

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniero en Biotecnología
de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y
CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA
Xanthomona sp., EN CONDICIONES *in vitro*”**

AUTOR:

William Andrés Ortuño Saca

TUTORA:

Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD

CUENCA - ECUADOR

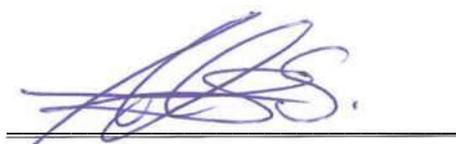
2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, William Andrés Ortuño Saca, con documento de identificación N° 0105526149 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA *Xanthomona sp.*, EN CONDICIONES *in vitro*”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril de 2019



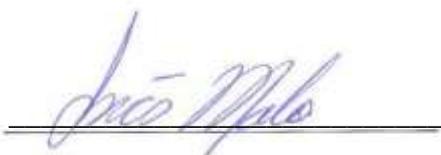
William Andrés Ortuño Saca

C.I.: 0105526149

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación:
“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA *Xanthomona sp.*, EN CONDICIONES *in vitro*”, realizado por William Andrés Ortuño Saca, obteniendo el *Trabajo experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril de 2019



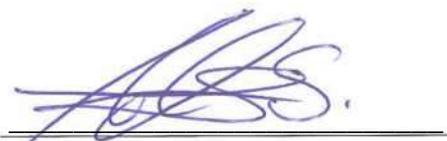
Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD

C.I.: 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, William Andrés Ortuño Saca, con número de cédula 0105526149 autor del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA *Xanthomona sp.*, EN CONDICIONES *in vitro*”**, certifico que el total del contenido del *Trabajo experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, abril de 2019



William Andrés Ortuño Saca

C.I.: 0105526149

DEDICATORIA

Este trabajo investigativo va dedicado a Dios, por haberme dado la fortaleza y la dedicación de seguir firme en mis estudios para alcanzar una meta más en mi vida que me he propuesto desde que era niño, a pesar de las caídas que he tenido mi poder superior nunca me ha abandonado.

A mi amada y hermosa madre Esther Elisa Saca Parra, quien es mi inspiración de mujer guerrera, por ser una persona muy especial en mi corazón que siempre está ahí conmigo cuando más lo necesito, por sus motivaciones de aliento para salir adelante, por los valores que me ha inculcado y que me han permitido ser una persona sencilla, a pesar de la distancia que nos separa le amo mucho “MAMITA”.

A mi abuelita Francisca Parra, una mujer muy importante en mi vida, la persona que siempre estuvo conmigo en mi niñez y parte de mi adolescencia, que hoy está en el cielo quien me guía en mi caminar, me cuida y protege “mi mamita Pancha”

A mi abuelito Manuel Saca, por ser una persona constante en mi vida con sus consejos y apoyo incondicional, por brindarme su amor como padre, por corregirme en momentos que hago las cosas mal y por su gran corazón, me lleva a admirarlo cada día.

A mi tía Leonor Saca, mi cuarta mamá la persona que siempre creyó en mí, nunca me ha dado la espalda, la persona a quien he confiado el más mínimo secreto, a ella por decirme la realidad de la vida “mi ñaña Leo”.

A mis hermanos Geovanny, Daisy, George, mis locos que siempre me apoyan en todas las buenas decisiones que haga y que me aprecian mucho.

A mis tíos, tías, quienes me apoyaron siempre para que no me de por vencido y que siga adelante con mucho esfuerzo, dedicación y perseverancia.

A mis primos Jessica, Alex, Mario, personas que me dieron su cariño, confianza y confidencialidad para realizar de mi estudio una bonita historia, los quiero mucho.

A mis compañeros Eduardo “Pocho”, Mayra “May”, personas con quien llegué a tener mucha empatía, me apoyaron en todas mis dificultades y etapas de la vida universitaria.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por haberme dado el conocimiento y la sabiduría para culminar una meta más en mi vida, y estar presente en personas magníficas que con sus consejos me motivaron para salir adelante.

A mi madre, quien depositó su confianza en mí, para que yo cumpliera con uno de mis propósitos pensando en mi bienestar a futuro.

A mi abuelito, tíos, tías, por brindarme su confianza, darme ánimo cuando estaba a punto de caer.

A mis hermanos, primos, prima, que siempre estuvieron dándome ánimos y que no me dé por vencido a pesar de las adversidades de la vida.

A mi Directora de tesis Dra. Inés Malo, por haberme apoyado en los momentos que más necesitaba y comprenderme, ser mi profesora, por haberme guiado con sus conocimientos científicos, experiencia y sabiduría en mi investigación.

A mis amigos, por haber pasado buenos y malos momentos durante la trayectoria de vida universitaria, además por enseñarme a comprender que todo llega a la vida con esfuerzo.

RESUMEN

La presente investigación tuvo la finalidad de determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Chilca y Cilantro frente a la bacteria *Xanthomona sp.*, mediante la demostración de su capacidad inhibitoria. Se llevaron a cabo pruebas físicas y químicas para determinar el rendimiento y calidad de los aceites esenciales, además de cromatografía de gases para determinar los componentes con mayor porcentaje, los cuales fueron, en Chilca: α -felandreno (18.12%), Limoneno (17.15%), Norhalkendin (10.00%) y Andro enecalinol (6.00%). Para el Cilantro: Benzaldehído (40.25%), Geraniol (19.00%), Alcanfor (26.00%) y Decanol (10.00%). Posteriormente se llevó a cabo la prueba de caja Petri invertida, en la cual se obtuvo halos de inhibición de hasta 20 mm y 17 mm, al emplear aceite esencial de Cilantro en concentraciones de 100% y 50%. Se realizó la prueba de dilución en agar mediante la cual se buscó determinar la capacidad bacteriostática de los dos aceites esenciales obteniéndose inhibición de la bacteria *Xanthomona sp.*, a partir de una concentración de 20% en Cilantro y 60% en Chilca. Finalmente se realizó una prueba de microdilución en pocillos con resazurina por duplicado, las mismas que fueron analizadas a las cero y 24 horas, obteniéndose los valores más altos para aceite esencial de Chilca a una concentración de 70% en las dos placas analizadas a las 24 horas. Finalmente se llevó a cabo análisis estadístico ANOVA en Minitab 17, mediante la cual se concluye que los dos aceites presentan gran potencial antibacteriano frente a *Xanthomona sp.*

PALABRAS CLAVE: Aceite esencial, CMI, Resazurina, *Xanthomona sp.*

ABSTRACT

The present investigation was carried out to determine the antimicrobial capacity of *Baccharis latifolia* and *Coriandrum sativum* essential oils against the bacterium *Xanthomona* sp., by means of its inhibitory capacity demonstration. Physical and chemical tests were carried out to determine the yield and quality of the essential oils, in addition to gas chromatography by means of which the components with major percentage were, in case of Chilca: α -phellandrene (18.12 %), Limonene (17.15 %), Norhalkendine (10.00 %) and Andro enecalinoles (6.00 %). In case of Coriander: Benzaldehyde (40.25 %), Geraniol (19.00 %), Camphor (26.00 %) and Decanol (10.00 %). Afterwards an inverted Petri dish test was carried out, in which 20 mm to 17 mm inhibition halos were obtained, using 100% and 50% Coriander essential oil concentrations. A dilution test was executed also in agar to determine the bacteriostatic capacity of both essential oils, obtaining inhibition for the bacterium *Xanthomona* sp. from a concentration of 20 % in case of *Coriandrum sativum* and 60 % in case of *Baccharis latifolia*. Finally, a duplicated microdilution test was performed with resazurina and analyzed at zero and after 24 hours, the highest values being obtained at 70% for *Baccharis latifolia* essential oil in two microplates analyzed after 24 hours. Finally, ANOVA statistical analysis was carried out with the program Minitab 17, concluding that both oils present considerable antibacterial potential against *Xanthomona* sp.

KEY WORDS: Essential oil, Resazurin, MIC, *Xanthomona* sp.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2	ANTECEDENTES	4
1.3	JUSTIFICACIÓN	7
1.4	OBJETIVOS	8
1.4.1	OBJETIVO GENERAL	8
1.4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.5	HIPÓTESIS	9
2	MARCO DE REFERENCIA	10
2.1	BACTERIAS FITOPATÓGENAS	10
2.2	BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN CULTIVOS	11
2.3	EL GÉNERO XANTHOMONA	11
2.3.1	PRINCIPALES ESPECIES FITOPATÓGENAS DE <i>Xanthomona</i> <i>sp</i>	12
2.3.2	MODO DE INFECCIÓN DE <i>Xanthomona sp</i>	14
2.3.3	BIOPLAGUICIDAS PARA EL CONTROL DE FITOPÁTOGENOS.....	14
2.4	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES.....	15
2.4.1	<i>Baccharis latifolia</i>	15
2.4.2	<i>Coriandrum sativum</i>	19
2.5	ACEITES ESENCIALES	22

2.5.1	CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	22
2.5.2	DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS	23
2.5.3	PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	24
2.5.4	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	24
2.5.5	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	27
2.5.5.6	CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	29
2.6	MEDIO DE CULTIVO	31
2.7	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	31
2.7.1	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	32
2.7.2	TÉCNICAS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	32
3	MARCO METODOLÓGICO.....	35
3.1	RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL Y AISLAMIENTO DE LA BACTERIA	35
3.1.1	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE PLANTAS INFECTADAS.....	35
3.2	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE LA BACTERIA <i>Xanthomona sp.</i>	36

3.2.1 AISLAMIENTO DE LA BACTERIA FITOPATÓGENA	
<i>Xanthomona sp</i>	37
3.2.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA	
FITOPATÓGENA <i>Xanthomona sp</i>	39
3.3 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA	
(<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>)	54
3.3.1 RECOLECCIÓN DE HOJAS DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) ..	55
3.3.2 OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS DE CILANTRO (<i>Coriandrum</i>	
<i>sativum</i>).....	56
3.3.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCA (<i>Baccharis</i>	
<i>latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>).....	57
3.3.4 RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA	
(<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>)	58
3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES	
ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum</i>	
<i>sativum</i>) POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A	
ESPECTROMETRÍA DE MASAS	60
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA	
(<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>) MEDIANTE	
TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS	61
3.5.1 DETERMINACIÓN DEL PESO ESPECÍFICO (DENSIDAD	
RELATIVA)	61
3.5.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	62

3.5.3	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ	64
3.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>) MEDIANTE MÉTODOS DE DILUCIÓN EN AGAR, CAJA PETRI INVERTIDA, Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	66
3.6.1	ESTANDARIZACIÓN DE LA MUESTRA.....	66
3.6.2	MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.....	67
3.6.3	MÉTODO DE CAJA PETRI INVERTIDA.....	70
3.6.4	PRUEBA DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	71
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
4.1	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA <i>Xanthomona sp</i>	74
4.2	EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>).....	76
4.2.1	RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CHILCA	76
4.2.2	RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CILANTRO.....	79
4.2.3	CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA Y CILANTRO	83
4.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>).....	83

4.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES	84
4.4.1 COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS ACEITES ESENCIALES ANALIZADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EXPRESADOS COMO PORCENTAJES (%GC)	84
4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (<i>Baccharis latifolia</i>) Y CILANTRO (<i>Coriandrum sativum</i>).....	87
4.5.1 PRUEBA DE CAJA PETRI INVERTIDA	87
4.5.2 PRUEBA DE DILUCIÓN EN AGAR	96
4.5.3 PRUEBAS CUALITATIVAS ADICIONALES PARA DETERMINACIÓN DE CMI	98
5 CONCLUSIONES	102
5.1 RECOMENDACIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXOS.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Chilca (<i>Baccharis latifolia</i>).	15
Figura 2 Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	19
Figura 3 Hojas de geranio infectadas	36
Figura 4 Arbustos de chilca (<i>Baccharis latifolia</i>). Cantón Paute – Azuay.	55
Figura 5 Almacén Agropecuario “TecníAgro”. Cantón Paute – Azuay	56
Figura 6 Equipo de destilación por arrastre de vapor. “Universidad Politécnica Salesiana / Sede-Cuenca”	58
Figura 7 Aceites Esenciales de CHI: (chilca) y CIL: (cilantro).	59
Figura 8 Picnómetro de 5 mL.	62
Figura 9 Refractómetro de marca ABBE.	63
Figura 10 Equipo de titulación.	65
Figura 11 Equipo espectrofotómetro Genesys 20.	67
Figura 12 “Dilución en Agar”. CHI: Chilca en diferentes concentraciones de aceite esencial (90%, 80%, 70%, 60%), y CIL: Cilantro en diferentes concentraciones de aceite esencial (30%, 20%, 10%).	69
Figura 13 “Caja Petri Invertida”. CH: Chilca en diferentes concentraciones de aceite esencial (25%, 50%, 100%), y CI: Cilantro en diferentes concentraciones de aceite esencial (25%, 50%; 100%).	71
Figura 14 Cepa bacteriana <i>Xanthomona sp</i> , en agar selectivo LB.	75
Figura 15 Caja Petri Invertida. Aceite esencial cilantro y chilca al 100%.	88
Figura 16 Método REMA con aceite de cilantro y chilca a las cero horas de aplicada la resazurina.	98

Figura 17 Placa N°1 de método REMA con aceite de cilantro y chilca a las 5 horas
de aplicada la resazurina. 99

Figura 18 Placa N° 2 método REMA con aceite de cilantro y chilca al 90% a las 5
horas de aplicada la resazurina..... 100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Grupos funcionales presentes en los aceites esenciales	26
Tabla 2 Resultados de la morfología y pruebas bioquímicas de la bacteria <i>Xanthomona sp.</i>	74
Tabla 3 DCA aceite esencial de chilca.....	77
Tabla 4 Método de Tukey aceite esencial de chilca.....	78
Tabla 5 Prueba de Kruskal–Wallis aceite esencial de cilantro.	80
Tabla 6 Prueba de Kruskal-Wallis Test: aceite esencial vs factores	81
Tabla 7 Método de Tukey rendimiento aceite esencial de Cilantro.....	82
Tabla 8 Cálculo del rendimiento de los aceites esenciales obtenidos.	83
Tabla 9 Resultados de pruebas físico-químicas de los aceites esenciales.....	83
Tabla 10 Principales componentes del aceite esencial de chilca.	85
Tabla 11 Principales componentes del aceite esencial de cilantro.....	86
Tabla 12 Medidas de halos de inhibición de aceite de cilantro.....	87
Tabla 13 Medidas de halos de inhibición de aceite de chilca.	87
Tabla 14 Porcentaje de inhibición los aceites esenciales frente a la bacteria <i>Xanthomona sp.</i>	89
Tabla 15 Planteamiento de las hipótesis para ANOVA.....	93
Tabla 16 Prueba de ANOVA	93
Tabla 17 Prueba de Tukey aplicada a los tratamientos para las medias de los halos de inhibición [mm] obtenidas en cada uno.	95
Tabla 18 Concentraciones de aceite esencial de Chilca y crecimiento de <i>Xanthomona</i> <i>sp.</i>	96
Tabla 19 Concentraciones de aceite esencial de cilantro y crecimiento de <i>Xanthomona sp.</i>	97

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Prueba de supuesto de Normalidad de Ryan-Joiner para aceite esencial de chilca.	76
Gráfica 2 Volumen de aceite de chilca vs tiempo de extracción.	78
Gráfica 3 Prueba de supuesto de Normalidad de Ryan-Joiner para aceite esencial de cilantro.....	79
Gráfica 4 Volumen de aceite esencial de cilantro vs tiempo.	82
<i>Gráfica 5</i> Porcentaje de inhibición alcanzado por los tratamientos de aceite esencial de cilantro vs control positivo (CP).	90
Gráfica 6 Porcentaje de inhibición alcanzado por los tratamientos de aceite esencial de chilca vs control positivo (CP).	91
Gráfica 7 Prueba de normalidad para halos de inhibición en (mm).....	92
Gráfica 8 Cajas de Halos de inhibición (mm).....	94
<i>Gráfica 9</i> CMI placas a la hora cero de aplicación de resazurina.....	99
Gráfica 10 CMI placa de aceites al 70% a las 5 horas de aplicación de resazurina.	100
Gráfica 11 Determinación de la CMI entre tratamientos.....	101

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Porcentaje de rendimiento de aceites esenciales.....	58
Ecuación 2 Densidad relativa.....	62
Ecuación 3 Determinación del porcentaje de inhibición.....	88

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos cuarenta años se ha investigado sobre sustancias con actividad antibacteriana de las plantas endémicas, lo cual es importante ya que se pueden encontrar metabolitos con excelente actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes, antibióticos y agroquímicos sintéticos, también se consigue encontrar plantas con diferentes propiedades que se puedan usar en la medicina como agentes quimioterapéuticos, en la agricultura como plaguicidas de origen botánico o como preservativos antimicrobianos en los alimentos (Mantilla & Sanabria, 1985; Fernández *et al.*, 2014).

A nivel mundial en los últimos años, tanto las bacterias como los hongos han desarrollado resistencia a los plaguicidas por lo cual los agricultores tienen la necesidad de utilizar grandes cantidades de agroquímicos sintéticos para controlar estas plagas (Hernández González *et al.*, 2007). Además la mala práctica agrícola ha provocado la eliminación de microorganismos del suelo, pérdida de la diversidad de insectos, impacto ambiental en los suelos, aire y agua, daño a la salud tanto del agricultor como del consumidor, costos elevados por la compra y manipulación de los agroquímicos. El Manejo Integral de Plagas (MIP) se está promoviendo en todo mundo como alternativa para reducir el uso de los plaguicidas (FAO, 2006).

En el Ecuador diferentes cultivos están siendo afectados por la bacteria *Xanthomona sp.*, por lo cual la agricultura convencional se está viendo en la obligación de utilizar grandes cantidades de agroquímicos para el control (Peralta *et al.*, 2016).

Estudios realizados en Ecuador muestran que la presencia de numerosos géneros de *Xanthomona sp.*, es la causa en la disminución de la producción de cultivos de arroz, limón, fréjol, caña de azúcar, cítricos, nabos, plantas ornamentales entre otros, afectando principalmente a los frutos, flores, semillas y hojas.

El género *Xanthomona sp.*, corresponde a bacterias fitopatógenas de campo, que se desarrollan en las zonas tropicales con climas superiores a 28 °C y 80% de humedad relativa, esta enfermedad puede causar el 30% a 60% de pérdidas en variedades comerciales susceptibles, cuando las condiciones climáticas son favorables para que se propague en las zonas agrícolas (Zapata, 1997; Rodríguez Miranda & Rosas Sotomayor, 2010; Peralta *et al.*, 2016).

En la actualidad, el control de plagas y enfermedades en los cultivos se realiza mediante la agricultura convencional (plaguicidas). Sin embargo existen nuevas investigaciones que apuntan a remplazar de manera paulatina el uso de grandes cantidades de plaguicidas por bioplaguicidas (animales, plantas, minerales, microorganismos) (Nava Pérez *et al.*, 2012), ya que los mismos están compuesto por diferentes estructuras químicas capaces de inhibir a microorganismos fitopatógenos (Pino *et al.*, 2012).

La obtención de los aceites esenciales a partir de plantas aromáticas y medicinales se puede realizar de una manera rápida (Pino *et al.*, 2012). En el Cantón Paute de la Provincia del Azuay la chilca (*Baccharis latifolia*) se puede encontrar en los campos, mientras que las semillas de cilantro (*Coriandrum savitivum*) se obtienen en los almacenes agropecuarios, ante esto, la presente investigación tiene como finalidad determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de chilca (*Baccharis*

latifolia) y cilantro (*Coriandrum sativum*) para el control de la *Xanthomona sp.*, en condiciones *in vitro*.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años la producción de cultivos de interés agropecuario y otros, se han visto afectados a nivel mundial por las bacterias fitopatógenas en especial del género *Xanthomona sp.*

Este agente patógeno biológico causante de enfermedades en las plantas, también puede causar enfermedades dañinas y graves, ocasionando marchitez vascular, canchales, manchas en las hojas y en los frutos, quemaduras foliares, podredumbres malolientes en los tallos, hasta la muerte de las plantas lo cual provoca grandes pérdidas económicas al año (Vidhyasekaran, 2002; Galindo Flores, 2008). Las cosechas infectadas por esta bacteria fitopatógena son poco apreciadas por tanto tienen bajo valor comercial y no son adecuadas para el almacenamiento.

La bacteria *Xanthomona sp.*, se disemina por salpique de lluvia, por viento húmedo y penetra a las hojas a través de estomas y heridas así como a las flores, frutos y semillas (Vidaver & Lambrecht, 2004). *Xanthomona sp.*, es una bacteria muy estudiada en la agricultura porque causa daños de manera masiva en monocultivos.

Los bioplaguicidas en los últimos tiempos están teniendo un impacto positivo y para el control de plagas, por lo tanto es una alternativa al control químico (EPA, 2010). Ante esto surge, la necesidad de investigar la actividad antibacteriana de dos plantas, *Baccharis latifolia* y *Coriandrum sativum*.

1.2 ANTECEDENTES

La bacteriosis es una enfermedad presente en África y Latino América, en todas las regiones donde la yuca es sembrada (Chirinos, Olivares, & Guevara, 2013).

También la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) es un cultivo de gran importancia en Centro América, Caribe y Sur América, esta planta es cultivada en zonas tropicales y subtropicales. Debido a que esta planta acumula gran cantidad de sacarosa en su tallo, y la eficacia por su producción de biomasa, además tiene una de las más grandes ventajas pues se utiliza para la fabricación de biocombustibles como el etanol (Alvez, Alonso, & Oropeza, 2016).

La cancrrosis es una enfermedad provocada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis pv citruelo*, la cual se encuentra presente en los cinco continentes en especial en los cultivos de cítricos. Esta enfermedad apareció por primera vez en los países orientales como India, Filipinas y Japón. En años posteriores esta enfermedad se presentó en América, los países que reconocieron esta infestación fueron Estados Unidos (Florida), Brasil, Uruguay, Bolivia, Paraguay, Argentina y Bahamas; la misma afecta básicamente el naranjo agrio, limero Tahití, limonero Siciliano (*Poncirus trifoliata* y *Fotunella sp.*) (Bevington, 1976; Sicilino *et al.*, 2006).

Uno de los principales patógenos responsables de la podredumbre negra en la familia de las *Brassicaceae* (conocidas también como crucíferas) es la *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* (Xcc) (Toum Terrones, 2015). Estos cultivos tienen gran importancia agronómica en Sur América y gran parte de África (Assis *et al.*, 1999).

En Ecuador se han reportado bacterias fitopatógenas del género *Xanthomona* sp., *Erwinia* sp., y algunas del género *Pseudomonas* sp., (*Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas avenae* y *Burkholderia glumae*) (Camargo *et al.*, 2009). Las mismas que en los últimos años han provocado grandes pérdidas en los cultivos de arroz (de Souza Júnior *et al.*, 2015).

En las plantas ornamentales, en especial en los geranios, la *Xanthomonas campestris* pv *pelargonii*, es el causante de las manchas y marchitez en las hojas, la planta se afecta rápidamente y presenta necrosis (Trabanino & Macias A, 1999).

En los últimos años la producción de los cultivos antes mencionados se ha visto afectada por malezas, plagas y cambios climáticos provocando grandes pérdidas económicas al año.

Los agricultores se ven obligados a utilizar grandes cantidades de agroquímicos, sustancias químicas sintéticas que se emplean en el campo agrícola debido al ataque constante de plagas en los cultivos (Torres & Capote, 2004).

La utilización excesiva de los agroquímicos está generando aspectos negativos en la salud del agricultor como infecciones en la piel, intoxicaciones, envenenamiento, además está provocando daño ambiental (Torres & Capote, 2004; Delince *et al.*, 2015).

En la actualidad se ha pretendido dar solución a este tipo de problemas, una de las alternativas al control químico de los fitopatógenos es mediante el uso de biocontroladores o bioplaguicidas, es decir, la utilización de plantas, animales, microorganismos, minerales que impiden e inhiben el desarrollo de los agentes biológicos patógenos (Nava Pérez *et al.*, 2012).

Según Noriega Rivera (2009) los aceites esenciales son mezclas de un número de variables orgánicas olorosas. Los mismos se obtienen por distintos tipos de técnicas, pero la destilación por arrastre de vapor es la que más se emplea (Pino *et al.*, 2012).

Se dice que los aceites esenciales de las plantas endémicas del Ecuador, poseen una defensa frente a agentes biológicos patógenos por estar constituidos químicamente por terpenos de bajo peso molecular, asociados a diversos grupos funcionales (Becerra *et al.*, 2010). Lo cual ayudará en la agricultura para el control biológico y así disminuir el uso de agroquímicos sintéticos en los cultivos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la agricultura convencional está generando daños tanto a la salud de los agricultores como de los consumidores e impactos ambientales por el uso de plaguicidas. La agricultura orgánica es una alternativa para el control biológico de muchos cultivos (Mantilla & Sanabria, 1985). Se conocen antecedentes bibliográficos de plantas que se emplean en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias fitopatógenas, por lo tanto es de gran interés científico comprobar en el laboratorio la capacidad inhibitoria de éstas (García *et al.*, 2008; Alteri *et al.*, 2012).

En la presente investigación se estudia la composición química de dos plantas, *Baccharis latifolia* conocida con el nombre de Chilca, y *Coriandrum savitivum* conocida con el nombre de Cilantro o Culantro, ya que estas plantas tienen actividad antibacteriana y antifúngica (De Figueiredo *et al.*, 2004; Abad & Bermejo, 2006), la planta de Chilca se puede conseguir de manera libre en las zonas rurales y montañosas del Cantón Paute de la Provincia del Azuay y las semillas de Cilantro se pueden obtener en los almacenes agropecuarios. Razón por la cual es de gran interés investigarlas, extrayendo los aceites esenciales de las hojas (chilca) y semillas (cilantro) obteniendo a través de la técnica por arrastre de vapor (Noriega Rivera, 2009; Leal Torres *et al.*, 2013), estos aceites serán probados frente a la bacteria Gram negativa (*Xanthomona sp*) (Cubero *et al.*, 2012), para comprobar así la actividad antibacteriana que estos aceites esenciales puedan tener (Ramirez & Castaño, 2009; Reyes Jurado *et al.*, 2014). Por lo tanto se espera que los resultados obtenidos sirva, y sean ventajosos para realizar posteriores investigaciones con mayor profundidad de estudio.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) para el control de la *Xanthomona sp.*, en condiciones *in vitro*.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Aislar la bacteria *Xanthomona sp.*, de muestras de plantas infectadas obteniendo la cepa pura.
- 2 Extraer los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) por arrastre de vapor aplicándolos en pruebas de actividad antibacteriana.
- 3 Determinar la composición de los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la identificación de las sustancias químicas presentes.
- 4 Caracterizar los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante técnicas físico-químicos determinando sus propiedades.
- 5 Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante métodos de dilución en agar, caja Petri invertida, y concentración mínima inhibitoria (CMI) para el control de la bacteria *Xanthomona sp.*, en condiciones *in vitro*.

1.5 HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de chilca (*Baccharis latifolia*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) tienen capacidad antibacteriana pudiendo utilizarse frente a *Xanthomona sp.*

2 MARCO DE REFERENCIA

2.1 BACTERIAS FITOPATÓGENAS

La mayoría de bacterias fitopatógenas son aerobias y existe en un porcentaje menor que son anaerobias facultativas. Estos patógenos se reproducen de forma asexual por bipartición. Los factores nutritivos, humedad, temperatura y pH, son condiciones que necesitan los agentes biológicos patógenos para su crecimiento. Causan numerosas enfermedades en plantas con síntomas como: manchas en los diferentes partes de los vegetales, marchitez en las plantas, pudriciones de los tallos y frutos, además, las plantas tienen reproducción sexual y asexual, lo que facilita que las bacterias fitopatógenas invadan los vegetales (Navarrete Maya *et al.*, 2014).

En la naturaleza existe una gran diversidad de bacterias, los microorganismos Procariontes, corresponden al Dominio Bacteria, según Janse (2005) existen dos Reinos, que se han propuesto en base a la secuencia comparativa de ARN18S o al ARN16S:

- Las bacterias fitopatógenas Gram negativas pertenece al Reino I:
Acidovorax, Agrobacterium, Burkholderia, Dickeya, Erwinia, Pantoea, Pectobacterium, Pseudomonas, Ralstonia y *Xanthomonas*.
- Las bacterias fitopatógenas Gram positivas pertenece al Reino II:
Clavibacter y *Curtobacterium*.

2.2 BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN CULTIVOS

Las bacterias fitopatógenas son aquellas que ocasionan enfermedades en diferentes cultivos y plantas silvestres (González Arias *et al.*, 2013). En nuestro país enfermedades de los géneros de *Pseudomonas sp.*, *Erwinia sp.*, *Xanthomona sp.*, *Xilella sp.*, *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium*, afectan a los cultivos de frejol, caña de azúcar, cítricos, frutales, ornamentales entre otros (Brunings & Gabriel, 2003).

2.3 EL GÉNERO XANTHOMONA

El género nombre *Xanthomona* viene del vocablo griego “*xanthus*” que significa amarillo y “*monas*” que representa entidad o unidad (Sena Veléz, 2015). Este género forma parte de una rama independiente del grupo *Proteobacteria* que a su vez constituye un taxón no dependiente dentro de las *Eurobacterias* (Ryan *et al.*, 2011). Este género *Xanthomona* se encuentra ubicada en el puesto número cinco de las bacterias fitopatógenas más graves y dañinas en la agricultura y en las plantas silvestres (Toum Terrones, 2015). La misma tiene forma de barreras, (bastoncillos), además son muy significativas dentro de las bacterias Gram negativas, las dimensiones de las bacterias de este género miden entre 0.2 - 0.9 μm de ancho y 1.0 – 3.0 μm de largo. Estas bacterias son móviles por medio de un flagelo polar, también poseen una pigmentación de color amarillo de consistencia mucosa cuando crece en medio de agar nutritivo, la mayoría del género de *Xanthomona sp.*, tienen un crecimiento lento, la temperatura ideal para el desarrollo de este tipo de fitopatógeno oscila entre los 28 °C. Este género tiene capacidad de producir ácido pero no gas, a

partir de glucosa, sacarosa, arabinosa, galactosa, fructosa, trehalosa y celobiosa; de la misma manera producen xantomonadinas (Assih *et al.*, 2002).

Estas bacterias fitopatógenas se encuentran presentes en una mayor gama de plantas huésped, se han comprobado en al menos 70 familias y 244 géneros (120 especies monocotiledóneas y 265 dicotiledóneas) (Hayward, 1993; Büttner & Bonas, 2010).

2.3.1 PRINCIPALES ESPECIES FITOPATÓGENAS DE *Xanthomona sp*

Xanthomonas campestris pv. *campestris* provoca la enfermedad de la podredumbre negra de las crucíferas, esta bacteria fitopatógena es una de la más destructivas en toda la familia de las *Brassicaceae*, en las plantas infectadas se presenta de color amarillo y lesiones en los márgenes de las hojas, además la enfermedad se expande en las hojas, y las nervaduras se vuelven de color negro (Tortosa Viquería *et al.*, 2016).

La bacteriosis o tizón es una enfermedad provocada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, este fitopatógeno provoca grandes perjuicios en los cultivos de fréjol, la principal diseminación de este patógeno es a través de la infección externa e interna de la semilla, por lo tanto esta enfermedad se puede transmitir por la lluvia, viento, insectos vectores, y con los residuos de cosechas contaminadas (Corzo López *et al.*, 2015).

La cancrrosis es una enfermedad foliar de los cítricos causada por *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo*. La enfermedad, denominada mancha bacteriana de los cítricos, la cual ataca al fruto produciendo lesiones foliares planas con un centro

necrótico, además en el centro del fruto forma un margen empapado de agua, que en ocasiones está rodeado de clorosis. También esta clase de patógeno afecta a las hojas y tallo, provocando lesiones corchosas o carachosas (Graham & Gottwald, 1990; Garofalo, 2013).

El cultivo de caña de azúcar es importante a nivel mundial, sin embargo, la misma se ve afectada por la *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, esta bacteria fitopatógena se presenta en la planta formando una escaldadura foliar, clorosis emergentes en las hojas, también causa enrojecimiento vascular y formación de cavidades en tallos, la cual provoca pérdidas elevadas en un 85% - 100%, la transmisión de la enfermedad es por medio de la raíz hacia otra planta ya que producen exudados, también por el sistema de riego en surco, pero cabe destacar que el patógeno no puede sobrevivir a extensos periodos de tiempo en el suelo (Alfano & Collmer, 2004; Alvez, Alonso, & Oropeza, 2016) .

Los geranios son plantas ornamentales que se han visto afectadas por diferentes patógenos, pero en especial por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, la misma que produce manchas aceitosas, amarillas sobre las hojas y tallo (las hojas se secan pero no caen), cuando el clima es favorable destruye la planta entera (Huaman Gomez, 2017).

La mancha bacteriana es la principal enfermedad del tomate, es causada por el fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, en el tomate la infección se propaga a partir de semillas, esta enfermedad produce lesiones angulares que más tarde se vuelven marrones y necróticas en el fruto, hoja, peciolo y tallo, también se transmite por medio de insectos vectores, viento, lluvia (PLH, 2014).

2.3.2 MODO DE INFECCIÓN DE *Xanthomona* sp

La infección se inicia en las semillas, una vez que las semillas han germinado la bacteria coloniza la corteza, consecutivamente, los vasos xilemáticos infectan a toda la planta. El agua es interrumpida desde las raíces hasta las hojas por las masas bacterianas, el resultado que se obtiene es la marchitez de la planta. La gravedad de la infestación depende de la temperatura y humedad del suelo (que influye en la humedad y la población de microorganismos) (González, Arias, & Peteira, 2009). Las temperaturas elevadas (28-37° C) y la elevada humedad del suelo son los elementos asociados con el alto suceso y la gravedad de la marchitez bacteriana. En estas condiciones, se liberan de las plantas marchitas los microorganismos al suelo a través de las raíces y se infectan a las plantas cercanas o a posteriores cultivos (Momol *et al.*, 2004). Además, la enfermedad se dispersa por lluvia, viento, insectos vectores y salpicaduras de agua.

2.3.3 BIOPLAGUICIDAS PARA EL CONTROL DE FITOPÁTOGENOS

Los bioplaguicidas son aquellos que se derivan de diferentes materiales naturales, los mismos son de bajo costo, tienen gran eficacia para el control de plagas agrícolas, no producen daño al ambiente, en el caso de los plaguicidas sintéticos o agroquímicos que se utiliza tradicionalmente en los campos agrícolas, no solo afectan a la plaga objetivo, sino causan pérdidas de la diversidad de microorganismos, vegetación e insectos benéficos, lo que provoca graves daños al medio ambiente (EPA, 2010).

En general los bioplaguicidas se dividen dos grandes grupos: plaguicidas microbianos (bacterias, hongos, virus protozoos), y plaguicidas bioquímicos (atrayentes, hormonas, enzimas, reguladores de crecimiento, insectos), las mismas que son muy importantes en la relación planta-plaga (Nava Pérez *et al.*, 2012).

2.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

En la presente investigación, se hablará de los aspectos y características más relevantes de dos especies vegetales *Baccharis latifolia* y *Coriandrum sativum*, son plantas que contiene un considerable valor por sus usos etnobotánicos.

2.4.1 *Baccharis latifolia*



Figura 1 Chilca (Baccharis latifolia).

Fuente: Autor

- Origen

Baccharis latifolia, esta especie es nativa de Sur América, principalmente de la región Andina, se encuentra presente en los siguientes países Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y al norte de Argentina (Giuliano, 2001). Este arbusto

se encuentra principalmente en una altitud de 2000-4000 msnm, están presentes en suelos deteriorados con baja materia orgánica y humedad, la misma crece en zonas montañosas, se comporta como un pequeño bosque andino, también esta especie se puede encontrar en las zonas invadidas por el hombre, terrenos pendientes o erosiones, ocasionando reforestación (Loja Herrera *et al.*, 2017).

En el Ecuador *Baccharis latifolia* más conocida como chilca, es una especie que se encuentra dentro en las zonas montañosas, en las riberas de las acequias, quebradas, ríos, cerca de carreteras, en los tapiales, lugares alejados, terrenos baldíos y en zonas carentes de agua (Hoyos Vargas & Yep Chu, 2008). Este arbusto crece de una manera espontanea, para su desarrollo necesita de climas bien fríos, la planta de chilca forma una defensa contra otras especies vegetativas (Fernández Cañar, 2014). En nuestro país existen 46 géneros de *Baccharis* que se encuentran distribuidas en las provincias andinas ecuatorianas de Loja, Azuay, Cañar, Chimborazo, Carchi, Cotopaxi, Napo, Imbabura, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y en la zona norte de Zamora Chinchipe (Valarezo *et al.*, 2012).

- **Clasificación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroidade

Género: *Baccharis*

Especie: *B. latifolia*

- **Nombres comunes**

Baccharis latifolia, a nivel mundial se conoce con diferentes nombres a esta especie, en Ecuador (Chilca, Chilca Blanca, Chilco, Yana Chilca), Colombia (Chilca, Chilca Morada, Chilca Pegajosa, Chilca Rucia, Chilco Blanco, Chierco, Chirco, Hayuelo), Venezuela (Chilca, Chilco Blanco), en el Perú (Aymara, Ch'illKa, Ciro, Algodoncillo, Chilco, Sanalotodo) (Velasquez Aliaga, 2007; Fernández Cañar, 2014).

- **Descripción botánica**

Baccharis latifolia es un arbusto que puede alcanzar una altura de 1 metro hasta los 4 metros, con tallos y ramas delgadas, además es una especie glabro y resinoso (Fernández Cañar, 2014). Contienen raíces profundas que permiten mantener a la planta húmeda en épocas de sequías. Esta especie tiene varios tallos, la ramificación empieza desde la raíz, los tallos rebrotan formando una aglomeración, son de color café, poseen entrenudos de 100 mm a 300 mm de longitud (Loja Herrera *et al.*, 2017). Las hojas tienen color verde brillante en el haz y en el envés tiene un color verde claro, de 60 a 120 mm de largo y 20 a 40 mm de ancho, son alternas, simples, pecioladas, dentadas, lanceoladas – oblongo, acuminado, base atenuada, además contienen hojas pegajosas con tres nervios que nacen desde la base pronunciados, pecíolo de 15 mm a 20 mm de largo (Guerra Cajas, 2016). Esta especie tiene inflorescencia en panícula con una corola blanca pequeña, escamosa de 5 a 10 mm de diámetro. Los frutos de esta especie son aquenios de color café sin vellosidad (Velasquez Aliaga, 2007).

- Usos etnobotánicas

La especie *Baccharis latifolia* tiene una gran fama en varios países donde se encuentra presente, se utiliza desde muchos años atrás en la medicina tradicional para los problemas renales, dolores estomacales, hepáticos, además se usa para aliviar los resfriados, fracturas, reumatismo, diarreas, diabetes, insomnio, asma y tratamientos antiinflamatorios (González Dávalos, Villca Jiménez, & Loza Almanza, 2007; Secada Castañeda, Célis, & Luengas Caicedo, 2015).

En la actualidad muchas etnias en el Ecuador utilizan la *Baccharis latifolia*, en la provincia de Pichincha. Los Mestizos trabajan con la medicina ancestral, por una parte ellos utilizan las hojas asadas para aliviar y curar las torceduras, dislocaciones de huesos, dolores de cabeza, dolores de muelas, diarreas y hemorroides. Otra etnia que se encuentra en la Sierra-Loja con el nombre de Kichwa utilizan el extracto de la planta de chilca para tratar heridas con inflamaciones, también se emplea para las dolencias del aparato reproductor femenino interno. En las provincias de Imbabura y Napo existen algunas etnias que aprovechan la chilca para tratar infecciones cutáneas y heridas en la piel (Guerra Cajas, 2016).

2.4.2 *Coriandrum sativum*



Figura 2 Cilantro (Coriandrum sativum)

Fuente: Autor

- Origen

Coriandrum sativum, se originó del sur de Europa. Hace 5000 años se utiliza en la India, además esta especie apareció en 1550 A.C., en los registros egipcios, en esos tiempos a esta planta se usó extensamente como condimento y planta medicinal para curar diferentes enfermedades, también se ha encontrado semillas en sepulturas egipcias. Algunos historiadores afirman que los romanos introdujeron las semillas de cilantro a Inglaterra en la época de la Era Cristiana (Morales, 1995). En 1670 se cultivó por primera vez en los Estados Unidos. Asimismo, las semillas de cilantro aparecen en Sur América, Centro América, y Caribe, gracias a los colonizadores españoles en el siglo XV. Cabe destacar que su nombre científico *Coriandrum* proviene de la palabra griega Koris que significa “chinche” (insecto de olor fuerte), debido a su olor característico (Díaz García, 2002).

- **Clasificación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sud-clase: Apioideae

Orden: Apiales

Familia: Apiaceae

Género: *Coriandrum*

Especie: *C. sativum*

- **Nombres comunes**

Coriandrum sativum, a nivel mundial se conoce con diferentes nombres a esta especie, en España (Cilantro, Cilantrico, Verdecito, Recaito, Verdurita), Estados Unidos (Coriander, Chinese parsley), Francia (Coriandre), Alemania (Korinder), China (Uen sai), y en Ecuador, Colombia, Perú, Venezuela (Cilantro, Culantro, Hierbita) (Morales, 1995).

- **Descripción botánica**

Coriandrum sativum, conocida con el nombre de cilantro, perteneciente a la familia Umbelliferae (Apiaceae), es una especie anual de rápido crecimiento, llegando a medir entre 50 a 80 cm en planta madura (Fuentes Cordova, 2014). El sistema radicular de esta especie es sencillo y fino, contiene una raíz principal delgada, además está conformada con una gran cantidad de pequeños pelos radicales por lo que se hace dificultoso el trasplante a tierra. Las primeras hojas del cilantro tienen formas redondeadas, poseen un color verde oscuro, verde claro; las hojas en la

etapa madura tienen un color verde-amarillo, contiene bordes intensamente dentados y no muy divididos. Los tallos del cilantro son delgados, cilíndricos, ramosos, lisos, en la base del tallo tiene un color ligeramente violeta oscuro, además posee una terminación de umbela de flores blancas y ligeramente púrpura. Las flores son pequeñas de color blanco-grisáceo y ligeramente rosadas, además son hermafroditas, contiene cáliz pequeño, también son agrupadas en umbelas compuestas por la unión de cinco a nueve brácteas; la floración de esta especie tiene una duración de dos a cuatro semanas, al final la planta muere al completarse la maduración de las semillas. Las semillas tienen un diámetro de 3 a 6 mm, con forma redonda, de color verde cuando son jóvenes y de color café o marrón al madurar (Morales, 1995; Yauri Ordóñez, 2015; Chávez Rodríguez, 2016)

- Usos etnobotánicos

Coriandrum sativum, es una especie vegetal que se emplea en la medicina tradicional en tratamientos de afecciones gastrointestinales, además se utiliza como analgésico, antiespasmódico, antipirético, antibiótico, carminativo y eupéptico. El cilantro tiene diferentes componentes primarios que contienen propiedades antiartríticas y antirreumáticas. Numerosas investigaciones señalan que el *Coriandrum sativum* presenta actividad antibacterial, antimicrobiana, antimutagénica, diurética, hipolipidémico, hipotensora, y hipoglicémica, las semillas en México tienen gran importancia, tienen poder de estimulante, se emplean cuando existe dolor estomacal o molestias en las vías digestivas (López Reyes, 1999; González-Palomares, Rivera-Camero, & Rosales-Reyes, 2010).

El cilantro tiene diferentes usos en la alimentación, ya que se usa como saborizante, también se utiliza en la producción de perfumes y bebidas, y además en la elaboración de tabacos (Parthasarathy, Chempakam, & Zachariah, 2008).

2.5 ACEITES ESENCIALES

- **DEFINICIÓN:** Los aceites esenciales (también conocidos como esencias, aceites etéreos o volátiles) son el producto final del metabolismo secundario que se obtiene a través de las plantas, es un líquido con la mezcla de sustancias aromáticas o variables orgánicas olorosas (acetonas, cetonas, alcoholes, aldehídos y ésteres), con contextura espesa, el color varía según la especie vegetal del cual se extrae el A.Es.¹, (González Villa, 2004; Ordaz *et al.*, 2011).

2.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Según Martínez (2003), los aceites esenciales se clasifican por diferentes criterios: entre ellos se destacan por su consistencia, origen y naturaleza química (componentes mayoritarios).

Consistencia: los aceites esenciales (A.Es.), se clasifican en bálsamos, oleorresinas y esencias fluidas. Los bálsamos tienen consistencia más espesa, no muy volátiles y tienden a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas son líquidos con consistencia semi sólida, el aroma es muy concentrado a la planta extraída. Las esencias fluidas son altamente volátiles a temperatura ambiente.

¹ A.Es.: Aceites esenciales

Origen y naturaleza química: Los aceites esenciales se clasifican como artificiales, sintéticos y naturales. Los artificiales se obtienen por numerosos métodos esto se debe al enriquecimiento de la misma esencia con uno o diferentes de sus componentes. Los sintéticos se origina por las combinaciones de varias sustancias químicas, Los naturales se obtienen en cantidades menores de las plantas, por lo tanto tienen un valor muy costoso.

2.5.2 DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS

Los aceites esenciales se encuentra distribuidos alrededor de 50 – 60 familias de plantas que incluyen las Labiadas, Compuestas, Mirtáceas, Umbelíferas, Pináceas, Rutáceas, Lauráceas, Rosáceas, entre otras (González Villa, 2004). Los A.Es., se pueden encontrar localizados en diferentes partes de la planta, por ejemplo: en las flores (rosa, lavanda, manzanilla, clavo de olor, tomillo, etc.), en los frutos y semillas (cilantro, perejil, alcaravea, laurel, etc.), en el pericarpio del fruto (toronja, mandarina, limón, naranja, etc.), en las hojas (chilca, menta, cedrón, eucalipto, romero, limoncillo, etc.), y en las raíces (jengibre, cúrcuma, sándalo, cálamo, ásaro, etc.) (Martínez, 2003).

2.5.3 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Las propiedades físicas de los aceites esenciales son: su sabor es muy cáustico, irritante, concentrado, algunos son amargo o dulces; el olor penetrante y pronunciado, la mayoría de los A.Es., poseen la densidad inferior a la del agua, sin embargo, el clavo de olor, sasafrás y la canela, contienen una densidad mayor a la unidad, contienen el índice de refracción elevado ya que la mayoría de los A.Es., desvían la luz polarizada (Martínez, 2003).

Además, son solubles en aceites, éter de petróleo, alcohol y otros solventes orgánicos. También son volátiles, porque tienen una gran facilidad de pasar de estado líquido a gaseoso a temperatura ambiente; e insolubles en agua (Montoya Cadavid, 2010).

2.5.4 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

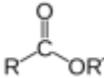
Las características químicas de los aceites esenciales permiten clasificarlos en no terpenoides y terpenoides.

- **No terpenoides.** En este grupo están presente las sustancias aromáticas, sustancias con azufre, sustancias nitrogenadas y sustancias alifáticas de cadena corta. No tienen mucha importancia como el caso de los terpenoides.
- **Terpenoides.** Este es el grupo más importante tanto comercialmente como por sus propiedades.

Los terpenos son una clase de sustancia química que se encuentra en las resinas y aceites esenciales. Además de los terpenos, se derivan los monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}) y los diterpenos (C_{20}). Los cuales pueden ser aromáticos o cíclicos y alifáticos (Martínez, 2003; UPM, s.f).

Los aceites esenciales, su estructura química está conformada por la presencia de grupos funcionales como: aldehídos, alcoholes, cetonas, terpenos, ésteres, fenoles, etc., los mismos que son responsables de los principios activos de un aceite esencial y de las propiedades medicinales como terapéuticas: antirreumáticas, antiespasmódicas, antibacterianas, antisépticas, diuréticas, depurativas, sedantes, tonificantes, entre otras (Del Valle Solórzano & Zambrano Delgado, 2015). Además las propiedades terapéuticas debidas a activos fotoquímicos, que incluyen cumarinas, carotenos, flavonoides, curcumarinas y terpenoides (Pérez Lainez, 2014).

Tabla 1 Grupos funcionales presentes en los aceites esenciales

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Aldehído	Ar-CHO	Citral, Citronelal	Sedante, espasmolítico, antiviral.
Alcohol	Ar-OH	Mentol, geraniol	Antiséptico, tonificante, espasmolítico, antimicrobiano.
Cetona	Ar-CO-Ar	Alcanfor, tuyona	Neurotóxico, mucolítico, regenerador celular.
Ester		Salicilato de metilo	Sedativo, antifúngico, espasmolítico
Ésteres	Ar-O-Ar	Cineol, ascaridol	Estimulante, espesante
Fenol		Eugenol, carvacrol timol	Irritante, estimulante inmunológico, antimicrobiano.
Monoterpeno	Cíclico insaturado	Limoneno, pineno	Antitumoral, descongestionante, antiviral, estimulante

Fuente: (Pérez Lainez, 2014).

2.5.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Según Martínez (2003) menciona que existen varios procesos para la extracción de los aceites esenciales, que varían según la naturaleza de la esencia, de sus propiedades, y en qué parte de la matriz vegetal se halla presente. Los métodos más utilizados son: extracción con solventes volátiles, expresión o prensado, destilación con vapor de agua, fluidos supercríticos y con *enfleurage* o enflorado.

2.5.5.1 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES VOLÁTILES

En este proceso se utiliza las muestras molidas y secas, se debe poner en contacto con solventes tales como cloroformo o alcohol (Martínez, 2003). Estos solventes solubilizan los aceites esenciales, pero estos compuestos extraen otras sustancias tales como cera y grasas, obteniéndose al final una esencia impura. Con esta técnica se trabaja a nivel de laboratorios, a nivel industrial resulta demasiado costoso. A través de este método no se obtiene el aceite esencial puro sino esencias mezcladas con diferentes sustancias (Pérez Lainez, 2014).

2.5.5.2 EXTRACCIÓN POR EXPRESIÓN O PRENSADO

En esta técnica el material vegetal es prensado o exprimido de manera mecánica para liberar el aceite esencial, se recolecta y al final es filtrado. Se emplea más esta técnica en la extracción de esencias, de especies cítricas (Tol Hernández, 2005).

2.5.5.3 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Este método tiene gran importancia en la extracción de aceites esenciales, por ser accesible, rápido y por no tener costos elevados.

Esta técnica se utiliza para separar las esencias de las especies vegetales insolubles en el agua y ligeramente volátiles a temperatura ambiente; de esta manera, compuestos orgánicos de elevado punto de ebullición son destilados con cierta rapidez, por debajo del punto de ebullición del agua, al conseguir ser arrastrados por el vapor generado (SENA, 2004).

Además se emplea muestras de vegetal (secas o frescas), las cuales serán depositadas en una cámara inerte y sometida a una corriente de agua sobrecalentada, donde el vapor pasa por las muestras arrastrando las esencias de las especies vegetales, seguidamente se condensa al atravesar el condensador por el cual circula agua fría, gracias a una serpentina, de esta manera se recupera el hidrolato con el aceite esencial (Martínez, 2003; Vera Castro, 2018).

2.5.5.4 EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Según Martínez (2003) es una técnica que se está desarrollando en la actualidad, se emplea material vegetal, cortado en porciones pequeñas, se deposita en una cámara de acero inoxidable y se hace circular por un líquido supercrítico (dióxido de carbono líquido), así ayuda a que las esencias se solubilizan, se arrastren; y el líquido supercrítico sirve como solvente extractor, se elimina por la temperatura ambiente y la descompresión progresiva hasta alcanzar la presión, por último se obtendrá el aceite esencial completamente puro. Es una técnica muy costosa porque se necesitan

equipos, bombas de alta presión, además de un sistema de extracción que resistan a las elevadas temperaturas (Pérez Lainez, 2014).

El dióxido de carbono líquido (CO₂), además de extraer el aceite esencial sirve para extracción de antimicrobianos, pigmentos, carotenoides antioxidantes y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para medicina, alimentos y productos de perfumería (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009).

2.5.5.5 EXTRACCIÓN POR ENFLEURAGE O ENFLORADO

Esta técnica se emplea principalmente para flores delicadas (jazmín, azahar, rosas, violeta, acacia, también para resinas como la mirra), sensibles al calor y costosas.

Los pétalos de la flor frescos se colocan conjuntamente con una capa fina de grasa, y el perfume emitido por las flores se absorbe. La extracción del aceite esencial de los pétalos tiene un tiempo duración de dos a tres meses, pasado ese tiempo varias capas de grasas se saturan con las moléculas perfumadas del aceite de la flor, además se trata con alcohol etílico y posteriormente se destila al vacío obteniendo la esencia. La mano de obra hace que este tipo de extracción sea muy costosa (SENA, 2004).

2.5.5.6 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

De acuerdo a De León Juárez (2008) para realizar un buen control de calidad de los aceites esenciales, los procesos son similares a los que se usan para controlar o caracterizar un medicamento. Existen controles de dos niveles:

- Controles físicos.

Organolépticos (color, olor, sabor)

Constantes físicas (densidad, viscosidad, temperatura de evaporación, etc.)

- Controles químicos.

Varios tipos de cromatografías (Diaz Arcos & Martínez Chuquillanqui, 2013)

2.5.5.7 CRITERIOS DE CALIDAD DE LOS ACEITES

ESENCIALES

En la actualidad existen criterios relevantes sobre la calidad de los aceites esenciales, los principales son:

- La forma de colección (estación, hora, madurez, etc.)
- Las partes de las especies vegetativas usadas (frutas, semillas, flores, hojas, raíz, etc.)
- Condiciones en el momento de la extracción (tiempo de destilación, temperatura, método de extracción, equipo usado, etc.)
- El quimiotipo (determinado por cromatografía, en especial por cromatografía en fase gaseosa) (De León Juárez, 2008; Diaz Arcos & Martínez Chuquillanqui, 2013)

2.6 MEDIO DE CULTIVO

- **DEFINICIÓN:** Un medio de cultivo es permite que el microorganismo pueda desarrollarse, además debe reunir una serie de condiciones como son: grado de humedad, temperatura, presión de oxígeno, también un correcto grado de alcalinidad o acidez. El medio de cultivo debe contener los elementos necesarios para nutrir, factores de crecimiento y por consiguiente debe estar libre de microorganismos contaminantes (Casado González, Torrico Cabezas, & Medina Anguita, 2012).
- **AGAR:** El agar es el principal elemento en la preparación de medio de cultivo porque ayuda en la solidificación (Casado González *et al.*, 2012).
- **GELATINA:** Es un agente solidificante, pero no se utiliza mucho, ya que algunas bacterias provocan su licuación (Casado González *et al.*, 2012).

2.7 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

- **DEFINICIÓN:** Las pruebas bioquímicas o también llamadas baterías están compuestas por un conjunto de azúcares, los que son necesarios para el desarrollo de enterobacterias, las mismas requieren un medio de cultivo específico donde crecer y así producir diversas reacciones (Jima Solano, 2015).

2.7.1 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

- **DEFINICIÓN:** La prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA) es una de las armas más importantes que se utilizan en la mayoría de los laboratorios clínicos, para ayudar en la identificación de microorganismos que afectan a pacientes en procesos infecciosos. En la PSA, se debe cumplir con un requisito fundamental: es importante lograr el aislamiento del agente biológico productor del cuadro clínico por medio de cultivos correspondientes (Herrera, 1999).

2.7.2 TÉCNICAS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

2.7.2.1 DILUCIÓN EN AGAR

El método de dilución en agar como test de susceptibilidad microbiana es únicamente cualitativo, además esta técnica se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Donde el CMI se define como la sustancia en concentración más baja que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación, y la CMB es la concentración más baja que ayuda a prevenir el crecimiento de un microorganismo después de ser cultivada en otro medio libre de compuesto evaluado. Además estas dos variables son herramientas de gran importancia para la investigación de nuevos antimicrobianos (Ramirez & Marin Castaño, 2009).

En el método de dilución en agar se debe considerar ciertos aspectos como:

- Las cajas Petri deben contener el agar más la sustancia (aceite esencial, antibiótico, extracto vegetal, etc.), solidificado.
- Se inoculan con el microorganismo en estudio.
- Se incuban por 24 horas, en caso de ser bacterias.
- Se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas Petri.

EL problema principal de este método, es que necesita de una gran cantidad de muestra para evaluar.

2.7.2.2 CAJA PETRI INVERTIDA

Según Reyes Jurado *et al.* (2014), la caja Petri invertida es un método nuevo muy poco utilizado en la actualidad, la técnica consiste en colocar el agar inoculado, y el papel filtro se impregna con el aceite esencial previamente disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo o en otro solvente. Luego este es colocado sobre la tapa de una caja Petri, mientras la base de la caja Petri contiene el agar inoculado (solidificado) y en la tapa se encuentra el papel filtro, que contiene el aceite esencial colocándose de manera invertida. Con esto se espera una volatilización del aceite esencial con dirección al microorganismo en estudio (Kloucek *et al.*, 2012).

2.7.2.3 MICRODILUCIÓN EN CALDO

Según García *et al.* (citado en Vera Castro, 2018) a esta técnica se denomina también microdilución. En este procedimiento se utilizan microplacas plásticas (placas microtiter), estériles con tapa, de 96 pocillos (12x8) y un fondo redondo o cónico, donde se pueden probar 8 diluciones de 12 antimicrobianos. En los pocillos de las microplacas se deposita el caldo (agar líquido), seguidamente se añaden las distintas concentraciones de sustancias (antibióticos, aceites esenciales, extractos vegetales, etc.) previamente diluidos. Se incuban por un tiempo de 24 a 48 horas, a 37 °C, determinándose la CMI a través del crecimiento visible o empleando el quipo Lector de Microplacas para posterior análisis de los datos obtenidos.

3 MARCO METODOLÓGICO

La presente investigación es de tipo “investigativa – experimental, la cual se desarrolló en la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, en los laboratorios de Ciencias de la Vida, en las áreas de Microbiología y Química Analítica, en donde se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales. La composición química fue determinada en la Universidad Politécnica Salesiana en Quito.

3.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL Y AISLAMIENTO DE LA BACTERIA

Se tomaron muestras de las hojas de geranio al azar en el cantón El Pan y se llevó al laboratorio de Microbiología para su posterior aislamiento de la bacteria en estudio.

3.1.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE PLANTAS INFECTADAS

Se recolectó las hojas infectadas de geranio del cantón El Pan de la Provincia del Azuay, con las siguientes coordenadas S=2°79'0017" y W=78°66'00.8967"

EQUIPO

- GPS

MATERIALES

- Tijera

- Fundas auto sellantes

PROCEDIMIENTO

Las hojas recolectadas en el cantón El Pan, que presentaban síntomas de lesiones acuosas en el envés de las hojas, además marchitamiento marginal acompañados de necrosis intervenosa, fueron cortadas y almacenadas en fundas plásticas auto sellantes.



Figura 3 Hojas de geranio infectadas
Fuente: Autor

3.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE LA BACTERIA *Xanthomona sp*

Según Schaad *et al.*, citado en Junco Solórzano (2015), los medios de cultivo más recomendados para el aislamiento y caracterización de *Xanthomona sp.*, son los descritos a continuación:

- YDCA (Yeast extract-dextrose-carbonate-agar). Es un medio diferencial que es ampliamente recomendado para la diferenciación de colonias,

además para observar la producción de exopolisacáridos de las especies del género

Xanthomona sp. Está compuesto por 12 g.L⁻¹ de carbonato de calcio, 20 g.L⁻¹ de agar nutritivo, 12 g.L⁻¹ de extracto de levadura, y 20 g.L⁻¹ de sacarosa.

- LB (Luria Bertani). Es un medio nutritivo, ya que este medio no hace crecer preferentemente una bacteria fitopatógena sobre otra, se utilizó para preservación de la bacteria *Xanthomona sp.* Está compuesto por 10 g.L⁻¹ de cloruro de sodio, 15 g.L⁻¹ de agar nutritivo, 5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, y 10 g.L⁻¹ de triptona.

El medio diferencial (YDCA) y el medio nutritivo (LB), fueron modificados conforme a lo establecido por Junco Solórzano (2015) en el trabajo investigativo “Caracterización Morfológica, Bioquímica y Molecular de Seis Aislados Venezolanos de *Xanthomonas sp.*”.

3.2.1 AISLAMIENTO DE LA BACTERIA FITOPATÓGENA

Xanthomona sp

La bacteria fitopatógena del género *Xanthomonas*, es una de las especies principales que causan graves enfermedades en plantas de uso comercial y agrícola. Se encuentran presentes en cultivos de mayor interés como algodón, arroz, especies hortícolas, plantas leñosas, frutales de hueso y plantas ornamentales (Cubero *et al.*, 2012).

MATERIALES

- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Autoclave
- Vasos de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio al 1 %
- Agua estéril
- Cajas Petri
- Pinza
- Bisturí
- Micropipeta de 10 μ L
- Micropipeta de 100 μ L
- Medio Nutritivo (LB)
- Medio Diferencial (YDCA)

PROCEDIMIENTO

El aislamiento de la bacteria fitopatógena *Xanthomona sp.*, se realizó a partir de las hojas de geranio, siguiendo la metodología propuesta por Corzo López *et al.*, (2015) con modificación en el procedimiento establecido en el trabajo “Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) en la provincia Mayabeque, Cuba”.

Las hojas se lavaron por un tiempo de diez minutos en agua corriente, seguidamente se cortó las muestras en pequeñas porciones que contenía tejido

enfermo o infectado con la ayuda de un bisturí previamente desinfectado. Las pequeñas muestras cortadas se desinfectaron por separado con Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1% por un tiempo de dos minutos, posteriormente se enjuagó con agua destilada. Se maceró los fragmentos pequeños por separado en agua destilada estéril.

A continuación se utilizó 60 cajas Petri que contenía YDCA para cada muestra, donde se inoculó con 10 µL del macerado, 15 cajas por muestra, de igual modo se inoculó 15 cajas Petri con 100 µL de macerado por muestra. Las cajas Petri inoculadas se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

Se tomó en consideración las colonias de color amarillo con aspecto mucoso, convexas con bordes enteros, obtenido en medio cultivo YDCA, se realizó la tinción de Gram, y las respectivas pruebas bioquímicas para *Xanthomona sp.*

Se colocó la cepa pura de la bacteria *Xanthomona sp.*, en un medio nutritivo (LB), se incubó a 30 °C durante 30 días, para posteriores análisis con los aceites esenciales.

3.2.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA FITOPATÓGENA *Xanthomona sp*

Las pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria fitopatógena *Xanthomona sp.*, se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Para las pruebas bioquímicas se empleó la metodología propuesta por Junco Solórzano (2015) con modificación en el procedimiento establecido en el trabajo “Caracterización Morfológica, Bioquímica y Molecular de seis Aislados Venezolanos de *Xanthomonas sp*”.

TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es una técnica muy utilizada en Microbiología, divide a las bacterias con pared del Dominio *Bacteria* en dos grupos importantes: bacterias con pared de tipo Gram negativa y bacterias con pared de tipo Gram positiva (Vázquez *et al.*, 2011).

EQUIPOS

- Microscopio óptico

MATERIALES

- Portaobjeto
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Agua destilada
- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol
- Safranina
- Acetona

PROCEDIMIENTO

Con la ayuda de un asa bacteriológica se tomó la muestra de investigación, se colocó en el portaobjeto.

La tinción se realizó con los siguientes pasos. Se inició colocando el cristal de violeta por un tiempo de un minuto, el cual es el colorante primario. Seguidamente se lavó, se adicionó lugol por un tiempo de treinta segundos. Posteriormente se enjuagó, se adicionó el solvente no polar (alcohol/acetona) por un tiempo de quince segundos de igual manera se enjuagó. Finalmente se realizó la contra-tinción colocando la safranina en el portaobjetos por un tiempo de dos minutos, se enjuagó con abundante agua destilada. Se secó el portaobjeto flameando en el mechero.

Se observó la tinción en el microscopio óptico con el lente de 100 aumentos.

ACTIVIDAD DE LA UREASA

Esta prueba bioquímica determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Se utiliza para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan positivo retardado o negativo (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Balanza analítica
- Cocina eléctrica
- Autoclave
- Cámara de Flujo Laminar
- Estufa marca Memmert

MATERIALES

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Pipeta de 25 mL
- Agua destilada
- Varilla de vidrio
- Tubos de ensayo
- Agar Urea
- Pipeta de 25 mL

PROCEDIMIENTO

Se pesó 6 g de agar urea, se colocó en el matraz Erlenmeyer, se adicionó 250 mL de agua destilada, se calentó, se procedió a esterilizar la mezcla.

Se llevó a la cámara de flujo laminar, se colocó la mezcla en los tubos de ensayo con la ayuda de una pipeta.

Se dejó reposar por 30 minutos con la finalidad que se solidifique en forma de pico de flauta, se realizó la siembra, se incubó a una temperatura de 30 °C por 24 horas.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA

Determina la presencia del enzima catalasa en una bacteria que posee citocromos. La enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno por consiguiente se libera de forma gaseosa formando burbujas (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Cámara de Flujo Laminar

MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Portaobjeto
- Peróxido de hidrógeno al 10% (H₂O₂)
- Mechero

PROCEDIMIENTO

Se toma la muestra de estudio con el asa bacteriológica, se coloca en el portaobjetos. Se adiciona una gota peróxido de hidrógeno al 10%.

OXIDASA

Esta prueba bioquímica determina la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se da por la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que se reduce por el oxígeno que origina peróxido de hidrógeno o agua según el género bacteriano (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Cámara de Flujo Laminar

MATERIALES

- Cajas Petri (propagada la bacteria de estudio)
- Tiras Oxido-Reducción
- Mechero

PROCEDIMIENTO

Se utilizaron las cajas Petri que contiene la bacteria de estudio previamente propagadas, se introdujo las tiras de óxido-reducción.

REDUCCIÓN DE NITRATOS A NITRITOS

El objetivo de esta prueba es determinar la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos y convertirlos en nitritos. Con esta técnica se estudia la presencia de nitrato reductasa y nitrito reductasa (Fernández Olmos 2010).

EQUIPOS

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Pipeta de 25 mL
- Varilla de vidrio
- Mechero
- Tubos de ensayo

COMPOSICIÓN DEL MEDIO PARA LA REDUCCIÓN DE NITRATOS A NITRITOS

- Peptona 10 g
- NaCl 5 g
- KNO₃ 1 g
- Agua destilada 1 L

REACTIVOS

- Solución A
0.8 g ácido sulfanílico disuelto en 1000 mL de ácido acético 5N
- Solución B
0.5 g de α -naftilamina disuelto en 1000 mL de ácido acético 5N
- Polvo de Zinc

PROCEDIMIENTO

Se preparó el agar semisólido con los respectivos componentes bien disueltos, se coloca en los tubos de ensayo, se esterilizó el medio de reducción de nitratos a nitritos, se realizó la inoculación con la muestra, dejando por 24 horas en la estufa marca Memmert a una temperatura de 37 °C.

Trascurrido el tiempo se añadió unas gotas de la solución A y unas gotas de la solución B en los tubos de ensayo. Además, se añadió una pequeña cantidad de polvo de Zinc.

LICUEFACCIÓN DE GELATINA

Con esta prueba se determina la capacidad de ciertas bacterias para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas capaces de producir gelatinosas se denominan gelatinasas (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Cocina eléctrica
- Balanza analítica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL
- Pipeta de 25 mL
- Tubos de ensayo
- Agar Nutritivo
- Gelatina sin sabor

PROCEDIMIENTO

Se preparó 200 mL de agar nutritivo con 2.4 g de gelatina sin sabor, se colocó en los tubos de ensayo para esterilizar, se inculó la muestra, incubando por dos días a una temperatura de 30 °C.

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Mediante esta prueba bioquímica se puede determinar la capacidad de una bacteria de metabolizar un hidrato de carbono específico (glucosa, lactosa o ambas) agregando en un medio de crecimiento básico. Producción o no de gases: dióxido de carbono (CO₂) y dihidrógeno (H₂) como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono. Además producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Cocina eléctrica
- Balanza analítica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Pipeta de 25 mL
- Tubos de ensayo
- Agar de hierro de Kligler (KIA) 64.52 g en 1 L
- Mechero
- Asa bacteriológica

PROCEDIMIENTO

Se pesó 6.45 g y se diluyó en 100 mL de agua destilada, se calentó la mezcla, se coloca en los tubos de ensayo, se esterilizó, se deja que solidifique el medio en forma de pico de flauta, se realizó la siembra incubando de 18 – 24 horas, transcurrido este tiempo se realizó la respectiva interpretación de los resultados obtenidos en los tubos de ensayo.

PRODUCCIÓN DE INDOL

Mediante esta prueba bioquímica se puede detectar en un cultivo bacteriano la liberación de indol, esto se lleva a cabo por la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Cocina eléctrica
- Balanza Analítica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Pipeta de 25 mL
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Asa bacteriológica

- Caldo de triptófano

PROCEDIMIENTO

Se preparó 250 mL de caldo de triptófano, se colocó en los tubos de ensayo, se esterilizó, seguidamente con el asa bacteriológica se pinchó hasta el fondo, se realizó la siembra en forma de estría en el bisel con la muestra de estudio, se incubó por 24 horas a una temperatura de 37 °C, tras la incubación, se añadió unas gotas de reactivo de Kovacs.

PRODUCCIÓN DE AMILASAS

El propósito principal de esta prueba bioquímica es determinar la capacidad de una bacteria de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos. Con la finalidad de probar la desaparición del almidón por el uso de lugol (Junco Solórzano, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE SEIS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas* sp, 2015).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero
- Asa bacteriológica

- Cajas Petri
- Agar nutritivo
- Almidón de yuca
- Lugol

PROCEDIMIENTO

Se pesó 4.8 g de agar nutritivo más 0.2 g de almidón de yuca, se diluyó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agua destilada, se calentó la mezcla, esterilizó, colocó en las cajas Petri, dejó solidificar, realizó la inoculación de la muestra de estudio en forma de raya con la ayuda del asa bacteriológica, se incubó a una temperatura de 30 °C por 24 horas, transcurrido el tiempo se añadió unas gotas de lugol para revelar si hay hidrólisis de almidón.

OXIDACIÓN–FERMENTACIÓN DE AZÚCARES EN MEDIO OF

En esta prueba bioquímica las bacterias anaerobias facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas. Estos pueden manifestar en el medio un indicador de pH (Fernández Olmos *et al.*, 2010).

EQUIPO

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL

- Pipeta de 25 mL
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensayo

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN DE AZÚCARES EN MEDIO OF

- Peptona 2 g
- NaCl 5 g
- Fosfato Dipotásico 0.3 g
- Azul de Bromotimol 0.03 g
- Agar 3 g
- Glucosa 10 g
- Agua destilada 1 L
- pH 7.4

PROCEDIMIENTO

Se prepararon 100 mL de medio de oxidación-fermentación, se colocó en los tubos de ensayo, esterilizó, dejó solidificar el medio en forma de pico de flauta, inoculó la muestra de estudio, incubó por 24 horas a una temperatura a 30 °C.

CRECIMIENTO EN AGAR MacConkey

Esta prueba bioquímica se emplea el agar MacConkey para separar las bacterias fermentadoras de lactosa de aquellas que no fermentan (Junco Solórzano,

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE SEIS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas* sp, 2015) .

EQUIPO

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Cajas Petri
- Agar MacConkey

PROCEDIMIENTO

Se pesó 12.5 g de agar MacConkey y se disolvió en 250 mL de agua destilada, calentó la mezcla, se esterilizó, coloca el medio en las cajas Petri, dejó solidificar el medio por un periodo corto de tiempo, posteriormente se inoculó con la muestra de estudio por agotamiento, se incubó por 24 horas a una temperatura 30 °C.

MOVILIDAD

Si las bacterias migran de la línea de siembra y provocan una turbidez en el medio se considera que tiene movilidad. Si existe crecimiento bacteriano pronunciado en la línea de siembra no tiene movilidad.

EQUIPO

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Agar Nutritivo

PROCEDIMIENTO

Se pesó 5 g de agar nutritivo para disolver en 250 mL de agua destilada, calentó la dilución, colocó en los tubos de ensayo, esterilizó, se dejó solidificar el agar. Por último, tomó con el asa bacteriológica la muestra de estudio, inoculó en forma de picadura, finalmente se incubó a 30 °C por 24 horas.

CITRATO DE SIMMONS

Según Fernández Olmos *et al.*, (2010), esta prueba bioquímica se utiliza para determinar si las bacterias son capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono y sales amónicas inorgánicas como fuente de nitrógeno, es decir provocará la alcalinización del medio.

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Vaso de precipitación de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Agar de Simmons

PROCEDIMIENTO

Se pesó 6 g de agar de Simmons, disolvió en 250 mL de agua destilada, calentó la dilución, colocó en los tubos de ensayo y esterilizó, dejó solidificar el agar en forma de pico de flauta, con el asa bacteriológica se tomó la muestra de estudio, se inoculó en forma de estría, se incubó a 30 °C por 24 horas.

3.3 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA

***(Baccharis latifolia)* Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)**

Se tomaron muestras de hojas de chilca al azar de los arbustos en el cantón Paute, además se compraron las semillas de cilantro y se llevó al laboratorio de Química para su posterior extracción de los aceites esenciales

3.3.1 RECOLECCIÓN DE HOJAS DE CHILCA (*Baccharis latifolia*)

Las muestras de hojas de chilca (*Baccharis latifolia*), se recolectó de los arbustos, que se encuentra en el cantón Paute de provincia del Azuay, en las siguientes coordenadas S=2°47'14.4428" y W=78°46'31.8828".



Figura 4 Arbustos de chilca (*Baccharis latifolia*). Cantón Paute – Azuay.
Fuente: Autor

3.3.1.1 LIMPIEZA, LAVADO, SECADO, SELECCIONADO DE LAS HOJAS DE CHILCA (*Baccharis latifolia*)

LIMPIEZA

Se procedió a la limpieza de las hojas de chilca, eliminando las materias extrañas, las hojas infectadas por fitopatógenos, dañadas por insectos y las hojas marchitas.

LAVADO

Las hojas se lavaron con agua potable a temperatura ambiente, se realizó con la finalidad de eliminar residuos de tierra que se encuentran presentes en las hojas.

SECADO

El secado de las hojas de chilca se realizó durante dos a tres días a temperatura ambiente, evitando la luz directa del sol.

SELECCIÓN

Las hojas verdes de chilca se seleccionaron por tamaños con la finalidad de determinar las hojas que contengan mayor contenido de aceites esenciales.

3.3.2 OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS DE CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

Las semillas de cilantro se compraron en el Almacén Agropecuario “TecniAgro”, ubicado en el cantón Paute de la provincia del Azuay que se encuentra en las siguientes coordenada S=2°46'40.8828" y W=78°45'48.3264".



Figura 5 Almacén Agropecuario “TecniAgro”. Cantón Paute – Azuay

Fuente: Autor

3.3.2.1 MOLIDO DE LAS SEMILLAS DE CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

Las semillas de cilantro se trituraron en la licuadora industrial Blender C816, con la finalidad de facilitar la extracción del aceite esencial.

3.3.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

Una vez seleccionadas las hojas de chilca, trituradas las semillas de cilantro, se da inicio a la extracción del aceite esencial, utilizando el proceso de destilación por arrastre de vapor.

EQUIPOS

- Equipo de destilación por arrastre de vapor
- Centrífuga
- Balanza analítica

MATERIALES

- Embudos de decantación de 500 mL
- Soportes metálicos
- Pinzas
- Micropipeta 1000 μ L

PROCEDIMIENTO

Se utilizó el equipo de destilación por arrastre de vapor de acero inoxidable de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Se inició llenando el tanque o la olla de la caldera con 38 L de agua corriente aproximadamente, se pesó el material vegetal, se procedió a colocar en el equipo destilador, se cerró herméticamente para evitar fugas de vapor en el momento que la hornilla sea encendida. A medida que la temperatura y la presión se van elevando, el vapor tiene contacto con la materia vegetal y va arrastrando el aceite esencial. Se

debe dejar correr el agua de manera constante por el refrigerante en el momento de la extracción con la finalidad de no perder el aceite esencial liberado por el vapor.

Una vez condensado esta mezcla aceite-agua, se recogió en un embudo de decantación para la separación de fases entre aceite esencial y el hidrolato, con la ayuda de una micropipeta de 1000 μL , se extrajo el aceite esencial, se depositó en tubo cónico de 50 mL, se centrifugó durante 10 minutos.

Se extrajo el aceite esencial, y se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente.



Figura 6 Equipo de destilación por arrastre de vapor. “Universidad Politécnica Salesiana / Sede-Cuenca”.

Fuente: Autor

3.3.4 RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

Para la determinación del rendimiento de los aceites esenciales se calculó con la siguiente ecuación:

Ecuación 1 Porcentaje de rendimiento de aceites esenciales.

$$P = \frac{M2}{M1} * 100$$

En donde:

P= Porcentaje de rendimiento del aceite esencial.

M2= Masa final del aceite esencial (gramos).

M1= Masa inicial de material vegetal (chilca - cilantro)

100= Factor matemático

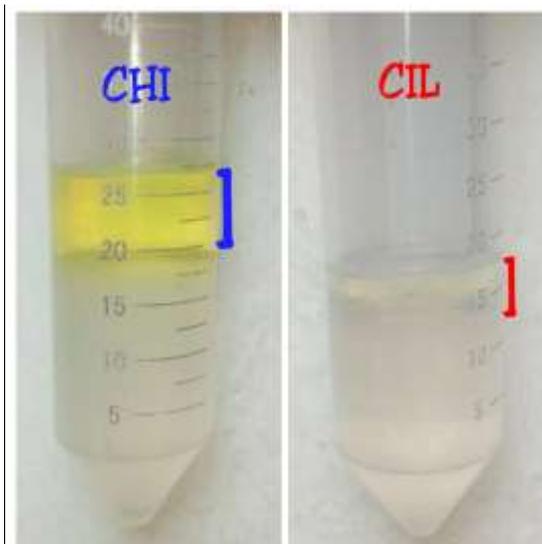


Figura 7 Aceites Esenciales de CHI: (chilca) y CIL: (cilantro).

Fuente: Autor

3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) POR MEDIO DE CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), permite identificar la mayoría de los compuestos en el orden de microgramos. Además es una técnica separativa de mezclas que tiene la cualidad de lograr la separación de mezclas muy complejas (Carvajal Vallejo & Quintero Góngora, 2012).

EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases Varian 3900 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturno 2100

MATERIALES

- Micropipeta

REACTIVOS

- Diclorometano
- Líquido Problema (aceite esencial)

PROCEDIMIENTO

Se realizó una dilución de aceite esencial en Diclorometano (10 μ L en 1 mL), para analizar la muestra por GC-MS en la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) MEDIANTE TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Para definir la calidad de un aceite esencial se determinan las siguientes constantes físico-químicas.

3.5.1 DETERMINACIÓN DEL PESO ESPECÍFICO (DENSIDAD RELATIVA)

El peso específico (densidad relativa), es aquel que determina con el propósito de encontrar la relación entre el peso y el volumen de la muestra (Ortega Lozano, 2018).

EQUIPOS

- Balanza analítica

MATERIALES

- Picnómetro de 5 mL
- Micropipeta de 1000 μ L

PROCEDIMIENTO

La determinación del peso específico (densidad), se realizó siguiendo la metodología propuesta por Miranda Martinez (2002).

Se procedió a pesar el picnómetro de 5 mL limpio, se obtuvo (M), se llenó el picnómetro con agua destilada a 25 °C, se pesó obteniendo (M_1), se vació, se secó el picnómetro, se pesó en la balanza analítica el líquido problema a 25 °C, obteniendo finalmente (M_2).

Para los cálculos del peso específico se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 2 Densidad relativa

$$\rho_{25} = \frac{M_2 - M}{M_1 - M}$$

Donde:

M₂: Peso del picnómetro con el líquido problema (g)

M₁: Peso del picnómetro con el agua destilada (g)

M: Peso del picnómetro vacío (g)



Figura 8 Picnómetro de 5 mL.

Fuente: Autor

3.5.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Según Carvajal Vallejo & Quintero Góngora (2012), el índice de refracción es la relación que está entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso, de una longitud de onda determinada, que traspasa

del aire a la sustancia en estudio, manteniendo la temperatura constante y determinada.

EQUIPOS

- Refractómetro de marca ABBE

MATERIALES

- Cuenta gotas
- Agua destilada
- Líquido problema (aceite esencial)

PROCEDIMIENTO

Para esta prueba, se utilizó un refractómetro de marca ABBE, se comenzó con la calibración del equipo con agua destilada a 25 °C, ajustando a la escala 1.333 (Brix 0%), se colocó dos gotas del líquido problema en el centro de la superficie del prisma, se procedió a la medición este procedimiento modificado de Carvajal Vallejo & Quintero Góngora (2012) en el trabajo “Caracterización fitoquímica, actividad antimicrobiana y antimicótica del aceite esencial de congona” (*Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav).



Figura 9 Refractómetro de marca ABBE.

Fuente: Autor

3.5.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ

Este procedimiento determina, el número de miligramos de hidróxido de potasio que es requerido para neutralizar los ácidos libres que existen en un gramo de sustancia en estudio (Ortega Lozano, 2018).

EQUIPOS

- Equipo de titulación

MATERIALES

- Bureta
- Pipeta
- Pinza
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Agitador magnético

REACTIVOS

- Disolución alcohólica 0,1 N de hidróxido de potasio
- Alcohol etílico 95 %
- Indicador fenolftaleína
- Líquido Problema (Aceite esencial)

PROCEDIMIENTO

En un matraz Erlenmeyer se pesó 2 ± 0.05 g del líquido problema, se adicionó 5 mL de alcohol etílico con una pipeta más 5 gotas de fenolftaleína, se neutralizó la disolución con hidróxido de potasio 0.1 N, hasta el viraje del indicador (la coloración rosa debe persistir al menos por 10 segundos), considerando a este como el punto final de valoración.

Para calcular el índice de acidez del líquido problema (aceite esencial), se aplicó la fórmula utilizada por NMX-K-418-1976 (sf) en la norma mexicana “Determinación del número de acidez en aceites esenciales y productos aromáticos”.

Ecuacion # 3. Índice de Acidez

$$IA = \frac{5,61 * V}{P}$$

Donde:

IA= Índice de acidez o número de acidez

V= Volumen de la disolución en mililitros de KOH utilizados

P= Peso en gramos del líquido problema (aceite esencial) en gramos



Figura 10 Equipo de titulación.

Fuente: Autor

3.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) MEDIANTE MÉTODOS DE DILUCIÓN EN AGAR, CAJA PETRI INVERTIDA, Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Las respectivas pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología, obteniendo los resultados para su posterior interpretación.

3.6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA MUESTRA

Según Cavalieri et al., (2005), para la estandarización de la muestra existe un método suspensión directa de colonias que es más efectivo que proveerá resultados precisos para ciertos microorganismos. La suspensión debe ser estandarizada al estándar 0.5 de McFarland (alrededor de 1.5×10^8 UFC/mL). Se debe utilizar el inóculo dentro de un tiempo determinado (15 minutos).

EQUIPOS

- Espectrofotómetro

MATERIALES

- Asa bacteriana
- Tubo de ensayo
- Mechero
- Solución salina al 0.9 %
- Celdas
- Jeringuilla

PROCEDIMIENTO

Para realizar este método las colonias no deben sobrepasar las 18 a 24 horas de incubación, se suspendió las colonias en una solución salina (suero fisiológico al 0.9 %), se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland en el espectrofotómetro. Este procedimiento es modificado de Cavalieri et al., (2005) en el libro “Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana”, esta metodología es muy utilizada por su efectividad con ciertos microorganismos, además para bacterias fastidiosas que tienen un crecimiento imprescindible como estreptococos.



Figura 11 Equipo espectrofotómetro Genesys 20.

Fuente: Autor

3.6.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

Esta técnica de dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (MIC, 2012).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica
- Agitador Vórtex

MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Mecheros
- Micropipeta
- Antibiótico (Oxitetraciclina)
- Aceite esencial
- Agar TSA
- Agar semisólido Tioglicolato
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo

PROCEDIMIENTO

Se pesó 2.4 g de Agar TSA, se coloca 9.5 mL en los tubos de ensayo, esterilizó el medio, dejó enfriar por un lapso de 15 minutos, adicionó 0.5 mL de la solución A (300 µL de aceite esencial y 200 µL de oxitetraciclina), agitó en el vórtex el Agar TSA con la solución A, la mezcla se transfirió en las cajas Petri, este procedimiento es modificado por Edris & Farrag (2003) en la investigación “Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase”.

A continuación se preparó 45 mL de Agar semi sólido de tioglicolato, esterilizó, dejó enfriar a temperatura ambiente, preparó una solución B (se tomó 500 μ L del estándar 0.5 McFarland), se agitó en el vortex el agar semi sólido con la solución B.

Finalmente se realizó la inoculación del tioglicolato más el coeficiente de MacFarland, se colocó 5 gotas en diferentes partes de la caja Petri que contiene el Agar TSA con el aceite esencial en diferentes concentraciones chilca (100%, 90%, 80%, 70%, 60%); y cilantro (100%, 50%, 30%, 25%, 20%, 10%). Se incubó a 30 °C por un tiempo de 24 a 48 horas.

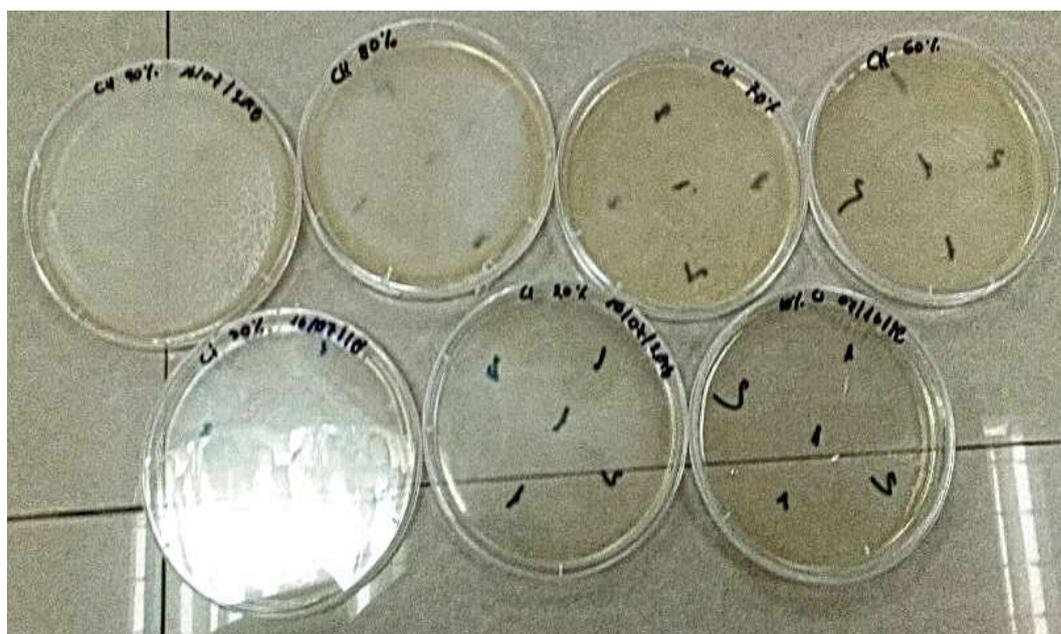


Figura 12 “Dilución en Agar”. CHI: Chilca en diferentes concentraciones de aceite esencial (90%, 80%, 70%, 60%), y CIL: Cilantro en diferentes concentraciones de aceite esencial (30%, 20%, 10%).

Fuente: Autor

3.6.3 MÉTODO DE CAJA PETRI INVERTIDA

Esta es una técnica nueva que se está estudiando en los últimos años, siendo muy utilizada en múltiples áreas de microbiología, biotecnología. Caja Petri invertida es cualitativa-cuantitativa, sus resultados son medibles y se pueden interpretar como sensible, intermedio o resistente (Reyes Jurado, Palou, & Lopéz Malo, 2014).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Agar Mueller Hinton
- Hisopo
- Mecheros
- Inóculo
- Cajas Petri
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL

PROCEDIMIENTO

Se preparó 500 mL de Agar Mueller Hinton, esterilizó, transfirió a las cajas Petri, utilizó un hisopo para tomar la muestra (estandarizada a 0.5 McFarland), se frotó con el inóculo en toda la superficie del agar solidificado.

Se colocó en la tapa de la caja Petri los discos impregnados de aceite esencial en diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%) este procedimiento modificado a lo

establecido por Kloucek (2012) en la investigación “Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapors phase”.

Finalmente se selló, se incubó por 24 horas a una temperatura 30 °C.

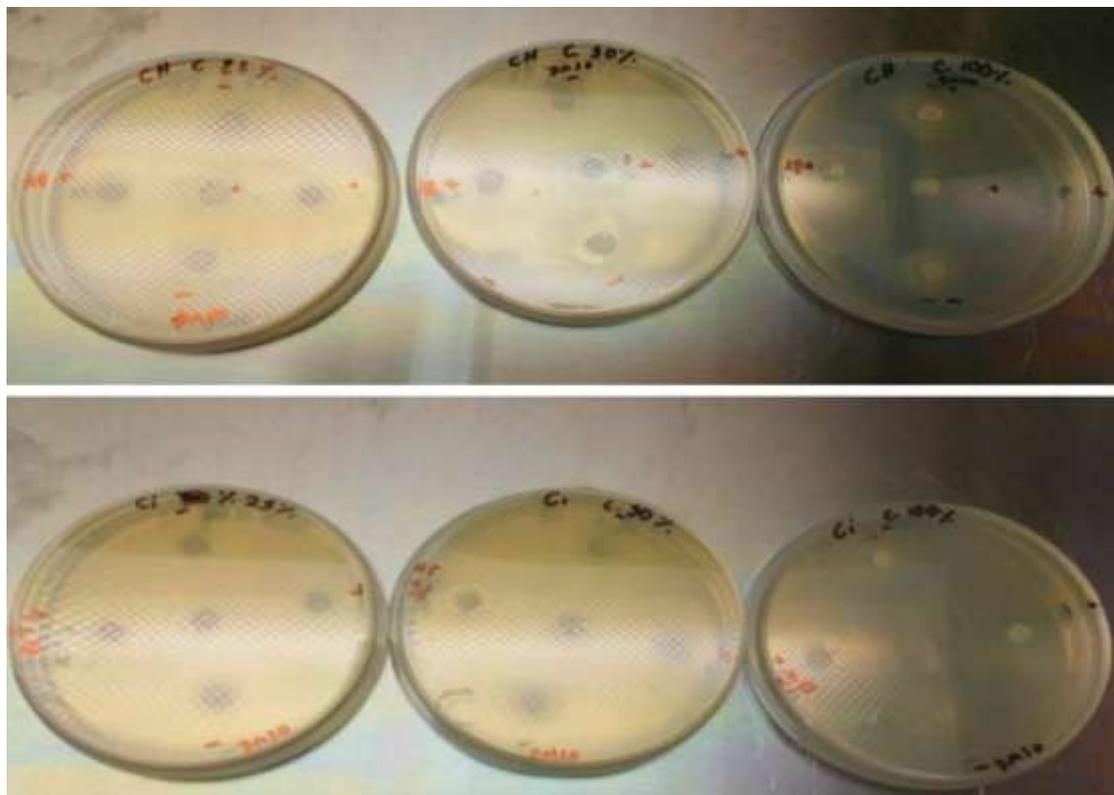


Figura 13 “Caja Petri Invertida”. CH: Chilca en diferentes concentraciones de aceite esencial (25%, 50%, 100%), y CI: Cilantro en diferentes concentraciones de aceite esencial (25%, 50%; 100%).

Fuente: Autor

3.6.4 PRUEBA DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es una técnica que define la mínima concentración de antimicrobiano ($\mu\text{g}/\text{mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 18 a 24 horas (Horna Quintana *et al.*, 2005).

EQUIPOS

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar

- Estufa marca Memmert
- Balanza analítica
- Cocina eléctrica

MATERIALES

- Microplacas
- Antibiótico (Agrimycin 85 WP)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Mecheros
- Aceite esencial
- Resazurina

PROCEDIMIENTO

Se estandarizó el inóculo bacteriano a la escala 0.5 de McFarland, en la microplaca de 96 pocillos se colocó desde la primera columna a la sexta el inóculo con el aceite esencial por triplicado, en la séptima y octava por duplicado la solución más la combinación de los aceites esenciales, en la novena y décima se añadió el inóculo con el antibiótico, en la décima primera se colocó el inóculo, en la última columna el inóculo con dimetil sulfóxido (DMSO), este procedimiento modificado a lo establecido por Perman et al., (2010) en el trabajo “Identificación y diagnóstico en micología clínica guía práctica”. Se trabajó en cada columna con el método de doble dilución, iniciando con una concentración de aceite esencial de 70% v/v y terminando con una concentración del 0.546% v/v.

Por último, se selló con papel film transparente, con finalidad de evitar evaporación durante la incubación.

Transcurridas las 24 horas, se colocó una solución de resazurina en los 96 pocillos de la microplaca de ensayo, se incubó durante dos a tres horas a temperatura ambiente y se observó el cambio de color.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA

Xanthomona sp

Tabla 2 Resultados de la morfología y pruebas bioquímicas de la bacteria
Xanthomona sp.

Prueba	Resultados
Tinción de Gram	-
Ureasa	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
Nitrato	-
Gelatina	+
Klinger	Alc/Alc
Indol	-
Almidón	+
OF glucosa	-
OF lactosa	-
MacConkey	Lac ⁻
Movilidad	+
Simmons	+

(+): Positivo; (-): Negativo; (Alc): Alcalino; (B Gram -): Bacteria Gram Negativo; (Lac⁻): Lactosa Negativa.

Fuente: Autor

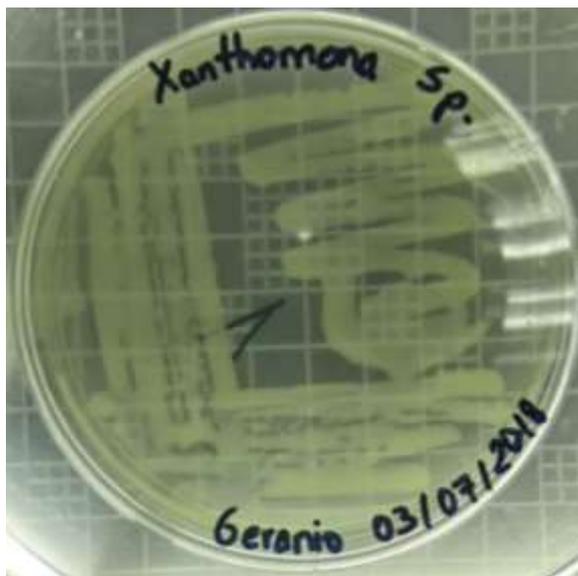


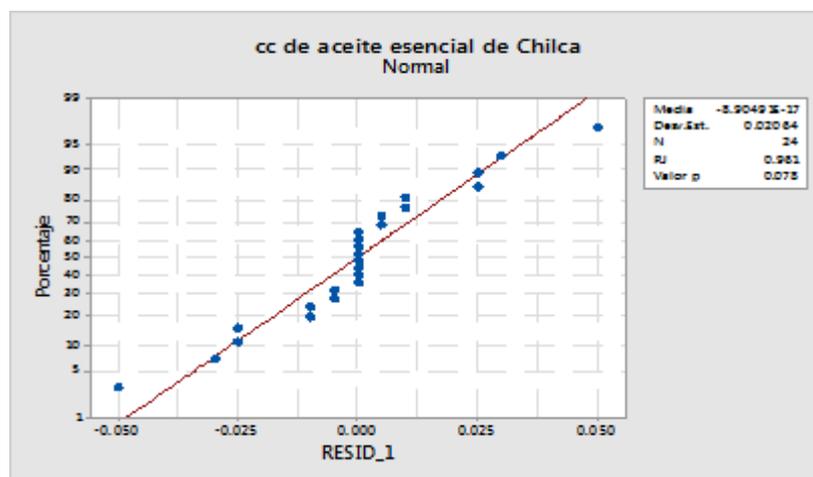
Figura 14 Cepa bacteriana *Xanthomonas sp.*, en agar selectivo LB.
Fuente: Autor

En concordancia con Junco Solórzano (2015), en un estudio en el cual realizaron la caracterización bioquímica y morfológica de seis aislados de *Xanthomonas sp.*, identificaron un tipo de *Xanthomonas* a partir de la planta de geranio, para lo cual se emplearon todas las pruebas mencionadas en la Tabla 2 siendo los resultados obtenidos similares para la identificación de la bacteria *Xanthomonas sp.*, de acuerdo a esto podemos concluir que la bacteria de interés fue aislada correctamente para el desarrollo del presente estudio [Anexo 1].

4.2 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

4.2.1 RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CHILCA

Para la determinación del rendimiento de los aceites esenciales extraídos se llevó a cabo la prueba de normalidad de Ryan-Joiner, en la Gráfica 1 se observa que el valor obtenido de p es > 0.078 es mayor al nivel de significancia que es 0.01; por ello, se detectan desviaciones severas de este supuesto. Con un nivel de confianza de 0.99 se puede decir que el supuesto de normalidad se cumple, se observa una distribución normal en los datos del aceite esencial de chilca. Se procede a realizar un análisis de varianza ANOVA del diseño completamente al azar (DCA) en Minitab 17.



Gráfica 1 Prueba de supuesto de Normalidad de Ryan-Joiner para aceite esencial de chilca.

Fuente: Autor.

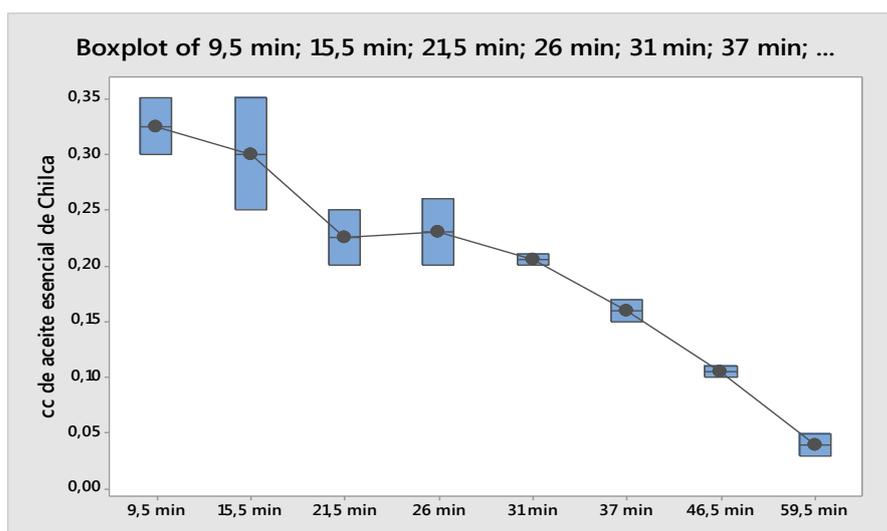
Al llevar a cabo el DCA en el programa Minitab 17 –Tabla 3- , el valor de p es 0.000 siendo menor al valor de la significancia 0.05; por lo cual se rechaza la hipótesis nula, que no existe significancia en el volumen de extracción del aceite esencial de chilca. No se rechaza la hipótesis alternativa, existe un efecto significativo de los tratamientos, es decir existe diferencia en el volumen de extracción en relación al tiempo que transcurre en el proceso de destilación.

Tabla 3 DCA aceite esencial de chilca.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajuste	MC Ajuste	Valor F	Valor p
Factores	7	0.190162	0.027166	44.35	0.000
Error	16	0.009800	0.000613		
Total	23	0.199962			

Fuente: Autor

Seguidamente en la Gráfica 2, se aprecia que a los 9.5 y 15.5 min se obtiene el mayor volumen de aceite esencial, y en los 59.5 min se obtiene menor volumen de extracción. Los datos del volumen de aceite esencial de chilca presentan una distribución simétrica en todos los tiempos considerados. Se confirma que existen diferencias significativas entre el volumen de aceite esencial de chilca obtenido y el tiempo transcurrido durante la extracción. Por lo cual se realiza la prueba de Tukey para conocer en que minuto se genera mayor cantidad de aceite esencial.



Gráfica 2 Volumen de aceite de chilca vs tiempo de extracción.

Fuente: Autor

En la Tabla 4 del método de Tukey se observa que existe significancia en los diferentes tiempos de extracción; en 9.5 min se obtiene un promedio de 0.3250 cm^3 de aceite esencial; entre 26 y 31 min se obtiene de 0.2300 a 0.2050 cm^3 de aceite esencial; y en 46.5 y 59.5 min se obtiene 0.105 y 0.040 cm^3 de aceite esencial respectivamente. Se puede decir que existen tres etapas de importancia durante la extracción del aceite esencial de chilca, siendo la primera etapa la de mayor importancia.

Tabla 4 Método de Tukey aceite esencial de chilca.

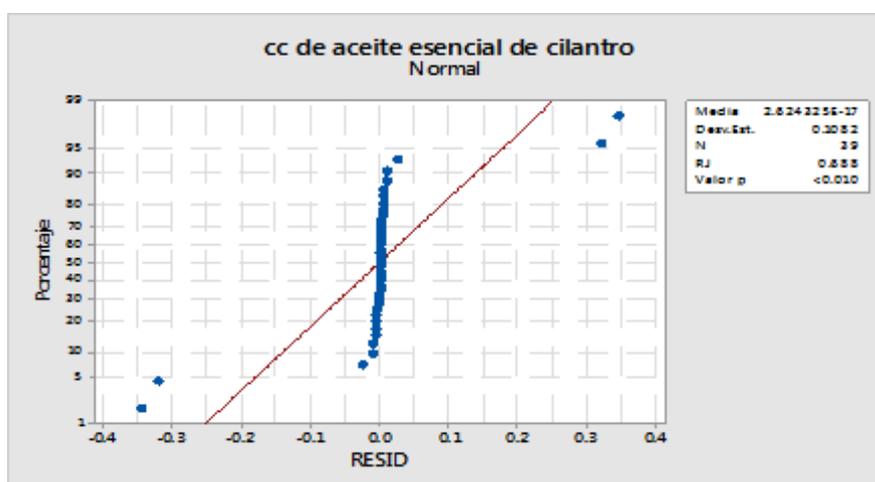
Factor (min)	N	Media	Grupos				
9.5	3	0.3250	A				
15.5	3	0.3000	A	B			
26	3	0.2300		B	C		
21.5	3	0.2250			C		
31	3	0.2050			C		
37	3	0.1600			C	D	
46.5	3	0.1050				D	E
59.5	3	0.0400					E

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes.

Fuente: Autor

4.2.2 RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE CILANTRO

Para la determinación del rendimiento de los aceites esenciales extraídos se llevó a cabo la prueba de normalidad de Ryan-Joiner, en la –Gráfica 3- se observa que el valor obtenido de p es < 0.100 es menor a la significancia de 0.01; por ende, se detectan desviaciones severas de este supuesto. Con un nivel de confianza de 0.99 se puede decir que no existe normalidad en los datos del volumen de aceite esencial de cilantro.



Gráfica 3 Prueba de supuesto de Normalidad de Ryan-Joiner para aceite esencial de cilantro.

Fuente: Autor

Para el cumplimiento del supuesto de normalidad se realiza la transformación de raíz cuadrada, no se obtiene resultados satisfactorios, por lo cual se debe realizar un análisis de varianza no paramétrica Tabla 5, la prueba de Kruskal – Wallis (Minitab 17) que permite la comparación de dos o más grupos.

Tabla 5 Prueba de Kruskal–Wallis aceite esencial de cilantro.

Variable	Factores	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
cc de EA	20.5	3	0.21	0.01	0.21	29.24	0.0035
cc de EA	30.5	3	0.18	0.03	0.18		
cc de EA	36.5	3	0.16	0.01	0.16		
cc de EA	42.5	3	0.15	1.OE-03	0.15		
cc de EA	49.5	3	0.15	5.OE-04	0.15		
cc de EA	56.0	3	0.15	5.OE-03	0.15		
cc de EA	62.5	3	0.10	0.01	0.10		
cc de EA	71.5	3	0.11	0.01	0.1		
cc de EA	80.0	3	0.42	0.32	0.42		
cc de EA	85.5	3	0.74	0.010	0.74		
cc de EA	94.0	3	0.41	0.35	0.41		
cc de EA	102.5	3	0.05	0.01	0.05		
cc de EA	119.5	3	0.02	5.OE-04	0.02		

Fuente: Autor

En la Tabla 6, se presenta los resultados del análisis de varianza no paramétrica, prueba de Kruskal – Wallis, en el cual el valor p es 0.0040 es menor a la significancia 0.05; indicando que con un nivel de confianza de 0.95 se rechaza la hipótesis nula de que el volumen de extracción del aceite esencial de cilantro es igual en cualquier tiempo, no se rechaza la hipótesis alternativa que indica que el volumen de extracción del aceite esencial de cilantro es diferente en un determinado tiempo de la destilación.

Tabla 6 Prueba de Kruskal-Wallis Test: aceite esencial vs factores

Factores	N	Medias	Ave Rank	Z
20.5	3	0.21000	30.8	1.71
30.5	3	0.17500	25.5	0.87
36.5	3	0.15500	24.0	0.63
42.5	3	0.15100	22.5	0.40
49.5	3	0.15050	21.5	0.24
56.0	3	0.14500	16.7	-0.53
62.5	3	0.09500	9.3	-1.69
71.5	3	0.10500	12.7	-1.16
80.0	3	0.42000	27.2	1.13
85.5	3	0.74000	36.7	2.64
94.0	3	0.04500	26.2	0.98
102.5	3	0.04500	5.0	-2.37
119.5	3	0.01950	2.0	-2.85
Overall	39		20.0	

H = 29.34

DF = 12

P = 0.004

H = 29.32

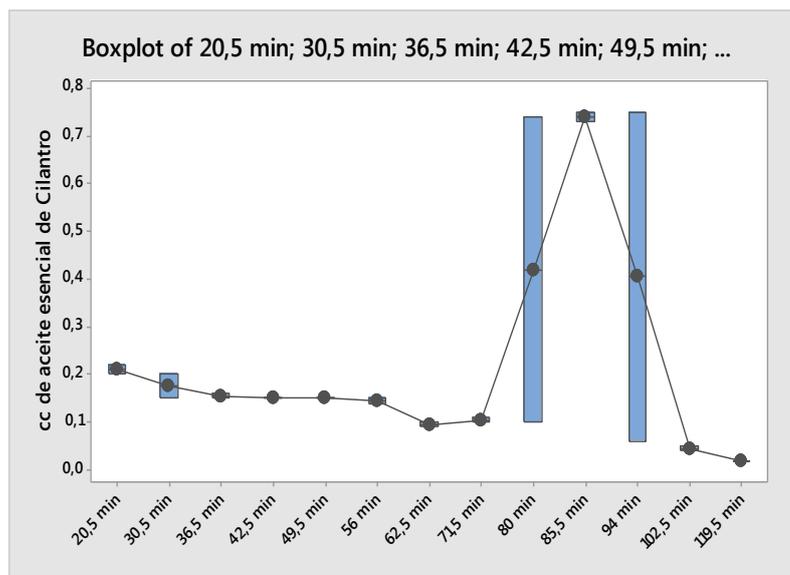
DF = 12

P = 0.004 (Ajustado para pruebas)

*Nota: una o más pequeñas muestras.

Fuente: Autor

En la Tabla 6 se observa que en los tiempos 80.0, 85.5 y 94 minutos se obtiene el mayor volumen de aceite esencial de cilantro, mientras que en los tiempos 102.5 y 119.5 minutos se obtiene el menor volumen de aceite esencial. Además, en los tiempos donde el volumen de aceite esencial es mayor, las cajas se traslapan y presentan una distribución simétrica de sus datos. Al confirmarse que existen diferencias significativas en el volumen de extracción, se realiza una prueba de comparación y contrastes, para determinar en qué tiempo se obtiene un mayor volumen de aceite esencial de cilantro.



Gráfica 4 Volumen de aceite esencial de cilantro vs tiempo.

Fuente: Autor.

En la Tabla 7 se puede observar que en los tiempos 119.5 y 102.5 minutos el volumen promedio de extracción es bajo, en los tiempos 80 y 94 min el volumen promedio de extracción es medio y en el tiempo 85.5 minutos el volumen promedio de extracción es alto, entonces se puede considerar que en este tiempo se obtiene mayor rendimiento de aceite esencial de cilantro.

Tabla 7 Método de Tukey rendimiento aceite esencial de Cilantro.

Trat.	Medias	Grupos				
119.50	0.02	A				
102.50	0.05	A	B			
62.50	0.10	A	B	C		
71.50	0.11	A	B	C	D	
56.00	0.15	A	B	C	D	
49.50	0.15		B	C	D	E
42.50	0.15		B	C	D	E
36.50	0.16			C	D	E
30.50	0.18			C	D	E
94.00	0.41			C	D	E
80.00	0.42			C	D	E
20.50	0.21				D	E
85.50	0.74					E

*Medias con letras iguales no son significativamente diferentes.

Fuente: Autor.

4.2.3 CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA Y CILANTRO

Tabla 8 Cálculo del rendimiento de los aceites esenciales obtenidos.

Rendimiento	Especies
0.19 % (p/p)	Chilca (<i>Baccharis latifolia</i>)
0.10 % (p/p)	Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)

Fuente: Autor

4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

Tabla 9 Resultados de pruebas físico-químicas de los aceites esenciales.

	Análisis	Resultados	
		CHILCA	CILANTRO
FÍSICOS	Densidad relativa	0.938 g/mL	0.865 g/mL
	Índice de refracción	1.499	1.465
QUÍMICOS	Índice de acidez	1.672 mg KOH/g	0.837 mg KOH/g

Fuente: Autor.

En la tabla 9 se puede observar que los valores de densidad relativa, índice de refracción e índice de acidez se encuentran dentro de los rangos normales para la determinación de la calidad y pureza de los aceites esenciales.

En concordancia con Cajas (2016), el aceite esencial de chilca posee valores físico-químicos que demuestran la calidad y pureza del mismo para su posterior uso como controlador biológico. Pino (2012) obtuvo valores similares en un estudio realizado para la caracterización de diferentes plantas andinas, lo cual concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio, permitiéndonos demostrar la calidad de los aceites esenciales obtenidos.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

4.4.1 COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS ACEITES ESENCIALES ANALIZADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES EXPRESADOS COMO PORCENTAJES (%GC)

- ACEITE ESENCIAL DE CHILCA

En el análisis cromatográfico de aceites esencial de chilca se obtuvieron 55 compuestos en total [Anexo 2], de los cuales los compuestos mayoritarios fueron los que se citan a continuación Tabla 10.

Tabla 10 Principales componentes del aceite esencial de chilca.

Principales componentes %GC	
α -felandreno	18.12%
Limoneno	17.15%
Norhalkendin	10.00%
Andro enecalinol	6.00%

Fuente: Autor

En la Tabla 10 se puede observar que los componentes con mayor porcentaje, obtenidos por cromatografía de gases para chilca son: α -felandreno, Limoneno, Norhalkendin y Andro enecalinol.

Guerra (2016), en un estudio de la capacidad antioxidante de dos variedades de aceites andinos, en el cual incluía la chilca, determinó concentraciones muy altas de Silvestreno, Limoneno, Norhalkendin y Andro enecalinol. Siendo estas muy similares a las obtenidas en el presente estudio, contribuyendo significativamente a la investigación.

- ACEITE ESENCIAL DE CILANTRO

En el análisis cromatográfico del aceite esencial de cilantro se obtuvieron 17 compuestos en total [Anexo 3], de los cuales, los compuestos mayoritarios fueron los que se citan a continuación Tabla 11.

Tabla 11 Principales componentes del aceite esencial de cilantro.

Principales componentes %GC	
Benzaldehído	40.25%
Alcanfor	19.00%
Geraniol	26.00%
Decanol	10.00%

Fuente: Autor

Al observar la Tabla 11 podemos determinar que los principios activos o componentes con mayor porcentaje obtenidos mediante la cromatografía de gases son: Benzaldehído, Alcanfor, Geraniol y Decanol.

En concordancia con Leal *et al.* (2013) la concentración de Benzaldehído, Geraniol y Decanol son las más altas, por lo cual se puede asociar estos principios activos a la actividad antimicrobiana de este aceite esencial, sin embargo, es necesario realizar diferentes estudios para determinar cuál de todos los compuestos analizados se encuentran relacionados directamente.

4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*)

4.5.1 PRUEBA DE CAJA PETRI INVERTIDA

Tabla 12 Medidas de halos de inhibición de aceite de cilantro.

Caja Petri invertida			
Cilantro	Medida 1	Medida 2	Medida 3
100%	20 mm	18 mm	18 mm
50%	16 mm	15 mm	17 mm
25%	10 mm	9 mm	12 mm

Fuente: Autor

En la Tabla 12 se puede observar que los mayores diámetros de inhibición frente a *Xanthomona sp.*, se obtienen al emplear altas concentraciones del aceite esencial de cilantro, siendo los más representativos los datos obtenidos al emplear aceite esencial al 100%.

Tabla 13 Medidas de halos de inhibición de aceite de chilca.

Caja Petri invertida			
Chilca	Medida 1	Medida 2	Medida 3
100%	13 mm	11 mm	11 mm
50%	10 mm	9 mm	9 mm
25%	7 mm	7 mm	8 mm

Fuente: Autor

En la Tabla 13 se puede observar que, al igual que en el caso anterior, los diámetros de inhibición más grandes frente a *Xanthomona sp.*, son obtenidos al

emplear concentraciones de aceite esencial de chilca al 100% y 50% respectivamente, mientras que los diámetros de inhibición más pequeños se obtienen al utilizar aceite esencial al 25%.



Figura 15 Caja Petri Invertida. Aceite esencial cilantro y chilca al 100%.
Fuente: Autor

Para determinar con mayor precisión la efectividad de los aceites esenciales evaluados sobre la bacteria *Xanthomona sp.*, se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de ellos mediante la siguiente fórmula:

Ecuación 3 Determinación del porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{diámetro del halo de inhibición}}{\text{diámetro del halo de control}} * 100$$

Los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición se detallan en la Tabla 14.

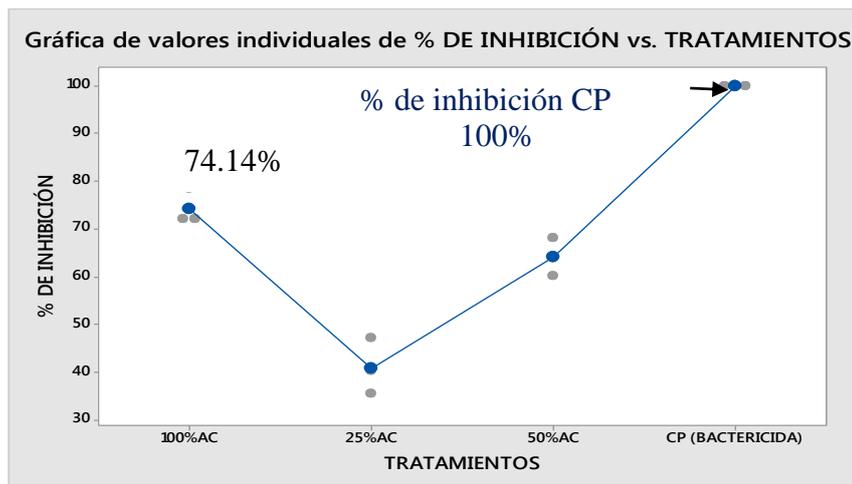
Tabla 14 Porcentaje de inhibición los aceites esenciales frente a la bacteria *Xanthomona sp.*

TRATAMIENTO	P. HALO DE INHIBICIÓN (mm)	DIÁMETRO DE CONTROL (mm)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Cilantro 100%	18.66	25.5	73.17%
Cilantro 50%	16	25.5	62.74%
Cilantro 25%	10.33	25.5	40.50%
Chilca 100%	11.66	25.5	45.72%
Chilca 50%	9.33	25.5	36.58%
Chilca 25 %	7.33	25.5	28.74%

Fuente: Autor

Al observar la Tabla 14 podemos determinar que los mayores porcentajes de inhibición son: 73.17% y 62.74% (aceite esencial de Cilantro) en concentraciones de 100% y 50%, los porcentajes de inhibición obtenidos en este caso con muy altos y concuerdan con diferentes autores.

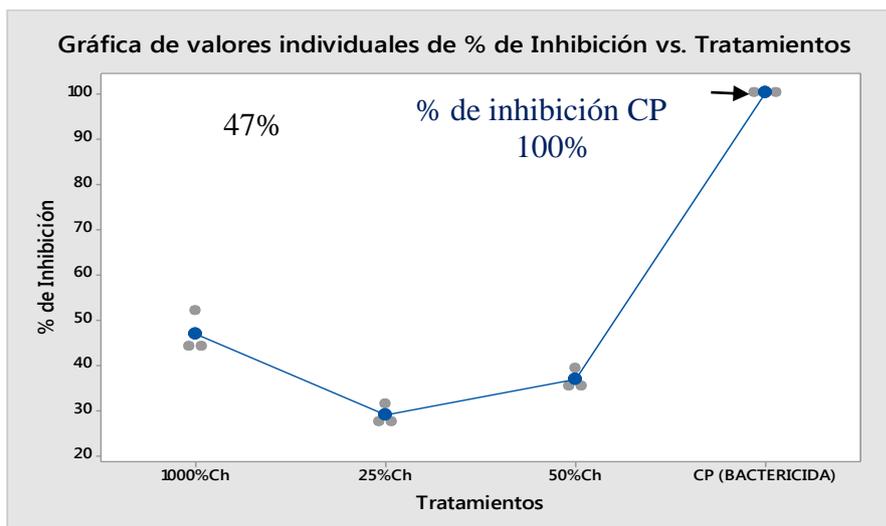
Para una mejor tabulación de la información obtenida en la presente investigación, se realizó una gráfica comparativa de los porcentajes de inhibición alcanzados por los tratamientos empleados en los dos tipos de aceite contra la bacteria *Xanthomona sp.*, VS el control positivo (Bactericida).



Gráfica 5 Porcentaje de inhibición alcanzado por los tratamientos de aceite esencial de cilantro vs control positivo (CP).

Fuente: Autor

El control positivo (CP) empleado demostró un porcentaje de inhibición de 100% frente a la bacteria de estudio, lo cual se puede observar en la Gráfica 5, al comparar los porcentajes de inhibición alcanzados por el aceite de cilantro frente al CP, el porcentaje de inhibición más alto se obtuvo con 74.14% correspondiente al tratamiento de 100% de aceite esencial de cilantro.

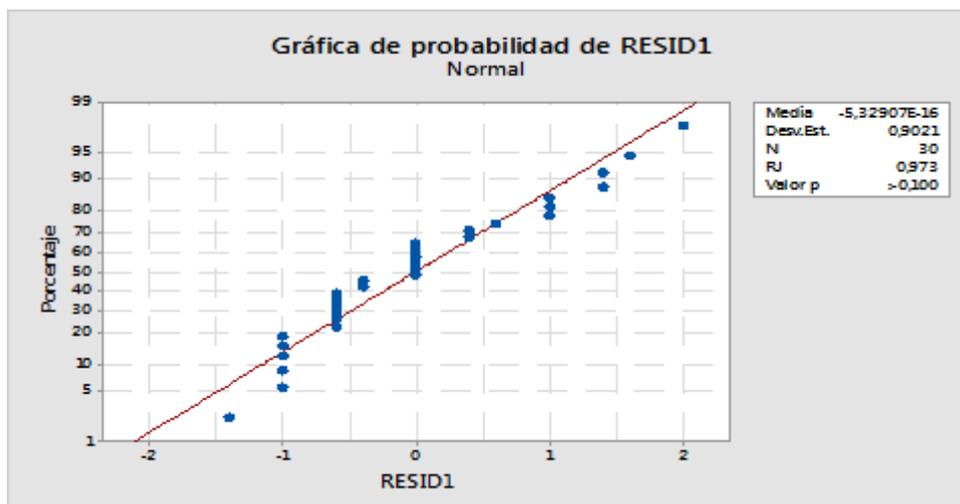


Gráfica 6 Porcentaje de inhibición alcanzado por los tratamientos de aceite esencial de chilca vs control positivo (CP).

Fuente: Autor

El CP empleado demostró un porcentaje de inhibición de 100% frente a la bacteria de estudio, lo cual se puede observar en la Gráfica 6, al comparar los porcentajes de inhibición alcanzados por el aceite de cilantro frente al control positivo, el porcentaje de inhibición más alto se obtuvo con 47% correspondiente al tratamiento de 100% de aceite esencial de chilca. A diferencia de la gráfica anterior, en este caso el porcentaje de inhibición de chilca es mucho más bajo, sin llegar siquiera al 50%.

Posteriormente para la comparación de la Capacidad Mínima Inhibitoria entre los diferentes tratamientos y su efectividad, se realizó una prueba de normalidad en el programa Minitab 17, para proceder a realizar el análisis ANOVA.



Gráfica 7 Prueba de normalidad para halos de inhibición en (mm).
Fuente: Autor.

Al observar la Gráfica 7, se puede determinar que el valor de p 0.100 es mayor que el valor de significancia $\alpha = 0.05$, según la prueba de normalidad de Ryan-Joiner empleada, si el coeficiente de correlación se aproxima a 1 es probable que la población sea normal, por ello se concluye que los datos de estudio corresponden a una distribución de población normal y se puede llevar a cabo el análisis de varianza ANOVA.

Para llevar a cabo el análisis de ANOVA se plantearon las siguientes hipótesis, generadas en el programa Minitab 17.

Tabla 15 Planteamiento de las hipótesis para ANOVA.

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alternativa	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha=0.05$

Fuente: Autor.

Los resultados obtenidos para el análisis de varianza ANOVA fueron:

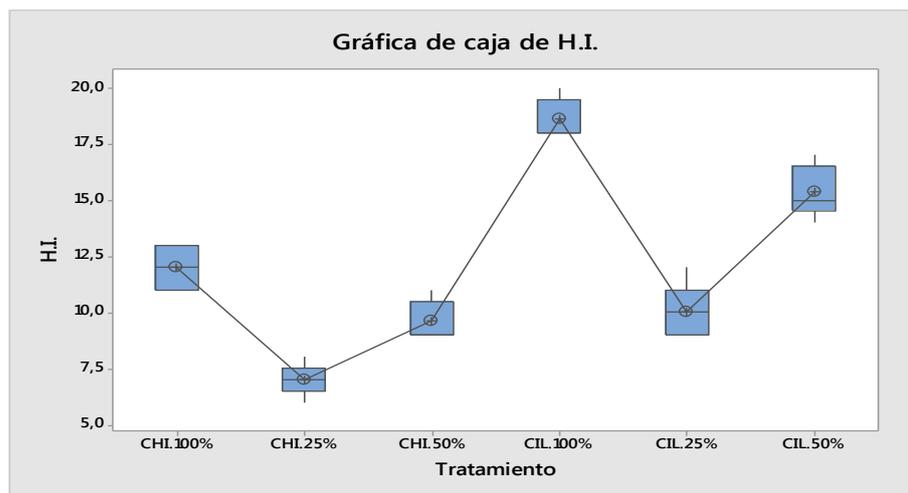
Tabla 16 Prueba de ANOVA

Fuente	GL	SC Ajuste	MC Ajuste	Valor f	Valor p
H.I.	5	449.10	89.8200	91.34	0.000
Error	24	23.60	0.9833		
Total	29	472.70			

*Se propuso igualdad de varianzas para el análisis.

Fuente: Autor

En la Tabla 16, se puede observar que el valor de p 0.000 es menor que el valor de significancia $\alpha = 0.05$, por lo cual, se acepta la hipótesis alternativa que nos indica que no todas las medias son iguales, y se rechaza la hipótesis nula que nos demuestra que existe una significancia entre los tratamientos empleados.



Gráfica 8 Cajas de Halos de inhibición (mm).

Fuente: Autor

En la Gráfica 8, podemos observar que el diámetro de inhibición [mm] más alto se obtiene con una media de 18.16 mm al emplear aceite de cilantro en una concentración de 100%, seguido de 15.40 mm a una concentración de 50% de aceite de cilantro. Es importante mencionar que, al comparar con los tratamientos de aceite esencial de chilca, los diámetros de inhibición obtenidos son muy bajos, siendo el más alto 12 mm a una concentración de 100% de este aceite esencial.

Es importante recalcar que el bajo rendimiento del aceite esencial de chilca a una concentración de 100%, frente al aceite esencial de cilantro que presenta gran efectividad, podría deberse a condiciones externas como temperatura, humedad, método de ejecución del tratamiento, etc. Resultados similares fueron obtenidos por Azuero *et al.* (2018) para cilantro con halos de inhibición con diámetros de entre 10 a 14 mm sobre *Candida albicans*, Conceicao (2011) estudió el efecto antimicrobiano del aceite de cilantro *C. sativum*, demostrando alta capacidad bactericida frente a casi todas las bacterias estudiadas. En cuanto a chilca (*Baccharis latifolia*) existe muy

poca información sobre su potencial antibacteriano, por lo que no es posible comparar con resultados anteriores los obtenidos en esta investigación.

Para todos los tratamientos empleados se evaluó la existencia de diferencias significativas mediante la prueba de Tukey Tabla 18, para de esta manera determinar los tratamientos más eficaces frente a *Xanthomona sp.*

Tabla 17 Prueba de Tukey aplicada a los tratamientos para las medias de los halos de inhibición [mm] obtenidas en cada uno.

TRATAMIENTOS	N	Media (mm)	Agrupación
CIL100%	5	18.60	A
CIL50%	5	15.40	B
CHI100%	5	12	C
CIL25%	5	10	D
CHI 50%	5	9.600	D
CHI 25%	5	7	E

*Las medias que no compartan una letra son significativamente diferentes.

Fuente: Autor

En la Tabla 17, se puede observar con una confianza de 95%, que el tratamiento CIL100% posee una diferencia significativa mayor frente al resto de tratamientos con un halo de inhibición efectivo, de igual manera los tratamientos CIL50%, CHI100% y CHI25% presentan una diferencia significativa entre sí, sin embargo, los tratamientos CIL25% y CHI50% no presentan diferencias significativas en sus medias. Es importante mencionar que en esta prueba no existen criterios de interpretación para los resultados obtenidos con aceites esenciales, ya que cuando se utiliza este método el fin primordial es demostrar que existen zonas de inhibición al emplearse en la presente investigación.

4.5.2 PRUEBA DE DILUCIÓN EN AGAR

4.5.2.1 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD BACTERIOSTÁTICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Como se mencionó anteriormente en el Capítulo 2 este método es muy empleado para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana por dilución, a continuación, se detallarán los resultados obtenidos para cada uno de los aceites esenciales a diferentes concentraciones.

ACEITE ESENCIAL DE CHILCA

Tabla 18 Concentraciones de aceite esencial de Chilca y crecimiento de *Xanthomona sp.*

Chilca	Inoculación 1a	Inoculación 1b	Inoculación 1c	Inoculación 2 ^a	Inoculación 2b
100%	-	-	-	-	-
90%	-	-	-	-	-
80%	-	-	-	-	-
70%	-	-	-	-	-
60%	-	-	-	+	+
50%	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+

Fuente: Autor.

En la Tabla 18, podemos observar claramente que al emplear concentraciones superiores al 60% de aceite esencial de chilca se obtienen control negativo, mientras que al emplear concentraciones menores existía control positivo para la bacteria de

estudio. De acuerdo a los datos obtenidos se puede concluir con certeza que el aceite esencial de chilca a concentraciones mayores al 60% presenta potente capacidad bacteriostática frente a la bacteria *Xanthomona sp.*

ACEITE ESENCIAL DE CILANTRO

Tabla 19 Concentraciones de aceite esencial de cilantro y crecimiento de *Xanthomona sp.*

Cilantro	Inoculación 1a	Inoculación 1b	Inoculación 1c	Inoculación 2a	Inoculación 2b
100%	-	-	-	-	-
50%	-	-	-	-	-
30%	-	-	-	-	-
25%	-	-	-	-	-
20%	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+

Fuente: Autor

En la Tabla 19, se puede observar claramente que al emplear concentraciones de aceite esencial de cilantro superiores a 20%, se obtiene un resultado negativo para la presencia de la bacteria, mientras que al emplear concentraciones inferiores se obtiene crecimiento de la bacteria en estudio. De acuerdo a lo mencionado anteriormente se puede concluir con certeza que el aceite esencial de cilantro a concentraciones superiores al 20% presenta potente actividad bacteriostática frente a la bacteria *Xanthomona sp.*

4.5.3 PRUEBAS CUALITATIVAS ADICIONALES PARA DETERMINACIÓN DE CMI

4.5.3.1 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN POCILLOS

A continuación, se detallará e interpretará cada uno de los resultados obtenidos en los subprocesos llevados a cabo.

4.5.3.2 MÉTODO DE TINCIÓN CON RESAZURINA [REMA]

Para el estudio y obtención de la concentración mínima inhibitoria [CMI] de los aceites esenciales, se colocó en cada uno de los pocillos resazurina previamente diluída, se realizaron placas por duplicado, y lecturas a las cero horas, y posteriormente a las 24 horas, tanto para aceites esenciales de cilantro y chilca; mediante esta prueba se determina la viabilidad de la bacteria fitopatógena *Xanthomona sp.*, Figura 16.

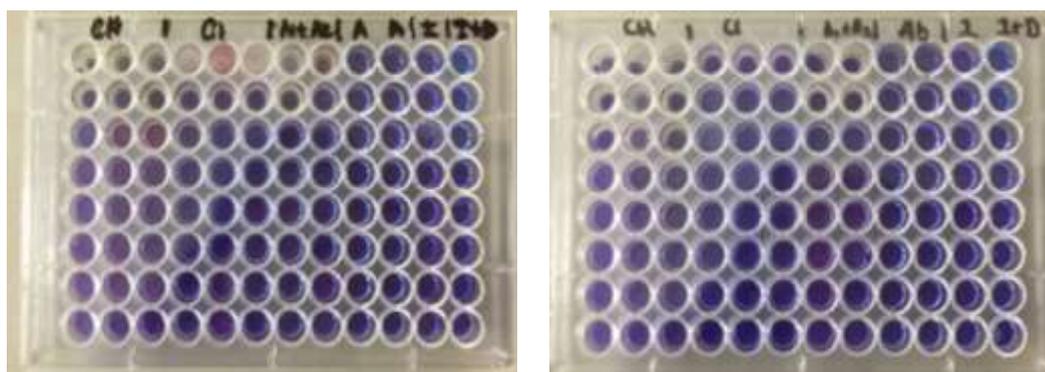
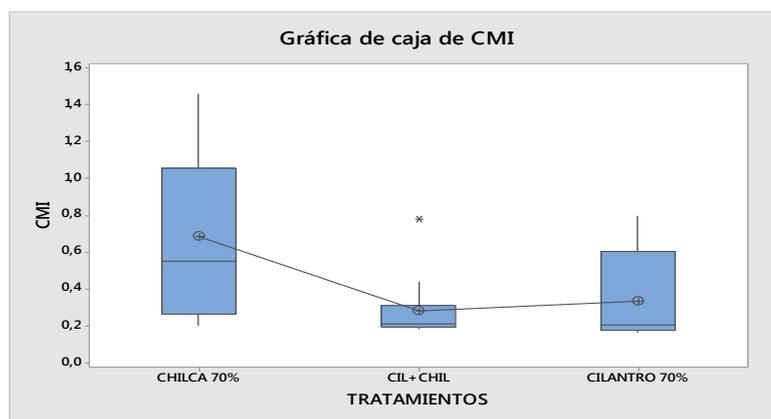


Figura 16 Método REMA con aceite de cilantro y chilca a las cero horas de aplicada la resazurina.

Fuente: Autor

En la Gráfica 9, se puede observar mediante un diagrama de cajas, que al medir la CMI a la hora cero en las dos placas con aceite esencial al 70% y 90% respectivamente, la mayor CMI se obtuvo para chilca, con una media de 0.7, seguida de cilantro con una media de 0.33.



Gráfica 9 CMI placas a la hora cero de aplicación de resazurina.

Fuente: Autor

Las lecturas pudieron ser comprobadas a las 5 horas exactas figura 17, observándose una CMI clara de 75% para aceite esencial de chilca en la placa con A.Es., al 70%; en el caso del aceite esencial de cilantro se obtuvo una CMI de 16%, siendo muy baja a diferencia del porcentaje obtenido en aceite esencial de chilca.

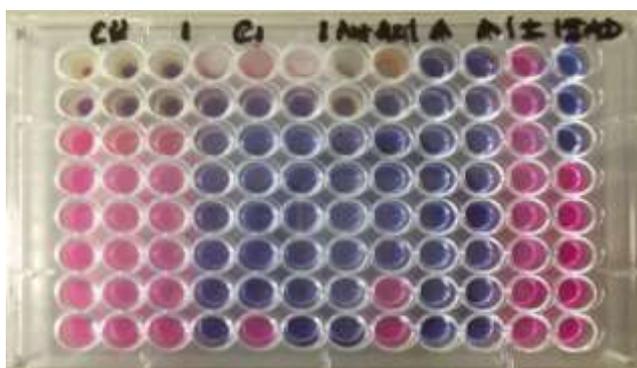
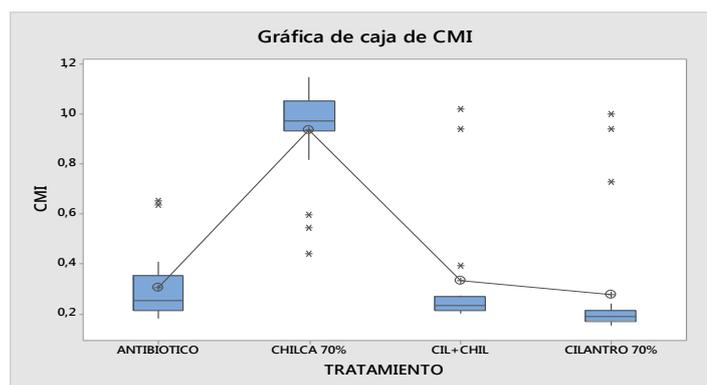


Figura 17 Placa N°1 de método REMA con aceite de cilantro y chilca a las 5 horas de aplicada la resazurina.

Fuente: Autor

En la Gráfica 10, se puede observar la CMI de cada uno de los tratamientos de aceites esenciales frente al antibiótico de control, a las 5 horas de aplicación de resazurina, presentando los mayores valores para la CMI el aceite esencial de chilca 70%, con una media de 0.93.



Gráfica 10 CMI placa de aceites al 70% a las 5 horas de aplicación de resazurina.

Fuente: Autor.

En la segunda placa con aceite esencial al 90%, observada de igual manera a las 5 horas Figura 18, se puede determinar un CMI de 75% para el aceite de chilca, mientras que en el caso del aceite de cilantro se obtuvo un CMI de 0%.

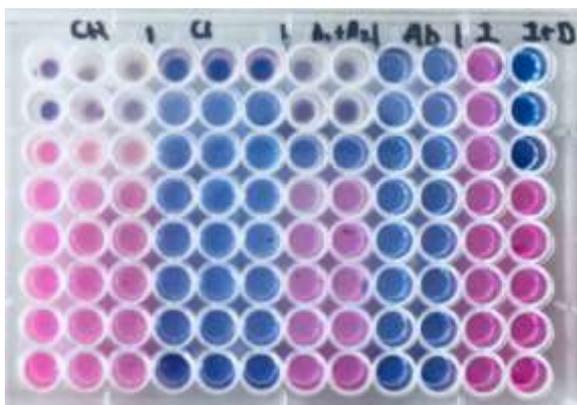
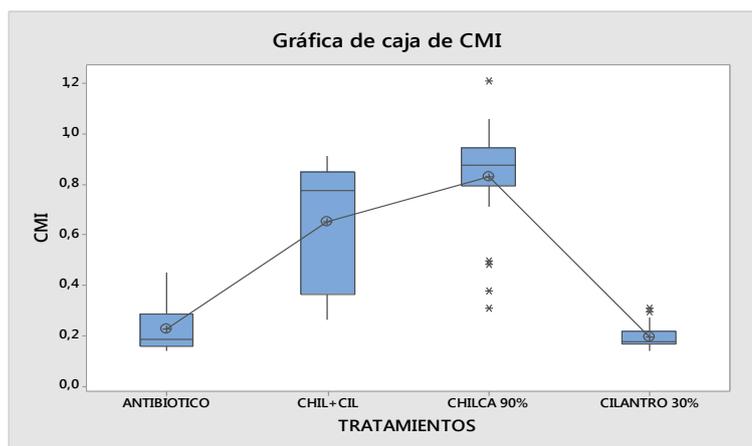


Figura 18 Placa N° 2 método REMA con aceite de cilantro y chilca al 90% a las 5 horas de aplicada la resazurina

Fuente: Autor.

En la Gráfica 11, se puede observar que el tratamiento con mayor CMI fue el de chilca 90% con una media de 0.829, seguido de *CHIL+CIL* con una media de 0.64; es importante mencionar que los valores de CMI [0.22] del control positivo o antibiótico son muy bajos comparados con los tratamientos de aceites esenciales lo cual permite dar a conocer el potencial de inhibición del aceite esencial de chilca en las concentraciones de 70% y 90%.



Gráfica 11 Determinación de la CMI entre tratamientos.

Fuente: Autor.

5 CONCLUSIONES

- Se logró aislar y caracterizar una cepa pura de *Xanthomona sp.*, a partir de muestras con signos de marchitamiento en plantas de Geranio.
- En cuanto al rendimiento de los aceites esenciales, se llevó a cabo análisis estadísticos y pruebas de Tukey, mediante las cuales se pudo determinar en el caso del aceite esencial de chilca los mayores volúmenes se obtuvieron en los primeros 10 min de extracción, con un rendimiento de 0.19 % (p/p). En el caso del cilantro los mayores volúmenes se obtuvieron a partir de los 80 min, con un rendimiento de 010% (p/p). El rendimiento obtenido para los dos aceites esenciales es alto y concuerda con las diferentes literaturas estudiadas en el presente documento.
- Para la determinación de la composición química de los dos aceites esenciales estudiados se llevó a cabo una cromatografía de gases, en la cual se consiguieron los siguientes datos: en el caso de la chilca se obtuvo un total de 55 compuestos, de los cuales, los componentes con mayor porcentaje obtenidos fueron: α -felandreno (18.12%), Limoneno (17.15%), Norhalkendin (10.00%) y Andro enecalinol (6.00%). En cuanto al aceite esencial de cilantro se obtuvo un total de 17 compuestos analizados, de los cuales, los componentes con mayor concentración fueron: son: Benzaldehído (40.25%), Geraniol (19.00%), Alcanfor (26.00%) y Decanol (10.00%).
- Para la determinación de las características físico-químicas se llevó a cabo la determinación de la densidad relativa, índice de acidez e índice de

refracción, obteniéndose valores adecuados en los dos aceites esenciales al comparar con la literatura analizada.

- Se realizaron las pruebas adecuadas para la determinación de la calidad de los aceites esenciales empleados en la presente investigación, se logró demostrar mediante pruebas físico-químicas que los aceites esenciales de cilantro y chilca cumplen con los parámetros de pureza propuestos.
- En la determinación de la capacidad antibacteriana mediante la prueba de dilución en agar, se obtuvieron los siguientes datos: para el aceite esencial de chilca a concentraciones mayores al 60% presenta potente capacidad bactericida frente a la bacteria *Xanthomona sp.*; en el caso del aceite esencial de cilantro a concentraciones superiores al 20% presenta potente actividad bactericida frente a la bacteria *Xanthomona sp.*
- En cuanto a la determinación de la capacidad bactericida mediante la prueba de caja Petri invertida, los mayores porcentajes de inhibición fueron: 73.17% y 62.74% con halos de inhibición de hasta 20 mm, al emplear aceite esencial de cilantro en concentraciones de 100% y 50%, los porcentajes de inhibición obtenidos en este caso son muy altos y concuerdan con diferentes autores.
- En cuanto a la prueba de microdilución en pocillos para determinación de la CMI, se obtuvieron los valores más altos para aceite esencial de cilantro a una concentración de 30% en las dos placas analizadas a las 5 horas de la aplicación del revelador.

5.1 RECOMENDACIONES

- Es de gran importancia continuar estudiando los efectos antibacterianos y los mecanismos de acción que desencadenan los aceites esenciales de chilca y cilantro.
- Se debe llevar a cabo nuevos estudios en campo para potenciar su uso como controlador biológico.
- Es indispensable desarrollar estudios con nuevos microorganismos patógenos para de esta manera poder potenciar el uso de estos aceites esenciales en las diferentes industrias.
- Se debe realizar investigaciones para mejorar el rendimiento y la calidad de los aceites esenciales contribuirían mucho al desarrollo de nuevos bioinsumos seguros para el medio ambiente y el hombre, además de accesibles para los agricultores pequeños y medianos, ya que por lo general este tipo de bioinsumos o aceites esenciales suelen tener costos elevados debido a su bajo rendimiento y procesos de obtención demasiado complejos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M. J., & Bermejo, P. (2006). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 76-96. Recuperado de <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.709>.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol*, 42, 385-414.
- Alteri, M. A., Funes-Monzote, F. R., & Petersen, P. (2012). Agroecologically efficient agricultural systems for smallholder farmers: contributions to food sovereignty. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 1-13. doi:<https://doi.org/10.1007/s13593-011-0065-6>.
- Alvez, B., Alonso, G., & Oropeza, M. (2016). Genotipificación y perfil bioquímico de aislados de xanthomonas albilineans en Venezuela. *Interciencia*, 41(11), 732-739.
- Assih, E. A., Ouattara, A. S., Thierry, S., Cayol, J.-L., Labat, M., & Macarie, H. (2002). *tenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 559-568.
- Assis, S. M., Mariano, R. L., Michereff, S. J., Silva, G., & Maranhao, E. A. (1999). Antagonismo de leveduras a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no filoplano de repolho em condições de campo. *Revista de Microbiologia*, 30(3), 191-195.

- Azuero, A., Jaramillo, C., Sanmartin, D., & DArmas, H. (2018). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador . *Ciencia UNEMI*.
- Becerra, J., Bitiner, M., Hernández, V., Brintrup, C., Becerra, J., & Silva, M. (2010). Actividad de aceites esenciales de canelo, queule, bailahuen y culén frente a hongos fitopatógenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(3), 212-215.
- Bevington, K. B. (1976). Development of union abnormalities in grafts between lemon (*Citrus limon*) and *Poncirus trifoliata*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 27(5), 661-668.
- Brunings, A. M., & Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 4(3), 141-157.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 107-133.
- Camargo B, I., González O, F., Quirós, E., Zachrisson, B., & Von Chong, K. (2009). *Guía técnica Manejo integrado del complejo ácaro (Steneotarsonemus spinki Smiley) – hongo (Sarocladium oryzae Sawada/Gams y Hawks) – bacteria (Burkholderia glumae), en el cultivo del arroz*. Panamá: Departamento de Ediciones y Publicaciones.
- Carvajal Vallejo, C. V., & Quintero Góngora, M. B. "Caracterización fitoquímica, actividad antimicrobiana y antimicótica del aceite de congona (*Peperomia inaequalifolia* Ruiz&Pav.) Piperaceae". *Tesis previa a la obtención del Título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Quito-Ecuador.

- Casado González, M. C., Torrico Cabezas, G., & Medina Anguita, M. (2012).
MEDIOS DE CULTIVO EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.
- Cavalieri, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. L., McCarter, Y. S., Sharp, S. E., . . . Spiegel, C. A. (2005). *Manual de Pruebas de Suceptibilidad Antimicrobiana*. Washington - Estados Unidos: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Chávez Rodríguez, E. EFECTO DE DOS SISTEMAS DE SIEMBRA EN EL RENDIMIENTO DE *Coriandrum sativum* L. "SANTO" EN PICHUNCHUCO, SANTIAGO DE CHUCO - LA LIBERTAD. *Tesis: Para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO*. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo - Peú.
- Chirinos, J., Olivares, B., & Guevara, E. (2013). Efectividad biológica de extractos vegetales en el control in vitro de la bacteria fitopatógena *Xanthomona*. *Multiciencias*, 13(2), 115-121. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/904/90428841002.pdf>.
- Corzo López, M., Rivero González, D., Zamora Gutiérrez, L., Martínez Zubiaur, Y., & Martínez Coca, B. (2015). Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 97-103. Recuperado en 13 de septiembre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000200003&lng=es&tlng=pt.
- Cubero, J., Redondo, C., Sabuquillo, P., Sena Velez, M., Garita Cambroner, J., & Ferragud, E. (2012). *Xanthomonas* un género de bacterias fitopatógenas con una alta especialización. *Microbiología de Plantas*, 38-42.

- De Figueiredo, R. O., Ortiz, M., Marques, M., Nakagawa, J., & Ming, L. C. (2004). Composition of Coriander Essential Oil from Brazil. *Acta Horticulturae*, 629, 135-137.
- De León Juárez, M. L. COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE DOS ESPECIES DE EUCALIPTO (*Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh), APLICANDO EL MÉTODO DE HIDRODESTILACIÓN A NIVEL LABORATORIO. *Tesis: AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala-República de Guatemala.
- de Souza Júnior, I. T., de Oliveira Santos, M., Rotta de Oliveira, A. M., Gravina de Moraes, M., & Duarte, V. (2015). Caracterização de isolados de *Xanthomonas* sp. asociados a sementes de arroz e diferenciação de estirpes de *Xanthomonas oryzae*. *Ciência Rural*, 45(12), 2099-2105.
doi:<https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr201411164>.
- Del Valle Solórzano, H. S., & Zambrano Delgado, J. G. “EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AUTÓCTONAS MENTA (*Mentha Piperita* L.), PALO SANTO (*Bursera Graveolens*), HIERBA LUISA (*Cimbopongón Citratus*) DE LA PROVINCIA DE MANABÍ, CON POTENCIALES DE INDUSTRIALIZACIÓN”. *Trabajo de Titulación: MODALIDAD PROYECTO INVESTIGATIVO*. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo- Ecuador.
- Delince, W., Valdés Carmenate, R., López Morgado, O., Guridi Izquierdo, F., & Balbín Arias, M. I. (2015). Riesgo agroambiental por metales pesados en suelos con Cultivares de *Oryza sativa* L y *Solanum tuberosum* L. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(1), 44-50. Recuperado en 26 de agosto

de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000100006&lng=es&tlng=es.

Díaz Arcos, J. M., & Martínez Chuquillanqui, J. D. "CANTIDAD Y CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES EN HOJAS DE CUATRO ESPECIES DELGÉNERO *Eucalyptus*- EL MANTARO". *Tesis: PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO FORESTAL Y AMBIENTAL*. Universidad Nacional del Centro de Perú, Huancayo - Perú.

Díaz García, C. APLICACIÓN DE ALGAENZIMS Y SU EFECTO EN GERMINACIÓN Y VIGOR DE SEMILLA DE CILANTRO (*Coriandrum sativum* L.). *Tesis Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de: Ingeniero Agrónomo en Producción*. UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO" DIVISION DE AGRONOMIA, Buenavista-México.

Edris, A. E., & Farrag, E. S. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase . *Food/Nahrung* , 117-121.

EPA. (Febrero de 2010). *Biopesticide Demonstration Grant Program*. Obtenido de U.S. Environmental Protection Agency_Office of Pesticide Programs (7511P): <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1006GHZ.PDF?Dockey=P1006GHZ.PDF>

FAO. (2006). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. *ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA*, (pág. 41). Roma.

Fernández Cañar, D. S. ESTUDIO DE LA ACCIÓN HIPOGLUCEMIANTE Y DESINFLAMATORIA DE LA CHILCA (*Baccharis latifolia*) EN LA PROVINCIA DE EL ORO- 2013. *TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA, Machala-Ecuador.

Fernández, R., Miriam, M., Corzo Lopéz, M., Sánchez Pérez, M., Brito, D., Montes de Oca, R., . . . Pinos Pérez, O. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Revista de Protección Vegetal*, 197-203.

Fuentes Cordova, J. E. “COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DEL CULTIVO DE CILANTRO (*Coriandrum sativum* L.), CON DOS DENSIDADES DE SIEMBRA, UTILIZANDO TRES TIPOS DE BIOLES DE RESIDUOS GANADEROS, EN LA ZONA DE BABAHOYO.”. *Tesis TESIS DE GRADO PRESENTADA AL H. CONSEJO DIRECTIVO COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO*. Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo-Ecuador.

Galindo Flores, H. (2008). Resistencia inducida por micorrización en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesitoria*. *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional* . Guasave , Sinaloa , México .

García, A., Laurín, M., Llosa, M. J., González, V., Sanz, M. J., & Porcuna, J. L. (2008). CONTRIBUCIÓN DE LA AGRICULTURA ECOLÓGICA A LA MITIGACIÓN DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN COMPARACIÓN CON LA AGRICULTURA CONVENCIONAL. *Agroecología*, 1, 75-88.
Recuperado de <http://revistas.um.es/agroecologia/article/view/169>.

- Garofalo, C. G. (2013). *Estudio de proteínas efectoras y proteínas regulatorias del sistema de secreción tipo tres del fitopatógeno Xanthomonas axonopodis pv. citri*. Rosario : Universidad Nacional de Rosario .
- Giuliano, D. A. (2001). Clasificación infragenérica de las especies argentinas de Baccharis (Asteraceae, Astereae). *Instituto de Botánica Darwinion*, 39(1-2), 131-154. Recuperdo de <http://www.jstor.org/stable/23223875> .
- González Arias, G. A., López Mesa, M. O., Amat Novo, Z., Estrada Vilardell, G., López Manes, D., Bernal Areces, B., . . . Pupo Zayas, A. D. (2013). Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad*, 10(1), 11-18.
- González Dávalos, E., Villca Jiménez, T., & Loza Almanza, R. (2007). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE OCHO ESPECIES DEL GÉNERO BACCHARIS: B. ARTICULATA, B. DRACUNCULIFOLIA, B. SALICIFOLIA, B. ULCINA, B. LATIFOLIA, B. PENTLANDII, B. OBTUSIFOLIA, B. SUBALATA. *REVISTA BOLIVIANA DE QUÍMICA*, 24(1), 41-44.
- González Villa, A. A. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANOLICOS DE PLANTAS DEL AMAZONAS. *Línea de Profundización: Tecnología en Alimentos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá - Colombia .
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2009). INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIAS FITOPATÓGENAS: CASO DE ESTUDIO RALSTONIA SOLANACEARUM- PLANTAS HOSPEDANTES. *Revista de protección vegetal*, 20(2), 69-80.

- González-Palomares, S., Rivera-Camero, L. H., & Rosales-Reyes, T. (2010). Análisis de compuestos volátiles en cilantro (*Coriandrum sativum* L.). *CIENCIAS BIOLÓGICAS, AGROPECUARIAS Y MEDIO AMBIENTE*, 20(1), 19-24.
- Graham, J. H., & Gottwald, T. R. (1990). Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. *Phytopathology*, 80(2), 190-196.
- Guerra Cajas, P. A. EVALUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA DE DOS VARIEDADES DE ACEITES ANDINOS *Clinopodium nubigenum* (kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. *Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito-Ecuador.
- Hayward, A. C. (1993). *The hosts of Xanthomonas*. London : Department of Microbiology, The University of Queensland .
- Hernández González, M. M., Jiménez Garcés, C., Jiménez Albarrán, F. R., & Arceo Guzmán, M. E. (2007). Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 159-167.
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-85461999000100010&script=sci_arttext&tlng=pt.

Hoyos Vargas, K. M., & Yep Chu, M. Y. Diseño de una formulación de aplicación tópica a base de *Baccharis latifolia* (Chilca), con efecto antiinflamatorio.

Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, Lima - Perú.

Huaman Gomez, H. R. (27 de 01 de 2017). "Influencia de periodos de cobertura con plástico en el enraizamiento y crecimiento de esquejes de geranio

(*Pelargonium* sp) en condiciones de invernadero en la provincia de

Acobamba- Huancavelica". *Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible* .

Acobamba , Huancavelica , Perú .

Janse, J. D. (2005). *Phytobacteriology: principles and practice*. Oxfordshire: CABI.

Jima Solano, L. D. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE

CEFOTAXIMA FRENTE A *Escherichia coli* spp. AISLADA EN

UROCULTIVOS DE PACIENTES QUE ACUDEN A CONSULTA

EXTERNA DEL HOSPITAL MILITAR BRIGADA Nro.7 LOJA.

Tesis: Previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Universidad Nacional de Loja, Loja-Ecuador.

Junco Solórzano, M. C. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA

Y MOLECULAR DE SEIS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas*

sp. *Tesis como requisito para optar por el título de licenciada en Biología.*

Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

Junco Solórzano, M. C. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA

Y MOLECULAR DE SEIS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas*

sp. *Tesis como requisito para optar por el título de licenciada en Biología.*

Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

- Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., KoKoska, L., Valterona, I., & Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in. *Food Research International*, 47(2), 161-165.
- Leal Torres, E., Lopéz Malo, A., Vigil, & Morales Sosa, M. E. (2013). Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*). *Temas Selectos de Ingeniería En Alimentos*, 7(1), 97-103.
- Loja Herrera, B., Alvarado Yarasca, Á., Salazar Granara, A., Ramos Yica, E., & Jurado, B. (2017). Cribado fitoquímico del *Baccharis latifolia* (R&P.) Pers. (chilca). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-7. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100015&lng=es&tlng=es.
- López Reyes, E. *Tesis: Obtener el Título de Ingeniero Agrónoma en Horticultura*. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista - México.
- Mantilla, J. R., & Sanabria, A. (1985). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS PLANTAS SUPERIORES EN COLOMBIA. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 4(2), 25-33.
- Martínez, A. Aceites Esenciales. *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia.
- MIC, t. (2012). MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCIÓN. *Servicio Antimicrobianos*, 32(2), Recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>.

- Miranda Martínez, M. Métodos de análisis de drogas y extractos. *Instituto de Farmacia y Alimentos*. Universidad de la Habana, Ciudad de la Habana-Cuba.
- Momol, T., Ji, P., Pernezny, K., McGovern, R., & Olson, S. (2004). Three soilborne tomato diseases caused by *Ralstonia* and *Fusarium* species and their field diagnostics. *Plant Pathology Department*, 1-5.
- Montoya Cadavid, G. d. (2010). *ACEITES ESENCIALES Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero*. Manizales - Colombia: Primera Edición .
- Morales, J. P. (1995). *CULTIVO DE CILANTRO, CIALNTRO ANCHO Y PERJIL*. Santo Domingo-República Dominicana: Fundación de Desarrollo Agropecuario.
- Nava Pérez, E., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., & Vázquez Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control Biológico de Plagas. *Ra Himhai*, 8(3), 17-19.
- Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. d., Moya Hernández, S. L., & González Ochoa, M. G. (2014). Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 75-88. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200075&lng=es&tlng=es.
- Noriega Rivera, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales . *La granja* , 3-15. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047394002> .

- Ordaz, G., D'Armas, H., Yáñez, D., & Moreno, S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 585-595. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442011000200005&lng=en&tlng=en.
- Ortega Lozano, A. B. "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*Tymus vulgaris*) Y ORÉGANO (*Origanum vulgare*) FRENTE A LA BACTERIA *Staphylococcus aureus* ATCC:12600". *Trabajo de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, Cuenca-Ecuador.
- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (2008). *Coriander*. En: *Chemistry of Spices*. Kerala India: Indian Institute of Spices Research.
- Peralta, E., Murillo, Á., Mazón, N., Rodríguez, D., & Vega, L. (2016). Manual para el reconocimiento y control de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris* L) en Ecuador. *Estación Experimental Santa Catalina*, 84.
- Peredo Luna, H. A., Palou García, E., & López Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Departamento de Ingeniería Química y Alimentos*, 3(1), 24-32.
- Pérez Lainez, M. D. PERFIL FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DEL FRUTO DE TEJOCOTE MEXICANO (*Crataegus* spp.). *Tesis: QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN*

CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRICOLA. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo-México.

- Perman, J., Martin, E., & Rubio, M. (2010). Identificación y diagnóstico en micología clínica guía práctica . *Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología* .
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M. M., Abreu, Y., & Correa, T. M. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Revista de Protección Vegetal*, 27(3), 181-187.
- PLH, E. P. (2014). científic Opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *EFSA Journal*, 12(6), 37.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263-268. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>.
- Reyes Jurado, F., Palou, E., & López Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicas de los aceites esenciales. *emas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78.
- Rodríguez Miranda, O., & Rosas Sotomayor, J. C. (2010). Elección de genotipos de frijol común por su resistencia al tizón bacteriano. *Agronomía mesoamericana*, 21(2), 275-280.
- Ryan, R. P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A. J., & Maxwell Dow, J. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*:

understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 344-355.

Secada Castañeda, L. G., Célis, C., & Luengas Caicedo, P. E. (2015).

PHYTOCHEMICAL AND THERAPEUTIC USE OF BACCHARIS
LATIFOLIA (RUIZ & PAV.) PERS. (ASTERACEAE).

Pharmacologyonline, 2, 14-17.

Sena Veléz, M. (2015). *MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS ETAPAS INICIALES DE INFECCIÓN EN LA CANCROSIS DE LOS CÍTRICOS PROVOCADA POR Xanthomonas citri subsp citri*. Madrid : Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos .

SENA, S. N. (2004). *Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas*. Bogotá-Colombia : Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).

Sicilino, F., Torres, P., Sendín, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., . . .

Marono, M. R. (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in *Citrus limon*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), 0-0. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582006000300005>.

Tol Hernández, V. L. Comparación de la calidad del aceite esencial crudo de citronela (*Cymbopogon winteriana* jowitt) en función de la concentración de geraniol obtenido por medio de extracción por arrastre con vapor y maceración. *Tesis: Al conferírsele el título de Ingeniera Químico*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala-República de Guatemala.

- Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3), 2-6.
- Tortosa Viqueria, M., Francisco Candeira, M., Velasco Pazos, P., & Cartea González, M. E. (2016). Análisis proteómico de la infección de plantas de *Brassica oleracea* por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Actas de Horticultura N° 74*, 231-232.
- Toum Terrones, L. (2015). Mecanismos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*. *Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Buenos Aires, Argentina.
- Trabanino, R., & Macias A, J. (1999). *Escuela Agrícola Panamericana, 2014*. Escuela Agrícola Panamericana, 2014.
- UPM, U. P. (s.f). *Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales*. Madrid-España: Consorcio OpenCourseWare.
- Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M., & Morocho, V. (2012). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 25(3), 233-238. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2013.775679>.
- Velasquez Aliaga, L. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *FRANSERIA ARTEMISIOIDES*, *RUMEX PALUSTRIS*, *BACCHARIS LATIFOLIA*, *CESTRUM PARQUI* Y *PIPER ASPERIFOLIUM* FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *ENTEROCOCCUS FAECALIS*. *Tesina de grado para*

optar al título de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Vera Castro, J. M. "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y CÚRCUMA (*Curcuma longa*) FRENTE A LA BACTERIA *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600". *Tesis: Trabajo de Titulación Previo a la Obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales.* Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca - Ecuador.

Vidaver, A. K., & Lambrecht, P. A. (2004). Bacteria as plant pathogens. *The plant health Instructor*, 1-11. doi:10.1094/PHI-I-2004-0809-01.

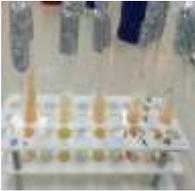
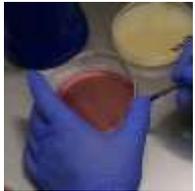
Vidhyasekaran, P. (2002). *Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications.* New York: CRC Press.

Yauri Ordóñez, J. F. "EVALUACIÓN DE TRES VARIEDADES DE CILANTRO (*Coriandrum sativum* L.) CON TRES OPCIONES DE FERTILIZACIÓN". *Tesis: Previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.* Universidad de Guayaquil, Guayaquil - Ecuador.

Zapata, M. (1997). Identificación de razas *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en hojas *Phaseolus vulgaris*. *Agronomía Mesoamericana*, 8(1), 44-52.

ANEXOS

Anexo 1 Pruebas bioquímicas de la Bacteria Xanthomona sp.

<p style="text-align: right;">1</p>  <p>Tinción de Gram</p>	<p style="text-align: right;">2</p>  <p>Ureasa</p>	<p style="text-align: right;">3</p>  <p>Catalasa</p>	<p style="text-align: right;">4</p>  <p>Oxidasa</p>
<p style="text-align: right;">5</p>  <p>Nitrato</p>	<p style="text-align: right;">6</p>  <p>Gelatina</p>	<p style="text-align: right;">7</p>  <p>Klinger</p>	<p style="text-align: right;">8</p>  <p>Indol</p>
<p style="text-align: right;">9</p>  <p>Almidón</p>	<p style="text-align: right;">10</p>  <p>OF glucosa</p>	<p style="text-align: right;">11</p>  <p>OF Lactosa</p>	<p style="text-align: right;">12</p>  <p>MacConkey</p>
<p style="text-align: right;">13</p>  <p>Movilidad</p>	<p style="text-align: right;">14</p>  <p>Simmons</p>	<p style="text-align: right;">15</p>  <p>Agar YDCA</p>	<p style="text-align: right;">16</p>  <p>Agar LB</p>

Fuente: Autor.

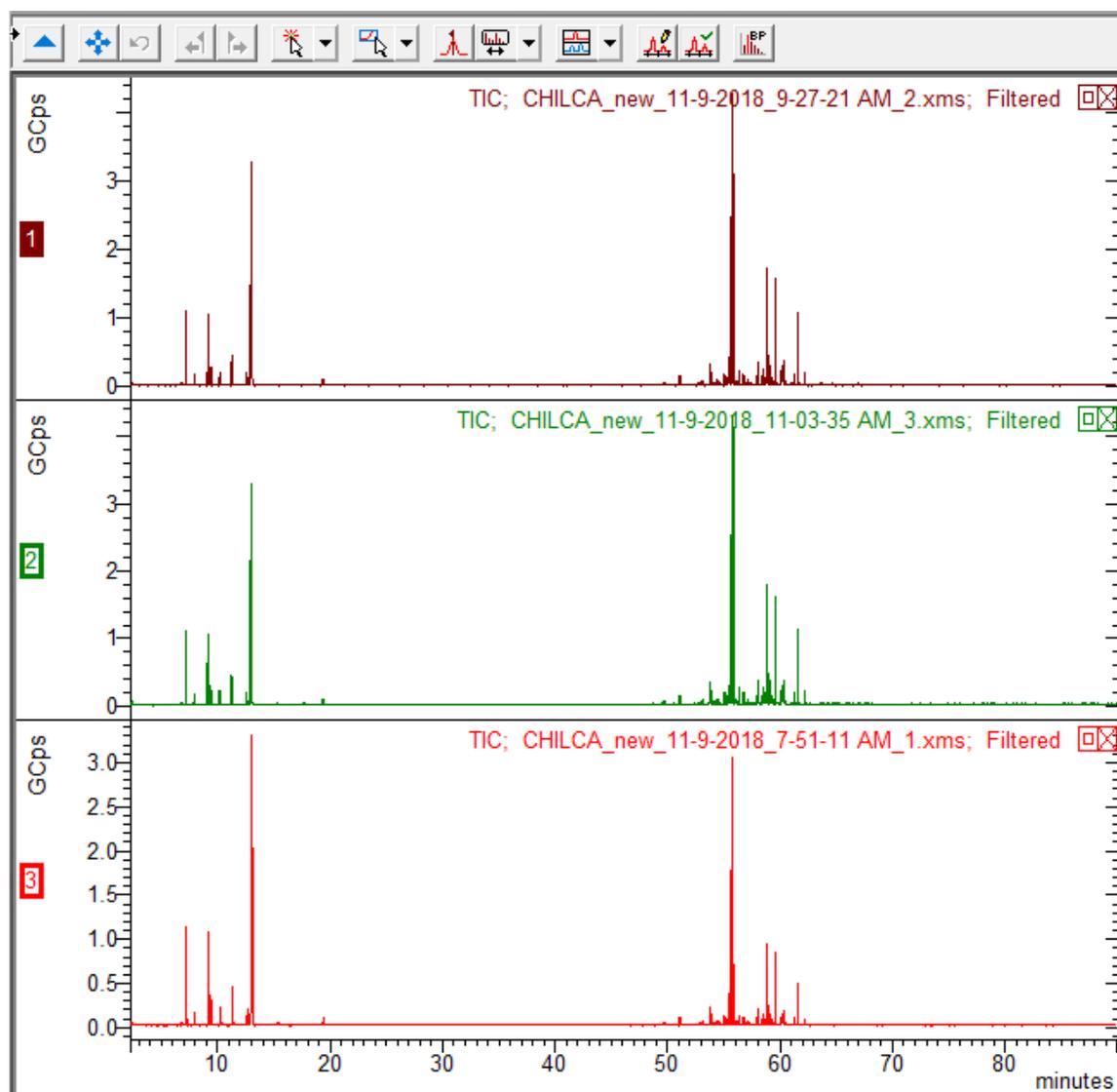
Anexo 2 Porcentajes de los compuestos y cálculo de índice de Kovats en aceite esencial de chilca.

P.	T.R,	Nombre del compuesto	T.%	I.K.
1	7.17	5.85 Pinene<alpha->	2.77%	701
2	7.92	6.26 Camphene	2.26%	710
3	9.14	6.91 Sabinene	3.60%	725
4	9.41	7.04 Pinene<beta->	3.10%	745
5	10.19	7.43 Myrcene	1.24%	789
6	11.26	7.85 Phellandrene<alpha->	1.98%	802
7	12.59	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	1.75%	813
8	12.99	8.73 Sylvestrene	16.56%	821
9	19.36	11.32 Linalool	11.12%	839
10	49.71	24.15 Elemene<beta->	0.34%	845
11	51.08	25.36 Caryophyllene(E-)	0.59%	856
12	53.07	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-	0.46%	870
13	53.77	27.97 Amorpha-4,7(11)-diene	1.02%	889
14	53.85	28.15 Germacrene D	0.63%	892
15	53.91	Cedrene	0.33%	903
16	54.06	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	0.17%	917
17	54.15	30.24 Liguloxide	18.59%	925
18	54.23	28.53 Muurola-4(14),5-diene<trans->	0.22%	938
19	54.40	28.83 Bicyclogermacrene	0.28%	947
20	54.48	Copaene	3.16%	952
21	54.61	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-	0.40%	968
22	55.05	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-	5.68%	973
23	55.19	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)-	0.41%	975
24	55.33	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	0.48%	989
25	55.48	31.58 Longipinanol	4.36%	995
26	55.57	30.02 Kessane	10.04%	1007
27	55.70	Aromadendrene, dehydro-	0.28%	1025
28	55.81	30.24 Liguloxide-Dup1	6.56%	1039

29	56.00	Cadala-1(10),3,8-triene	1.79%	1048
30	56.20	Isolongifolene, 4,5-dehydro-	0.64%	1055
31	56.31	Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl- .alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1- methylethenyl)-, [1R- (1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]-	0.45%	1062
32	56.74	33.20 Atlantol<beta->	1.87%	1078
33	57.11	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7- trimethyl-4-methylene-, [1ar- (1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	0.33%	1085
34	57.99	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7- octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-	0.73%	1102
35	58.06	Cubenol	0.86%	1124
36	58.30	ApexTime = 58.300 min., Signal/Noise = 12, Area = 1,144e+8	2.26%	1138
37	58.44	4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2- methylenebicyclo[4.1.0]heptanes	1.38%	1159
38	58.56	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4- dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, (1S-cis)-	0.76%	1220
39	58.82	34.25 Cadin-4-en-7-ol<cis->	3.02%	1238
40			0.00%	1247
41			0.00%	1258
42	59.32	2-Naphthalenemethanol, decahydro- .alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R- (2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	0.50%	1268
43			0.00%	1310
44	59.58	46.84 Amorpha-4,7(11)-dien-8-one<2-alpha- acetoxy->	3.27%	1328
45	60.10	35.60 Bulnesol	0.45%	1347
46	60.21	36.17 Bisabolol<alpha->	0.80%	1359
47	60.30	31.86 Zierone	2.53%	1420
48	60.43	39.48 Cyclocolorenone<epi->	0.41%	1438
49	61.26	1-Acetyl-4,6,8-trimethylazulene	0.56%	1456
50	61.59	5,6-Azulenedicarboxaldehyde, 1,2,3,3a,8,8a- hexahydro-2,2,8-trimethyl-, (3a.alpha.,8.alpha.,8a.alpha.)-(-)-	3.52%	1518

51	62.21	Azulen-2-ol, 1,4-dimethyl-7-(1-methylethyl)-	0.58%	1534
			106.77%	

Fuente: Autor.

Anexo 3 Cromatograma de las tres corridas de aceite esencial de chilca.

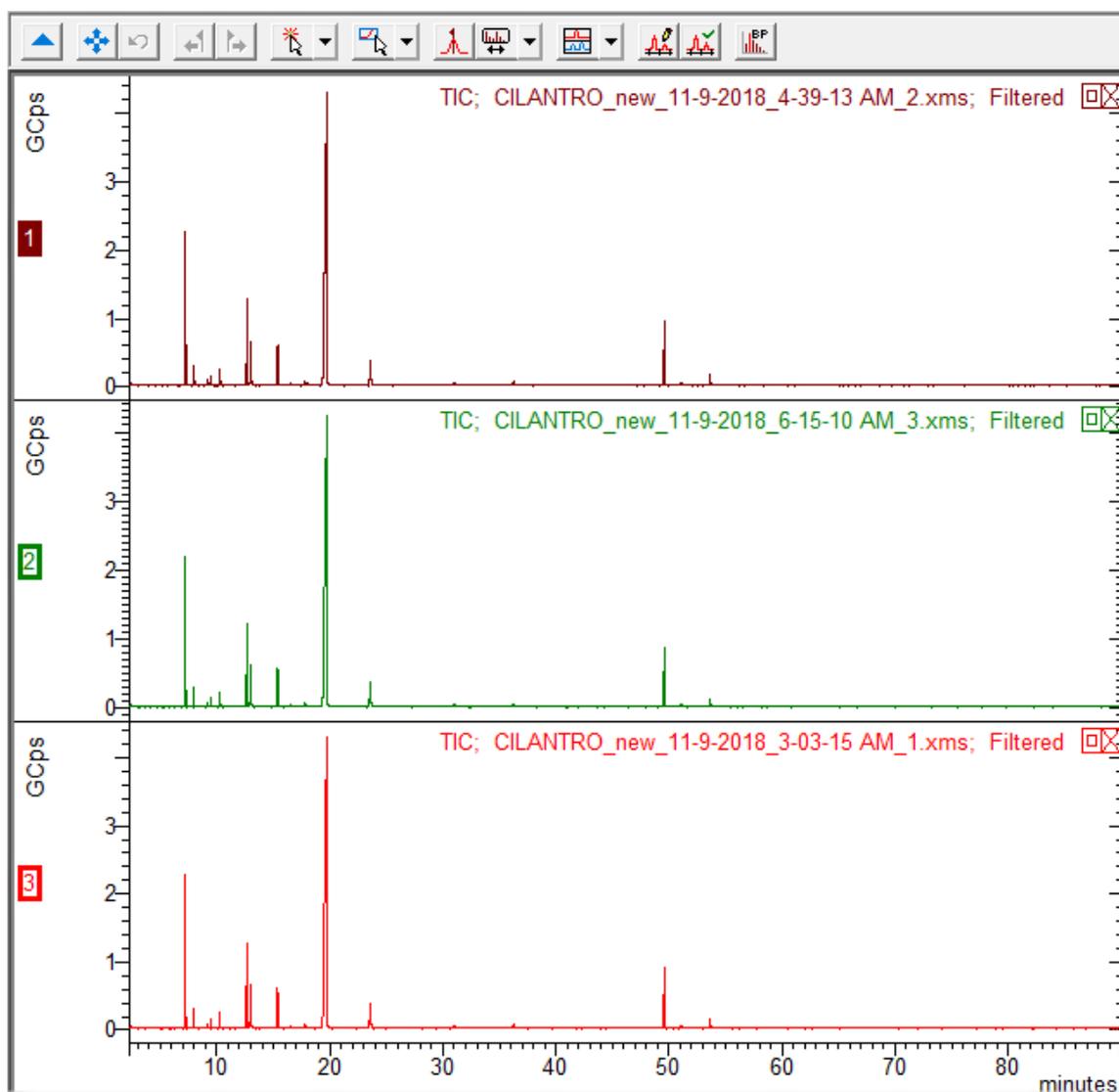
Fuente: Autor

Anexo 4 Porcentajes de los compuestos y cálculo de índice de Kovats en aceite esencial de cilantro

P.	T.R,	Nombre del compuesto	T.%	I.K.
1	2.36	Oxetane, 2-ethyl-3-methyl-	0.054%	820
2	2.44	Furan, tetrahydro-2,5-dimethyl-	0.115%	845
3	7.13	5.85 Pinene<alpha->	8.873%	901
4	7.21	6-Amino-1-[1-(2,5-dimethoxyphenyl)ethylideneamino)-2-oxo-4-(2-chlorophenyl)-1,2-dihydropyridine-3,5-dicarbonitrile	1.872%	910
5	7.97	6.26 Camphene	0.384%	912
6	9.21	6.91 Sabinene	0.899%	930
7	9.47	7.04 Pinene<beta->	7.776%	943
8	10.26	7.43 Myrcene	2.873%	950
9	12.67	8.59 Cymene<ortho->	4.583%	986
10	13.00	8.69 Limonene	7.197%	1001
11	15.38	9.78 Terpinene<gamma->	2.863%	1014
12	17.73	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	34.193%	1020
13	19.66	11.32 Linalool	2.174%	1036
14	23.57	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	16.518%	1048
15	49.57	22.81 Neryl acetate	0.132%	1046
16	51.08	24.95 Caryophyllene<Z->	5.164%	1050
17	53.63	27.33 Dodecenal<2E->	0.328%	1058
			95.998%	

Fuente: Autor

Anexo 5 Cromatograma de las tres corridas de aceite esencial de cilantro.



Fuente: Autor