10^{-2} . Recordando utilizar una pipeta estéril diferente para cada una de las diluciones $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$, etc. Llegando a obtener el número más conveniente de microorganismos. La selección de las diluciones dependerá del número esperado de microorganismos en la muestra.
- ✓ Se inoculó 1 ml de diluyente en un tubo o placas en el medio respectivo:
 - Agar EMB o Endo: *Escherichia coli* y enterobacterias.
 - Agar Baird Parker: estafilococos
 - Agar TCBS: Vibrios
 - Agar SS: Salmonelas
 - Agar Sabouraud: Hongos y levadura.

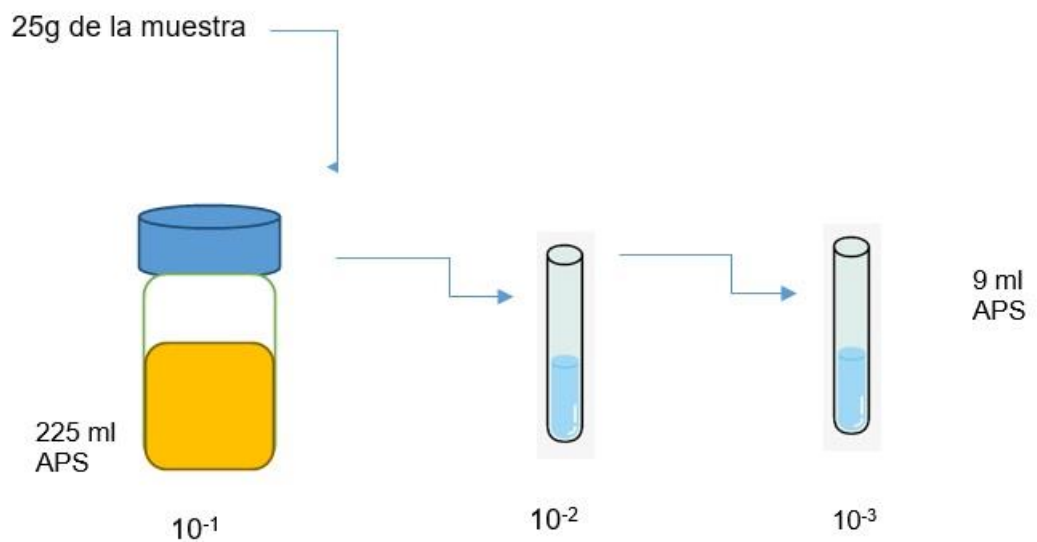


Figura 3. Flujograma de las Diluciones empleadas para el aislamiento de microorganismos (DIGESA, 2008).

3.7. Preparación de la solución madre del aceite esencial

La solución madre se preparó agregando a un matraz 2 ml de aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*), 2ml de DMSO y 12 ml de Caldo Müller Hinton-MHB (DIGESA, 2008).

3.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) método de dilución en tubos.

Para determinar si existe actividad antagónica del aceite esencial en diferentes concentraciones se utilizará la siguiente metodología.

A. Preparación del inóculo

- ✓ El inóculo se preparó permitiendo el crecimiento de microorganismos en caldo Müller Hinton hasta la turbidez de 0,5 de la escala de McFarland.
- ✓ Se diluyó la suspensión bacteriana ajustada al 0,5 de McFarland, 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica para obtener una concentración de 10^7 UFC/ml. Una vez ajustado el inóculo se utilizó dentro de 15 minutos (Malbrán, 2012).

B. Concentración mínima inhibitoria

- ✓ Se colocaron concentraciones decrecientes del aceite esencial, generalmente diluciones 1:2, preparándose en "solución madre" concentrada, para luego diluirse en caldo hasta obtener las concentraciones apropiadas.
- ✓ Se prepararon 10 tubos con las siguientes concentraciones de aceite esencial: 207,33 mg/ml; 103,67 mg/ml; 5,83 mg/ml, 25,91 mg/ml; 12,96 mg/ml; 6,48 mg/ml; 3,24 mg/ml; 1,62 mg/ml; 0.81 mg/ml; 0,41 mg/ml.
- ✓ A cada tubo se adicionó 10 µl del inóculo. Un tubo de caldo se mantuvo sin inocular como control negativo de crecimiento.

- ✓ Después de un periodo de incubación adecuada se observó la turbidez de los tubos que indica el desarrollo bacteriano. El microorganismo creció en el tubo control y en todos los que no contengan suficiente aceite esencial que sea capaz de inhibir su desarrollo. La concentración de aceite esencial que presente ausencia de crecimiento es la Concentración Mínima Inhibitoria.
- ✓ Esta capacidad antimicrobiana se probó con los microorganismos aislados del pescado (Malbrán, 2012)

C. Concentración mínima bactericida

- ✓ Después de un periodo de incubación adecuada se sembró en placa con agar Müller Hinton una asada del contenido de los tubos donde no se observó turbidez. El contenido del tubo control positivo debe desarrollar crecimiento en la placa, y en la concentración donde no aparezca crecimiento en la placa corresponderá a la Concentración mínima bactericida (Malbrán, 2012).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial (*Bursera graveolens*)

Tabla 4. Características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de *Bursera graveolens*.

Parámetro	Valor
Color	Amarillo pálido claro
Olor	Característico intenso y penetrante
Sabor	Picante
Densidad	0,83 g/ml
Estado	Líquido
Rendimiento	1,25%
Índice de refracción	1,473°

La muestra de aceite esencial fue analizada para determinar las características organolépticas y fisicoquímicas. La densidad se midió pesando la muestra en un picnómetro estandarizado, en cuanto al índice de refracción se determinó utilizando un refractómetro tipo ABBE *Schmidt + Haensch*.

Para el aceite esencial obtenido en nuestro trabajo se encontró que los valores de densidad (0,8293 g/ml), y de índice de refracción (1,473°); estuvieron cercanos a los reportados por Lujan *et al.*, (2012) y Cruz *et al.*, (2013) en aceite esencial de hojas de *B. graveolens*, que obtuvieron una densidad de 0,8281 g/ml y 0,890 g/ml y un índice de refracción 1,4790° y 1,486°; respectivamente. Respecto al rendimiento obtenido, fue del orden de 1,25%, resultando muy inferior a lo encontrado por Cruz *et al.*, (2013) con un valor de 0,10%; y estando por encima a lo encontrado por Lujan

et al., (2012) con un valor de 0,078%. Siendo el caso que las diferencias de rendimiento se explicarían porque utilizamos solamente el tronco, a diferencia de otros trabajos que utilizan las hojas para la obtención del aceite. Adicionalmente, se considera que otro factor a considerar probablemente sería la localización de donde se extrajo la materia prima y el tiempo de destilación.

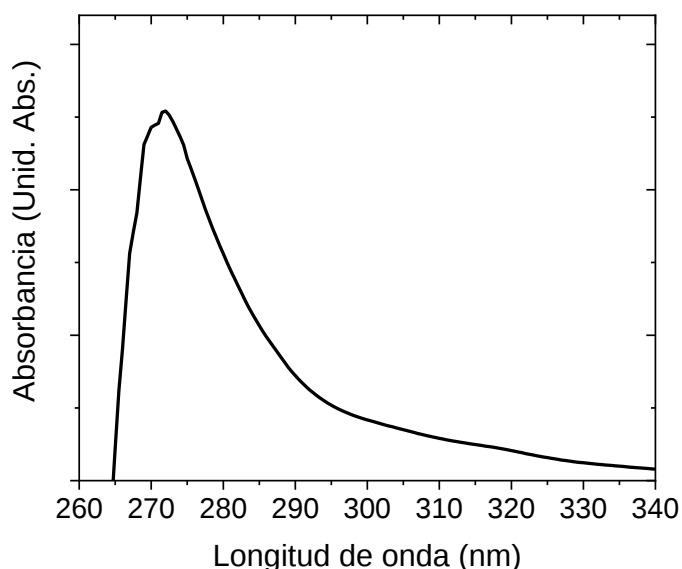


Figura 4. Absorbancia del aceite esencial de *Bursera graveolens* obtenido por el espectrofotómetro UV-VIS de doble haz.

La Figura 4 muestra que la máxima absorbancia corresponde a la longitud de onda (nm) próxima a 272,5 nm en espectro UV-VIS en el aceite esencial analizado. la cual se encuentra por debajo de la encontrada por Cruz et al., (2013) con un valor de 293 nm.

4.2. Cromatografía de gases del aceite esencial de palo santo *B. Graveolens*

Los análisis de cromatografía de gases realizados al aceite esencial extraído de palo santo, permitió la identificación 28 compuestos químicos y corresponden al 82,35% de la composición del aceite esencial, y 6 compuestos fueron desconocidos.

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Bursera graveolens* por cromatografía de gases.

Nombre del compuesto (NIST08.L)	% en la muestra (áreas relativas)
α -Pino	0,10
β -Mirreno	0,49
α -Felandreno	0,29
m-Cimeno	0,67
D-Limoneno	77,06
β -Felandreno	0,25
Eucaliptol	0,26
trans-p-Menta-2,8-dienol	0,34
cis-p-Menta-2,8-dienol	0,37
Mentofurano	5,16
α -Terpineol	4,01
Dihidrocarvona	0,10
cis-2-metil-5-(1-metiletenil)-2-Ciclohexen-1-ol	0,64
trans-2-metil-5-(1-metiletenil)-2-Ciclohexen-1-ol	0,27
Pulegona	0,34
Carvona	0,83
δ -Elemeno	0,18
Ylangeno	0,08
β -Elemeno	0,43
α -Gurjuneno	0,52
γ -Muroleno	0,25
α -Amorfeno	0,07
Germacreno D	2,33
α -Farneseno	0,16
α -Muroleno	0,08
γ -Cadineno	0,15
δ -Cadineno	0,13
β -Cadineno	0,15

En la Tabla 5, los compuestos más importantes encontrados corresponden a compuestos terpénicos, los cuales pueden ser monoterpenos, sesquiterpenos, di terpenos y algunos compuestos oxigenados. Los constituyentes mayoritarios fueron Mentofurano (5,16%), α -Terpineol (4,01%), Germacreno D (2,33%), Carvona (0,83%). Siendo el compuesto monoterpeno D-Limoneno el de mayor porcentaje con 77,06%.

Estudios relacionados de la composición química del aceite esencial de *B. graveolens* analizados el mismo método mencionan como constituyentes principales a los monoterpenos limoneno y mentofurano (Leyva *et al.*, 2007; Lujan *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en Colombia por Leyva *et al.*, (2007) quienes identificaron limoneno (42,1%) y mentofurano (14,1%), y lo realizado por Cruz *et al.*, (2013) en Perú quienes encontraron la presencia de limoneno (60,98%) y mentofurano (1,9%). Del mismo modo Lujan *et al.*, (2012) en un estudio realizado en México reporta como compuestos mayoritarios al limoneno (42,90%) y mentofurano (6,79%). A diferencia de nuestros resultados, Méndez *et al.*, (2012) encontraron como compuesto de significativa participación al terpineno (31,57%), dicho componente estuvo inexistente en el contenido del aceite obtenido en este trabajo.

Los siguientes compuestos del aceite esencial de palo santo (*Bursera graveolens*) : oxido de cariofileno, *trans*-cariofileno, *Z*- β -ocimeno, sabineno, β -pineno, (+)-2-careno, canfor, mentona, criptona, piperitone, copaeno, γ -selineno, β -selineno, (+)- δ -cadineno, α -bisabolol, β -cariofileno, viridiflorol, γ -elemeno, 1-felandreno, β -pineno, α -terpinene, *trans*-ocimene, acetato de octilo, 3-octano (amiletilcrabinol), 2R-*trans*-mentona, 2R-*cis*-mentona, linalool, isocariofileno, α -cariofileno, 1-tetradeceno, 6-Ally-o-cresol, timol, durenol fueron encontrados por cromatografía de gases por Leyva *et al.*, (2007); Lujan *et al.*, (2012); Cruz *et al.*, (2013); Méndez *et al.* (2012); pero no en este trabajo. Esto puede explicarse por algunas condiciones ecológicas de las plantas, así como de las condiciones de estación que pueden alterar las características cualitativas y cuantitativas del aceite esencial.

4.3. Microorganismos aislados

De la muestra de pescado se aislaron 6 cepas bacterianas y una cepa de levadura, siendo codificadas inicialmente como: “Mk 1, Mk 2, Mk 3, Mk 4, Mk 5, Mk 6” y el hongo se codificó como “B”. Sin embargo, 2 cepas bacterianas no resultaron viables. Las características microscópicas de las bacterias correspondieron a bacilos Gram negativos (Figura 5) y el hongo a una levadura. Al identificar los cultivos, quedaron con la siguiente codificación: Mk (*Enterobacter* sp), Ps1, Ps2 y Ps3 (*Pseudomonas* sp) y Lev (Levadura).

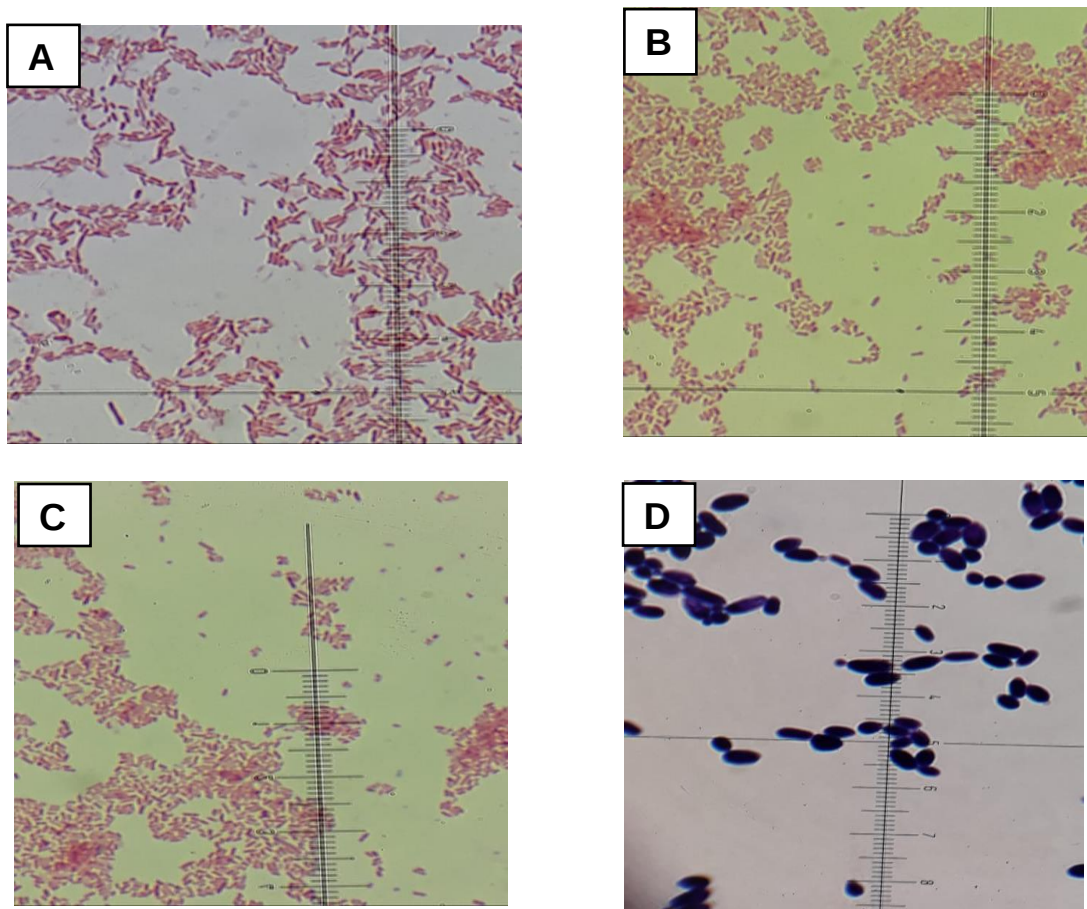


Figura 5. **A:** *Enterobacterias* sp (MK), **B** y **C:** *Pseudomonas* sp (Ps1, Ps2, Ps3) y **D:** levadura (lev).

Las cepas bacterianas y la levadura utilizadas en la evaluación microbiológica para determinar la CMI y la CMB del aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*), fueron aisladas por los autores a partir del músculo del pez aguja (*Kajikia audax*), a diferencia de otros estudios como los de Lujan *et al.*, (2012), Carhuapoma *et al.*, (2009), Arias (2013) y Fray *et al.*, (2018), quienes utilizaron cepas obtenidas de diferentes instituciones.

4.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y concentración Mínima Bactericida (CMB)

Los resultados correspondientes se expresan en las siguientes tablas. Para hallar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima bactericida (CMB) se empleó la metodología de macro dilución en tubo (Malbrán, 2012).

Las concentraciones utilizadas estuvieron en un rango de 0,4049 mg/ml a 207,326 mg/ml. En la tabla 6 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *B. graveolens*, expresados como CMI y CMB para los diferentes microorganismos. Así mismo, de la Figura 6 a la Figura 10 se puede observar las CMI y CMB.

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima (CMB) bactericida del aceite esencial frente a microorganismos aislados de pez aguja (*Kajikia audax*).

Microorganismo	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
<i>Enterobacter</i> sp	1,62	25,92
<i>Pseudomonas</i> sp (Ps1)	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp (Ps2)	ND	ND
<i>Pseudomonas</i> sp (Ps3)	ND	ND
Levadura	6,48	25,92

ND: no determinado (el microorganismo desarrollo por encima de la concentración de 207.326 mg/ml)

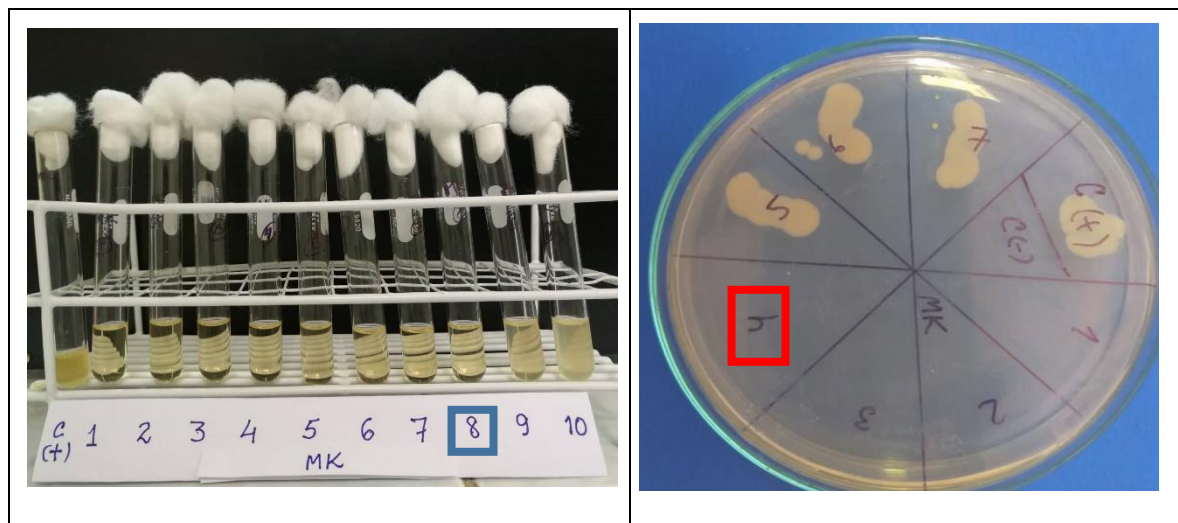


Figura 6. CMI (azul) y CMB (rojo) del aceite esencial de *B. graveolens* sobre *Enterobacter* sp

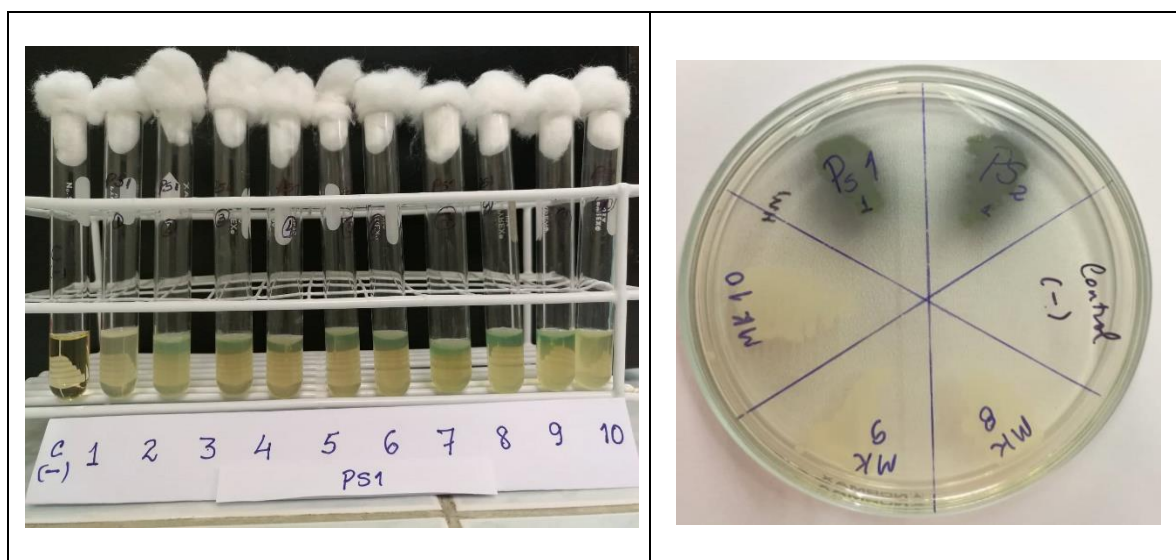


Figura 7. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de *B. graveolens* sobre *Pseudomonas* sp (Ps1)

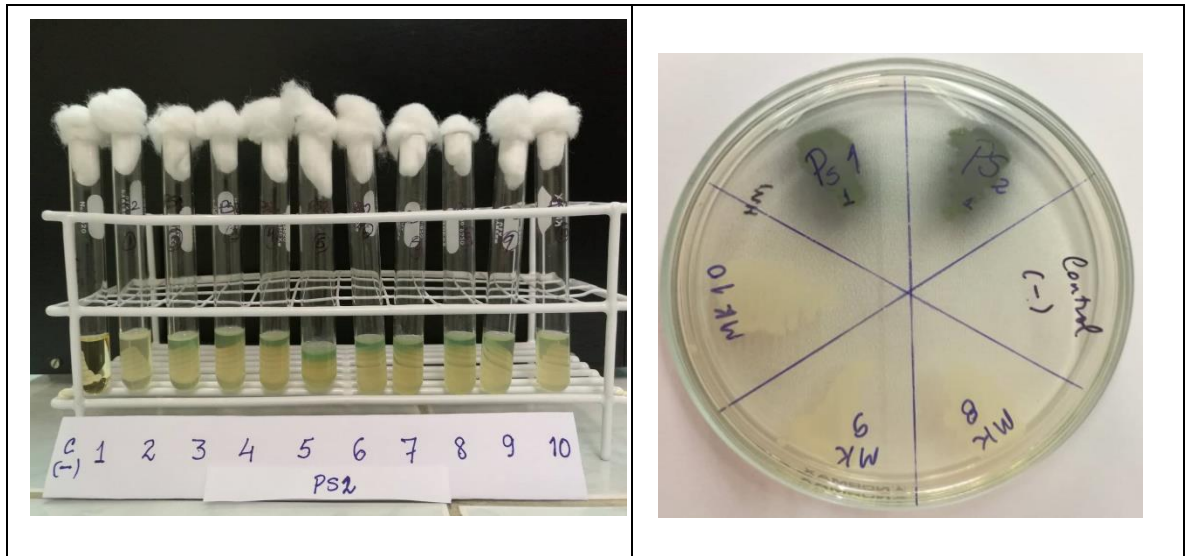


Figura 8. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de *B. graveolens* sobre *Pseudomonas* sp (Ps2).

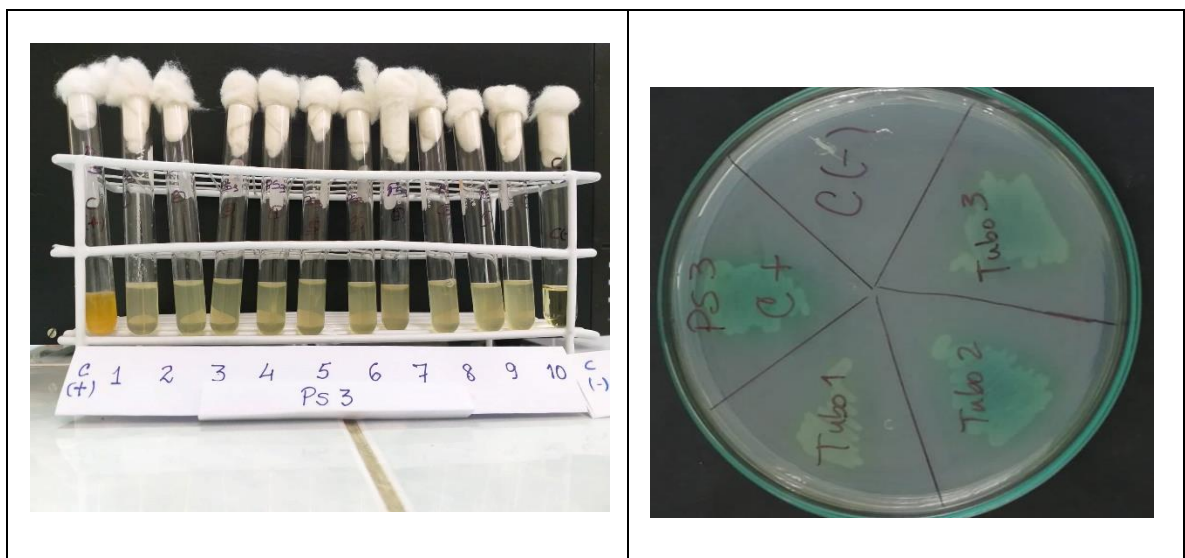


Figura 9. No existe una CMI ni una CMB del aceite esencial de *B. graveolens* sobre *Pseudomonas* sp (Ps3).

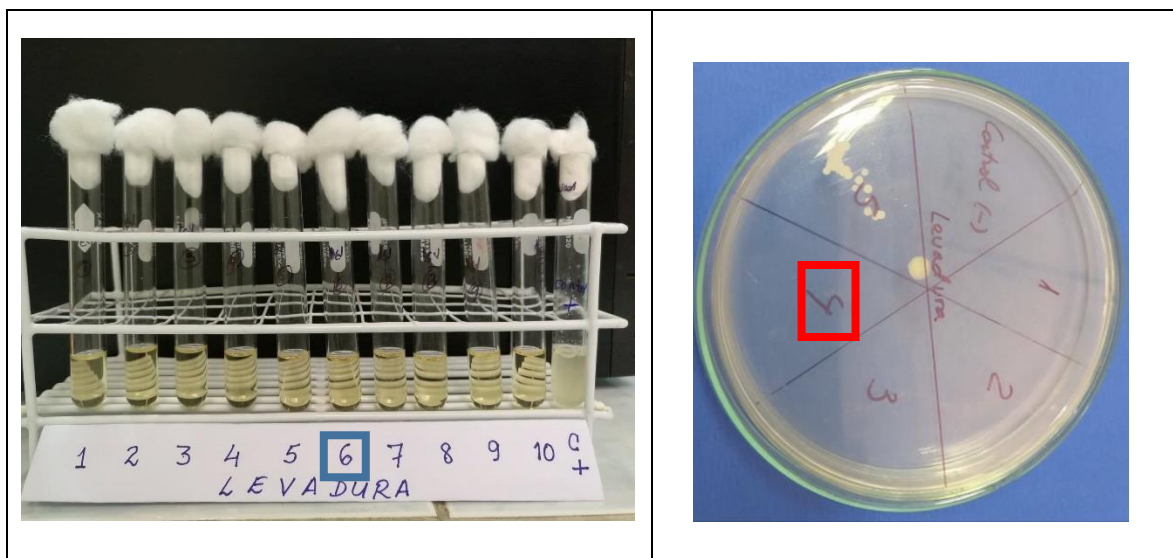


Figura 10. CMI (azul) y CMB (rojo) del aceite esencial de *B. graveolens* sobre Levaduras.

Lujan *et al.*, (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de *B. graveolens* sobre *E coli* y *Citrobacter freundii*, observándose que el aceite esencial no mostro efecto antimicrobiano sobre las estas enterobacterias. Esto podría demostrar que los aceites esenciales no muestran el mismo efecto antibacteriano con cepas de la misma familia microbiana, debido a que en *Enterobacter* sp determinamos una CMI de 1,6197 mg/ml y una CMB de 25,9156 mg/ml. Estos autores encontraron que para bacterias gram positivas como *S. aureus* la CMB fue de 7,45 mg/ml y para el *Bacillus subtilis* la CMB 7,29 mg/ml. En este caso nuestros resultados evidencian un efecto antimicrobiano más efectivo para enterobacterias.

Por su parte Méndez *et al.*, (2017) al utilizar aceite esencial obtenido de troncos secos de *B. graveolens*, demostró un 100% de inhibición contra microorganismos gram positivos, gram negativos y levaduras, debido a que se utilizó aceite esencial puro además de que los microorganismos fueron sensibles a cloranfenicol, oxitetraciclina y fluconazol.

Fray (2018), obtuvo fuerte actividad antimicrobiana del aceite esencial de *B. graveolens* sobre *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*, llegando a determinar una concentración mínima inhibidora para estas bacterias en el rango de 0,005 a 5 µl/ml así como también Canales *et al.*, (2017) encontró actividad antimicrobiana de aceite de *Bursera morelensis* contra *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio cholerae* y *E. coli* con CMI 0,125 mg / ml y CMB 0,25 mg/ml en su trabajo el aceite inhibió a los hongos filamentosos y en nuestro trabajo el aceite inhibió a las levaduras con una CMI 6,4789 mg/ml y una CMB de 25,9156 mg/ml.

Carhuapoma (2009) utilizando aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” evaluó diferentes concentraciones para enterobacterias y para Pseudomonas como *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*; obteniendo como resultado un CMI de 4 µg/mL para la *S. dysenteriae* y del mismo valor para *S. typhi*. Como CMB obtuvo un valor de 10 µg/ml para ambas enterobacterias, Así como también para, *P. aeruginosa*, de 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB; Arias (2013) encontró un CMB de 0,27114 mg/ml para *Salmonella typhi* utilizando aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), en su evaluación de la actividad antibacteriana “*in vitro*”. Estas concentraciones menores que las encontradas en nuestro estudio, determinan un mejor efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” con respecto al de *Bursera graveolens*.

El aceite esencial de palo santo (*B. graveolens*) mostró actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram negativas específicamente a *Enterobacter sp.*, y también a la levadura; pudiendo deberse al elevado porcentaje del componente monoterpeno D-limoneno; y, en menor medida de los sesquiterpenos y diterpenos encontrados en la composición química (Luján *et al.*, 2012; Méndez *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2018).

5. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de “palo santo” (*B. graveolens*) obtenido por el método de arrastre de vapor con agua en su caracterización con cromatografía de gases, presentó como principales componentes: D-limoneno (77,06%), mentofurano (5,16%), α -terpineol (4,01%), germacreno D (2,33%) y carvona (0,83%).
- En el proceso de aislamiento de los microorganismos del pez aguja (*Kajikia audax*), se lograron identificar mediante pruebas bioquímicas y de morfología microscópica bacterias que correspondieron a bacilos Gram negativos (*Enterobacter sp* y *Pseudomonas sp*: Ps1, Ps2 y Ps3) y una levadura.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Enterobacter sp* y levadura fue de 1,62 mg/ml y 6,48 mg/ml respectivamente, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) para ambos microorganismos fue de 25,92 mg/ml. Las cepas de *Pseudomonas sp* evaluadas mostraron total resistencia frente a la actividad antimicrobiana a las diferentes concentraciones del aceite esencial utilizadas.

6. RECOMENDACIONES.

Debido a la actividad antimicrobiana que muestran los aceites esenciales de plantas aromáticas, debería promoverse su uso y aplicación como componente principal en los aditivos destinados a la conservación de alimentos perecibles.

Para una mejor identificación de los microorganismos aislados en el pez aguja (*Kajikia audax*), debería recurrirse a la técnica molecular de secuenciamiento del gen 16 S rRNA para bacterias, y secuenciamiento de la región ITS para hongos.

En vista de que el presente estudio se ha evaluado la actividad antimicrobiana “*in vitro*” en las bacterias aisladas de pez aguja (*Kajikia audax*), debería desarrollarse estudios que permitan evaluar la actividad antimicrobiana como resultados de una aplicación directa sobre el alimento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013). Composición Química Del Aceite Esencial De Hojas De Orégano (*Origanum Vulgare*). *Información Tecnológica*, 24(4), 43-48.
- Amor, Rm (1970). *La Biología Química De Los Peces*. Prensa Académica. Londres.
- Arias Choque, T. G. (2013). Actividad Antimicrobiana “In Vitro” Del Aceite Esencial De *Cinnamomum Zeylanicum Breyn* “Canela” Frente A *Staphylococcus Aureus* Atcc 6538 Y *Salmonella Typhiatcc* 19430.
- Barreiro, J. A., Mendoza, S., & Sandoval, A. (1994). Higiene Y Saneamiento En La Preparación Y Servicios De Alimentos. Equinoccio.
- Bastos Oyarzabal, M. E., Damé Schuch, L. F., De Souza Prestes, L., Bender Almeida Schiavon, D., Alves Rodrigues, M. R., & Braga De Mello, J. R. (2011). Actividad Antimicrobiana De Aceite Esencial De *Origanum Vulgare* L. Ante Bacterias Aisladas En Leche De Bovino. *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 16(3), 260-266.
- Boatright, J., Negre, F., Chen, X., Kish, Cm, Wood, B., Peel, G., Y Dudareva, N. (2004). Comprensión Del Metabolismo De Los Benzenoides In Vivo En El Tejido Del Pétalo De La *Petunia* Fisiología Vegetal, 135 (4), 1993-2011.
- Borja, A., Lasso, B., & Natura, F. (1990). Plantas Nativas Para Reforestación En El Ecuador. In *Plantas Nativas Para Reforestación En El Ecuador*. Funa.

Burt, S. (2004). Aceites Esenciales: Sus Propiedades Antibacterianas Y Posibles Aplicaciones En Los Alimentos: Una Revisión. Revista Internacional De Microbiología De Alimentos, 94 (3), 223-253.

Canales-Martinez, M., Rivera-Yañez, C. R., Salas-Oropeza, J., Lopez, H. R., Jimenez-Estrada, M., Rosas-Lopez, R., ... & Rodriguez-Monroy, M. A. (2017). Antimicrobial Activity Of Bursera Morelensis Ramírez Essential Oil. African Journal Of Traditional, Complementary And Alternative Medicines, 14(3), 74-82.

Carhuapoma, M., López, S., Roque, M., Velapatiño, B., Bell, C., & Whu, D. (2009). Actividad Antibacteriana Del Aceite Esencial De Minthostachys Mollis Griseb "Ruyaq Muña". Ciencia E Investigación, 12(2), 83-89.

Clarke, S. (2008). Essential Chemistry For Aromatherapy. Second Edition. Churchill Livingstone. Elsevier. Usa. 320 P.

Collette, Bruce B, Jan R. Mcdowell, John E. Graves. (2006). Filogenia De Marlines Recientes (Xiphioidei). Boletín De Ciencias Marinas, Vol. 79, No 3. Pag. 455-468.

Cruz, César Feijoo, Lili Carrión, Minna Pirila, Riitta Keiski, Juan Cruz, G. (2013). Rendimiento Y Calidad Del Aceite Esencial De Hojas De Bursera Graveolens Y Myroxylon Peruiferum Afectados Del Área De Conservación Regional Angostura-Faical, Tumbes, Perú: Manglar - Revista De Investigación Científica. Manglar, 1.

Digesa, Métodos De Analisis Microbiologicos De Alimentos, 2008.

Dina Del Pilar Guiza. P. Y Lina Rincon P. (2007). Estudio Del Efecto Antimicrobiano Del Aceite Esencial De Minthostachys Mollis Combinado Con Inactivación Térmica, Sobre Cepas De Listeria Monocytogenes Y

Bacillus Creus. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias De Microbiologia Industrial. Pag. 3-4.

Dirección General de Salud Ambienta. 2008. Instructivo de preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico. LSA 15.4 -ML00.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, Da, Y Orlova, I. (2006). Planta Volátil: Avances Recientes Y Perspectivas De Futuro. Revisiones Críticas En Ciencias De Las Plantas, 25 (5), 417-440.

Edris, A Y Farrag. E. (2003). Antifungal Activity Of Peppermint And Sweet Basil Essential Oils And Their Major Aroma Constituents On Some Plant Pathogenic Fungi From The Vapor Phase. Journal of Food Protection. 47(2). 117-121.

Elizari Reta, Iñaki (2013). "Actividad Antibacteriana De Aceites Esenciales De Orégano Y Tomillo Incorporados En Soluciones Formadoras De Films Sobre El Microbiota Superficial De Filetes De Merluza."

Escobosa, D. Y Nieto, C.I. (1992). Elaboración De Un Producto Tipo Botana A Partir De Trigo Cristiano (Triticum Durum) Y Filete De Cozón. Tesis De Licenciatura. Departamento De Ciencias Químico-Biológicas. Universidad De Sonora.

F. Reyes-Jurado, E. Palou Y A. Lopez-Malo (2014). Métodos De Evaluación Antimicrobiana Y De Determinación De Los Componentes Químicos De Los Aceites Esenciales. Departamento De Ingeniería Química, Alimentos Y Ambiental, Universidad De Las Américas Puebla. Pag 70-72.

- Fisher, K., Y Phillips, C. (2008). Posibles Usos Antimicrobianos De Los Aceites Esenciales En Los Alimentos: ¿Es La Respuesta Los Cítricos? *Tendencias En Ciencia Y Tecnología De Los Alimentos*, 19 (3), 156-164.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, Mr, Y Reglero, G. (2012). Aislamiento De Aceites Esenciales De Diferentes Plantas Y Hierbas Mediante Extracción Con Fluidos Supercríticos. *Diario De Cromatografía A*, 1250, 34-48.
- Fray, F. M. F., Casariego, A., Falco, A. S., & Pino, J. A. (2018). Actividad Antimicrobiana De Aceites Esenciales De *Ocotea Quixos* (Lam.) Kosterm, *Bursera Graveolens* (Kunth) Triana Y Planch, *Cymbopogon Citratus* (Dc) Stapf. Y *Curcuma Longa* (L.) Sobre Microorganismos Contaminantes De Alimentos. *Ciencia Y Tecnología De Alimentos*, 27(3).
- Gomez, D., & Escudero, F. A. M. (1999). *Las Plantas De Extractos. Bases Para Un Plan De Desarrollo Del Sector*.
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, Sl, Y Benelli, G. (2016). Potencial Larvicida De Carvacrol Y Terpinen-4-Ol Del Aceite Esencial De *Origanum Vulgare* (Lamiaceae) Contra *Anopheles Stephensi*, *Anopheles Subpictus*, *Culex Quinquefasciatus* Y *Culex Tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Investigación En Ciencia Veterinaria*, 104, 77-82.
- Guillermo De Icaza Tena. (2018). *La Vida Útil De Los Alimentos Y Sus Principales Reacciones*. Innovación Editorial Lagares México.
- Güiza Pérez, Diana Del Pilar, And Lina María Rincón Prieto (2007). Estudio Del Efecto Antimicrobiano Del Aceite Esencial De *Minthostachys Mollis*

Combinado Con Inactivación Térmica, Sobre Cepas De *Listeria Monocytogenes* Y *Bacillus Cereus*. Bs Tesis. Facultad De Ciencias.

Kajikia Audax (Philippi, 1887) En La Secretaría De Gbif (2017). Gbif Taxonomía Backbone. Conjunto De Datos De La Lista De Verificación <https://doi.org/10.15468/39omei> Al Que Se Accede A Través De Gbif.Org El 2018-11-29.

Kalemba, Daak, Y Kunicka, A. (2003). Propiedades Antibacterianas Y Antifúngicas De Los Aceites Esenciales. *Química Médica Actual*, 10 (10), 813-829.

Lee, S. J., Umano, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification Of Volatile Components In Basil (*Ocimum Basilicum* L.) And Thyme Leaves (*Thymus Vulgaris* L.) And Their Antioxidant Properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.

Leyva, M. A., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2007). Composición Química Del Aceite Esencial De Hojas Y Tallos De *Bursera Graveolens* (Burseraceae) De Colombia. *Scientia Et Technica*, 13(33), 201-202.

Lis-Balchin, M., Deans, Sg, Y Eaglesham, E. (1998). Relación Entre Bioactividad Y Composición Química De Aceites Esenciales Comerciales. *Diario De Sabor Y Fragancia*, 13 (2), 98-104.

Liston J. (1982). Recent Advances In The Chemistry Of Iced Fish Spoilage. In: Martin R.E.(Ed). *Chemistry And Biochemistry Of Marine Food Products*. Wesport, Conn, Usa. Pp.27-37.

López, -Malo, A, Palou, E., Parish, M. Y Davidson, P. (2005). Methods For Activity Assay And Evaluation Of Results. En P.M. Davidson, J., Sofos, Y

A Branen, Antimicrobials In Food (3ra Edition, Capítulo 21 Págs. 659-680). Boca Ratón: Crc Press, Taylor & Francis Group.

López. P., Sanchez, C., Batlle, R. Y Nerín, C. (2005). Solid- And Vapor- Phase Antimicrobial Activities Of Six Essential Oils: Susceptibility Of Selected Foodborne Bacterial And Fungal Strains. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 53(17), 6939-6946.

Luján-Hidalgo, M. C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ventura-Canseco, L. M. C., Dendooven, L., Mendoza-López, M. R., Cruz-Sánchez, S. A. M. U. E. L., ... & Abud-Archila, M. I. G. U. E. L. (2012). Composición Química Y Actividad Antimicrobiana De Los Aceites Esenciales De Hojas De *Bursera Graveolens* Y *Taxodium Mucronatum* De Chiapas, México. Gayana Bot, 69, 7-14.

Malbrán, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *MIC testing*, 32(2), 1-43.

Matute, W. I. G. (2008). Las Penicilinas Se Dividen En Diferentes Grupos. El Primer Grupo Incluye A Las Penicilinas G Y V. Las Penicilinas G Más Utilizadas Son La Penicilina G Procaínica Y La Penicilina G Benzatínica. Rev. Fac. Cienc. Méd.

Mendez, A. H. S., Cornejo, C. G. F., Coral, M. F. C., & Arnedo, M. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial And Antioxidant Activities Of The Essential Oil Of *Bursera Graveolens* (Burseraceae) From Peru. Indian J Pharm Educ Res, 51(3), S429-S435.

Merino Torres, J. (2011). Evaluación De La Actividad Antibacteriana Del Aceite Esencial De *Salvia Officinalis* Variedad Alba Extraído Por El Método Mixto

En *Staphylococcus Aueus*, *Bacillus Cereus*, *Salmonella Spp.* Y *Escherichia Coli*.

Miguel Leyva, Jairo René, Elena E. Stashenko *Scientia Et Technica* Año Xiii, No 33, Mayo De 2007. Utp. Issn 0122-1701.

Miguel Puescas C. (2010). Estudio Dendrologico De La Especie *Bursera Graveolens* - Palo Santo, Región Tumbes. Universidad Nacional De Tumbes.

Mossel, D. "Microbiología De Los Alimentos." Editorial Acribia (Zaragoza, 2003).

Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., & Garcia, C. (2010). Extracción Y Caracterización Del Aceite Esencial De Manadarina Obtenido De Residuos Agroindustriales. *Dyna*, 77(162), 85-92.

Ochoa Pumaylle, K. (2012). Extracción, Caracterización Y Determinación De La Actividad Antibacteriana Del Aceite Esencial De Wiskataya (*Senecio Graveolens Wedd*) Sobre Dos Cepas Bacterianas.

Perez-Salmeron. (1989). *Biología Pesquera*. Edit. Cecs. México.

Reid, Rg, & Sarker, Sd (2006). Aislamiento De Productos Naturales Por Cromatografía En Columna De Baja Presión. En *El Aislamiento De Productos Naturales* (Pp. 117-157). Humana Press.

Resolución Ministerial N° 451-2006/Minsa, Disponible En:
[Http://Www.Digesa.Minsa.Gob.Pe/Norma_Consulta/Proy_Rm615-2003.Pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/proy_rm615-2003.pdf).

- Ricaldi, J. (2006). Extracción Y Caracterización Fisicoquímica Del Aceite Esencial De Chiuyche (Satureja Incana) Obtenida Mediante Arrastre De Vapor. Tesis. Facultad De Ingeniera Agroindustrial. Universidad Nacional Del Centro Del Perú. Tarma Junín Perú, 66p.
- Rivera, D. (2008). Caracterización De Aceites Esenciales Por Cromatografía De Gases De Tres Especies Del Género Piper Y Evaluación De La Actividad Citotóxica. Universidad De San Carlos De Guatemala.
- Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A. I., Piñeros, C., Ortiz, L., & Sierra, M. (2005). Triterpenos Aislados De Corteza De Bursera Graveolens (Burseraceae) Y Su Actividad Biológica. Revista Brasileira De Farmacognosia, 15(4), 283-286.
- Rodriguez, M.M. (1986). Tecnología De Productos Marinos. Edit. Pueblo Y Educación. La Habana, Cuba.
- Rogelio Ocampo C., Luz Amalia Rios V., Luz Adriana Betancur J., Diana Marcela O. (2008) Curso Práctico De Química Orgánica Enfocada A Biología Y Alimentos. Pag 36-37. Primera Edición 2008. Editorial Universidad De Caldas.
- Ruiz, M. F., Fuentes, L. Y., Ballestas, I. T., & Orozco, M. (2018). Actividad Repelente Del Aceite Esencial De Bursera Graveolens Jacq. Ex L., Frente Tribolium Castaneum Herbst, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae). In Anales De Biología (No. 40, Pp. 87-93). Facultad De Biología.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso De Agentes Antimicrobianos Naturales En La Conservación De Frutas Y Hortalizas. Ra Ximhai: Revista Científica De Sociedad, Cultura Y Desarrollo Sostenible, 7(1), 153-170.

- Sharapin, N. (2000) Fundamentos De Tecnología De Productos Fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano De Ciencia Y Tecnología Para El Desarrollo. 1era. Edición. Colombia. 179-189, 198-204, 247 P.
- Sierra Yepez, J. H. (2017). Evaluación De La Actividad Antimicrobiana In Vitro De Los Aceites Esenciales De Anís (*Pimpinella Anisum* L) Ecotipo Curahuasi Y Ecotipo Boliviano En Tres Cepas De Interés Alimentario.
- Skoog (2001). Química Analítica. 7ª. Edición. México. Editorial Mcgraw-Hill. 687-696 P.
- Solórzano- Santos, F Y Miranda- Novles, M. (2012). Essential Oils From Aromatic Herbs As Antimicrobial Agents. *Current Opinion In Biotechnology*. 23(2). 118-122.
- Stansby, Me (1962). Composición Proximal De Los Peces. En: E. Heen Y R. Kreuzer (Ed) *Fish In Nutrition*, Fishing News Books Ltd., Londres, 55-60.
- Suhr, K. Y Nielsen, P. (2003). Antifungal Activity Of Essential Oils Evaluated By Two Different Application Techniques Against Rye Bread Spoilage Fungi. *Journal Of Applied Microbiology*. 94(4) 665-674.
- Tellez Monzon, L. A. (2017). Caracterización De Los Aceites Esenciales De Seis Ecotipos De Orégano (*Origanum Vulgare* Ssp.) Procedentes Del Valle De Urubamba-Cusco; Perú.
- Tepe, B., Sarikurkcü, C., Berk, S., Alim, A., Y Akpulat, Ha (2011). Composición Química, Depuración Radical Y Actividad Antimicrobiana De Los Aceites Esenciales De *Thymus Boveii* Y *Thymus Hyemalis*. *Registros De Productos Naturales*, 5 (3).

Tomás D. Arias (1999). Glosario De Medicamentos: Desarrollo, Evaluacion Y Uso. Pag 44-47. Organización Panamericana De La Salud. Primera Edicion.

Valencia, C. (1995). Fundamentos De Fitoquímica. Mx. Ed. Trillas.

Vargas, A., & Bottia, E. (2008). Estudio De La Composición Química De Los Aceites Esenciales De Seis Especies Vegetales Cultivadas En Los Municipios De Bolívar Y El Peñón–Santander, Colombia. Proyecto De Grado, Universidad Industrial De Santander Facultad De Ciencias, Escuela De Química.

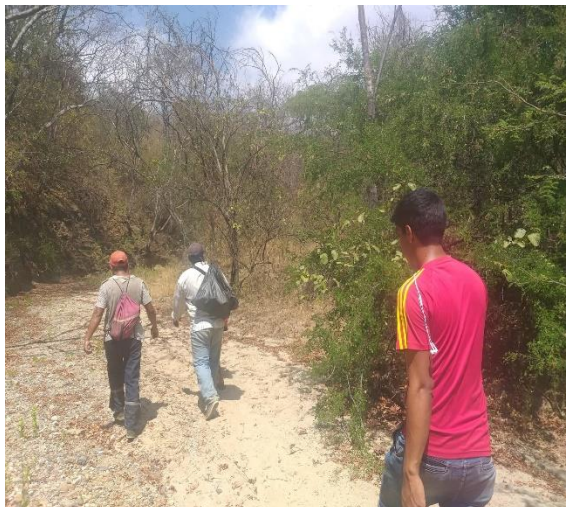
Vázquez-Boland, Ja, Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... Y Kreft, J. (2001). Patogénesis De Listeria Y Determinantes De Virulencia Molecular. Revisiones De Microbiología Clínica, 14 (3), 584-640.

Xue, Ccl, Hugel, Hm, Li, Cg Y Story, Df (2004). Eficacia, Química Y Farmacología De La Medicina Herbal China Para La Rinitis Alérgica. Química Médica Actual, 11 (11), 1403-1421.

Young, D. G., Chao, S., Casablanca, H., Bertrand, M. C., & Minga, D. (2007). Essential Oil Of Bursera Graveolens (Kunth) Triana Et Planch From Ecuador. Journal Of Essential Oil Research, 19(6), 525-526.

8. ANEXOS

Anexo 1: Anexo fotográfico



Anexo 1.1: Zona de rica playa de donde se recolecto el palo santo



Anexo 1.2: Proceso de cortado en viruta del palo santo con cepilladora eléctrica.



Anexo 1.3: Palo santo en viruta en la autoclave lista para la extracción del aceite



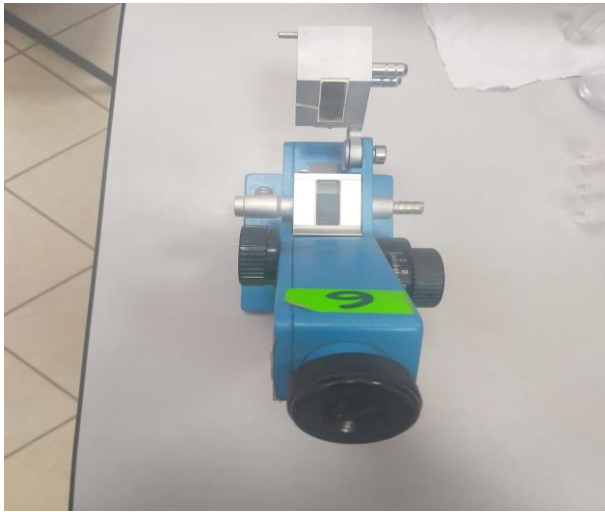
Anexo 1.4: Montaje del equipo para la extracción del aceite esencial por arrastre vapor con agua y proceso de extracción.



Anexo 1.5: Separación física del aceite esencial por diferencia de densidades.



Anexo 1.6: aceite esencial obtenido.



Anexo 1.7: Medición del índice de refracción utilizando un refractómetro de tipo ABBE Schmidt + Haensch



Anexo 1.8: Medición de la absorbancia utilizando espectro UV-VIS

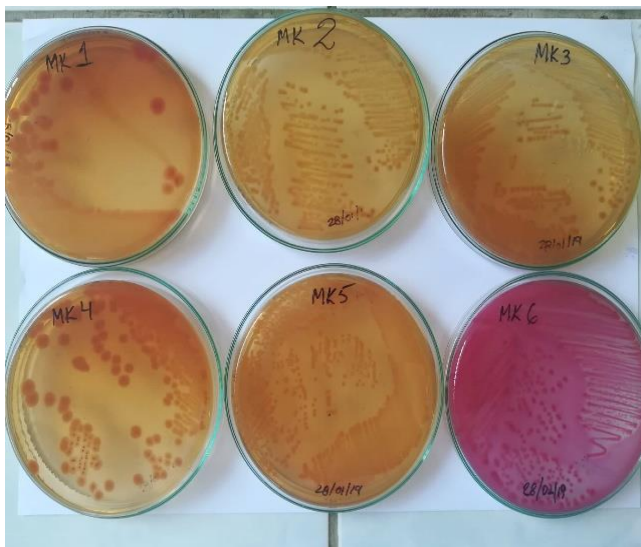


Anexo 1.9: Proceso de aislamiento en placa de los microorganismos del pez aguja (*Kajikia audax*).

....



Anexo 1.10: Proceso de aislamiento en tubos de los microorganismos del pez aguja (*Kajikia audax*)



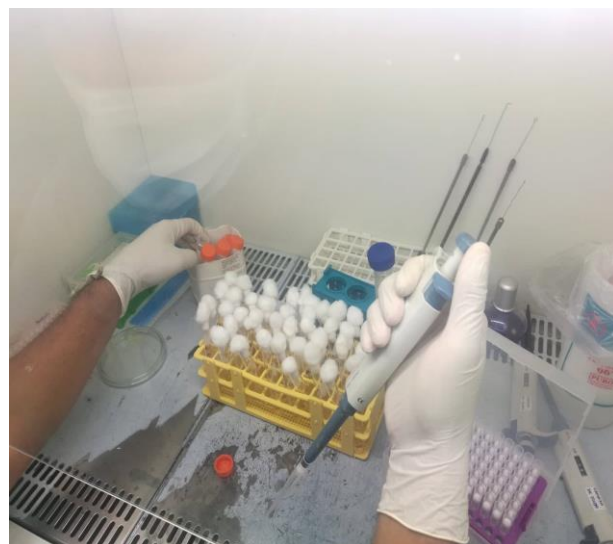
Anexo 1.11: Microorganismos aislados en placa codificados.



Anexo 1.12: Pruebas de identificación bioquímica.



Anexo 1.13: Preparación de la solución madre del aceite esencial.



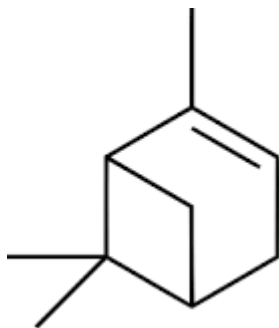
Anexo 1.14: Preparación de las diluciones esencial.



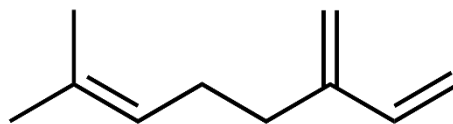
Anexo 1.15: inserción de los microorganismos a los tubos con diferentes concentraciones de aceite esencial.

Anexo 2. Formulas estructurales

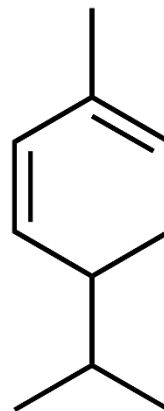
Anexo 2.1. α -Pineno



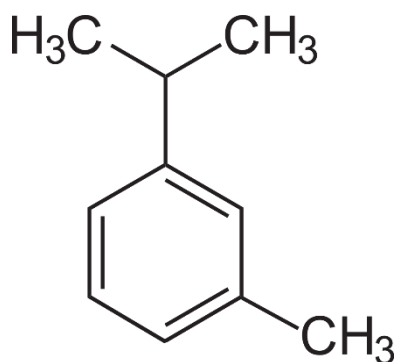
Anexo 2.2. β -Mirceno



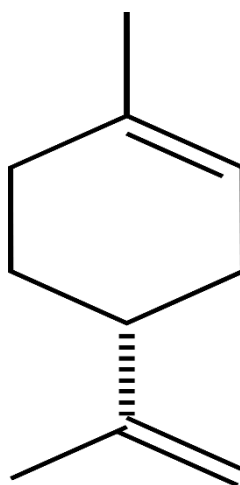
Anexo 2.3. α -Felandreno



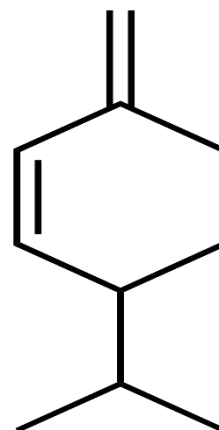
Anexo 2.4. m-Cimeno



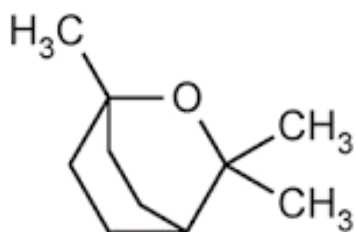
Anexo 2.5. D-Limoneno



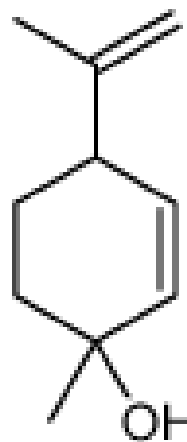
Anexo 2.6. β -Felandreno



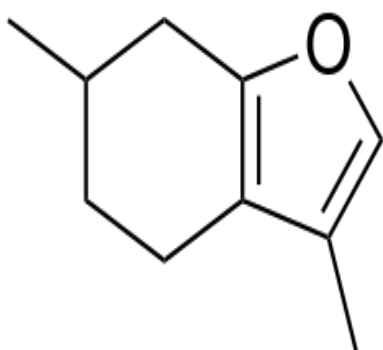
Anexo 2.7. Eucaliptol



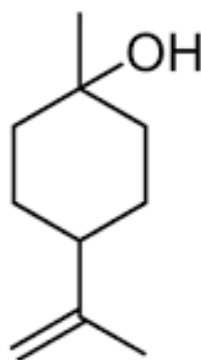
Anexo 2.8. cis-p-Menta-2,8-dienol



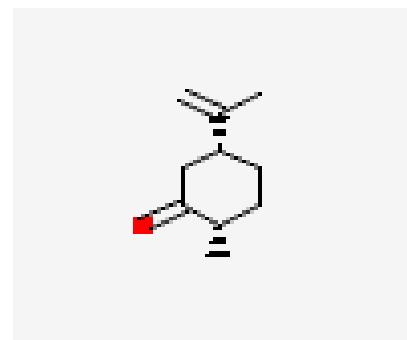
Anexo 2.9. Mentofurano



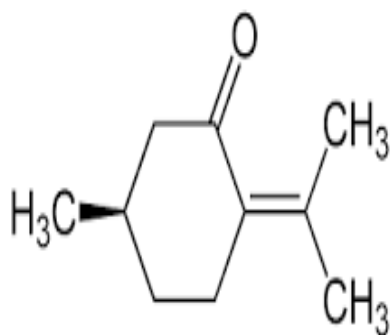
Anexo 2.10. α-Terpineol



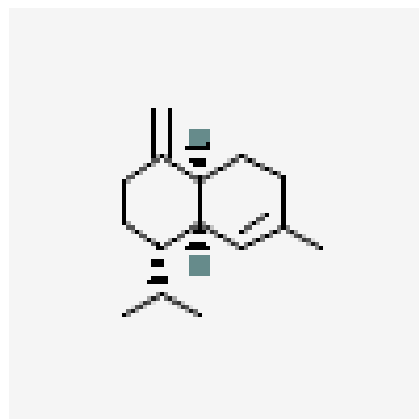
Anexo 2.11. Dihidrocarvona



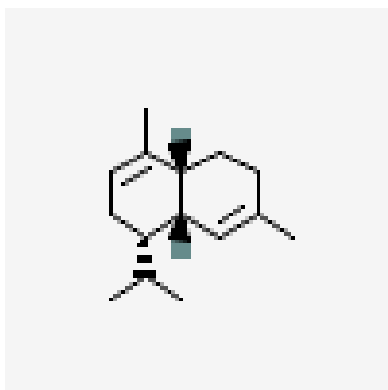
Anexo 2.12. Pulegona



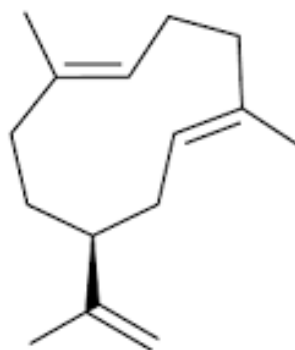
Anexo 2.13. γ -Muurolene



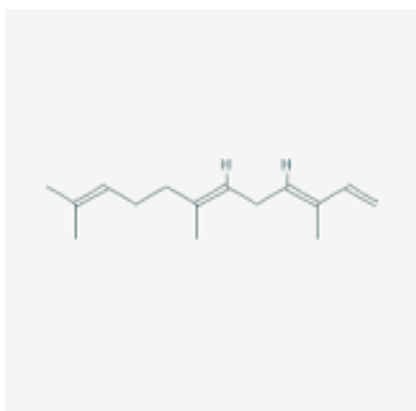
Anexo 2.14. α -Amorfeno



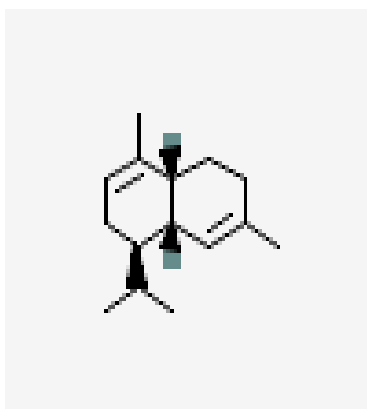
Anexo 2.15. Germacreno



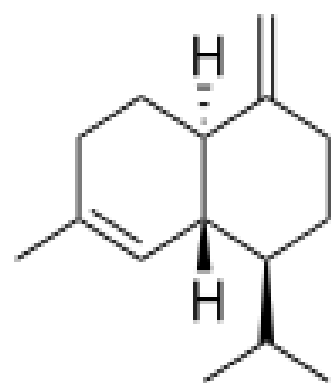
Anexo 2.16. α -Farnesene



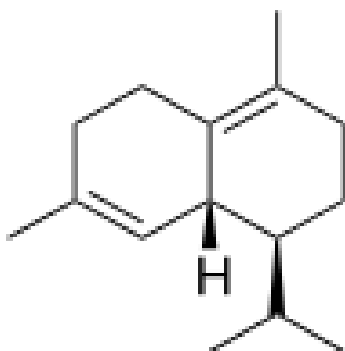
Anexo 2.17. α -Muuroleno



Anexo 2.18. γ -Cadineno



Anexo 2.19. δ -Cadineno



Anexo 2.20. β -Cadineno

