

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA  
LUIA (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) OBTENIDO  
POR EL MÉTODO DE ARRASTRE CON VAPOR”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO QUÍMICO**

**AUCCAPIÑA RAMOS EDWIN**  
**CHAMPI CLAROS JOHN FÉLIX**  
**LINO BAUTISTA DENNIS ANTONIO**

**Callao, Setiembre, 2017**

**PERÚ**

ING. Angeles Queirolo Coles ERNESTO.

## PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue Expuesto por las Bachilleres **CHAMPI CLAROS JHON FELIX, LINO BAUTISTA DENNIS ANTONIO** y **AUCCAPIÑA RAMOS EDWIN** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

Ing. Dr. ANCIETA DEXTRE CARLOS ALEJANDRO	PRESIDENTE
Ing. Dr. CALDERÓN CRUZ JULIO CÉSAR	SECRETARIO
Lic. Mg. REYNA SEGURA ANA MARÍA	VOCAL
Ing. ÁNGELES QUEIROLO CARLOS ERNESTO	ASESOR

Tal como está asentado en el Libro N° 1 Folio N° 19 y Acta N° 018 de Sustentación por la Modalidad de Tesis con Ciclo de Tesis, de fecha **09 DE SETIEMBRE 2017**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Tesis con Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de Grados y Títulos aprobado por Resolución N° 082-2011-CU de fecha 29 de abril de 2011 y Resolución N° 221-2012-CU de fecha 19 de setiembre de 2012.

## **DEDICATORIA**

A nuestros padres por el apoyo incondicional, gracias a sus consejos y apoyo moral que nos han ayudado a lograr nuestras metas.

A nuestros hermanos, por ser los mejores amigos que nos han acompañado y aconsejado en nuestra etapa universitaria.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por guiarnos y darnos fortaleza en cada momento crucial de nuestras vidas.

A nuestra alma mater la Universidad Nacional del Callao donde nos formarnos como profesionales

A nuestro asesor el Ingeniero Carlos Ángeles Queirolo por su apoyo y asesoría que fue de gran importancia en el desarrollo de la tesis.

Al Biólogo Edgar Zarate S. por su colaboración en la etapa microbiológica de la tesis.

A la Srta. Sandra Altamirano Berrocal por el apoyo y orientación en el laboratorio de microbiología del Centro Experimental Tecnológico de la Universidad Nacional del Callao.

## ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	11
1.1 Identificación del problema	11
1.2 Formulación del problema	12
1.2.1 Problema general	12
1.2.2 Problema específico	12
1.3 Objetivos de la investigación	13
1.3.1 Objetivos General	13
1.3.2 Objetivos específicos	13
1.4 Justificación	13
1.4.1 Teórica	13
1.4.2 Económica	14
1.4.3 Legal	14
1.5 Importancia	14
II MARCO TEÓRICO	16
2.1 Antecedentes del estudio	16
2.2 Marco teórico	21
2.2.1 Hierba luisa	21
2.2.2 Clasificación taxonómica	22

2.2.3	Producción y exportación de la hierba luisa	23
2.2.4	Aceites esenciales	25
2.2.5	Composición química de los aceites esenciales	27
2.3	Aceite esencial de hierba luisa	28
2.3.1	Duración del aceite esencial de hierba luisa	31
2.3.2	Usos del aceite esencial de hierba luisa	31
2.4	Métodos de obtención de aceites esenciales	31
2.5	Actividad antibacteriana	33
2.5.1	Agentes antimicrobianos	33
2.5.2	Agentes antimicrobianos derivados de especias y hierbas	34
2.6	Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana	34
2.7	Bacterias Gram negativas y Gram positivas	37
2.7.1	<i>Escherichia coli</i>	37
2.7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.8	Definición de términos básicos	41
III	VARIABLES E HIPÓTESIS	43
3.1	Variables de la investigación	43
3.1.1	Variables independiente	43
3.1.2	Variable dependiente	43
3.2	Operacionalización de variables	44
3.3	Hipótesis general e hipótesis específicas	46
3.3.1	Hipótesis general	46

3.3.2	Hipótesis específicas	46
IV	METODOLOGÍA	47
4.1	Tipo de investigación	47
4.2	Diseño de la investigación	48
4.3	Población y muestra	49
4.3.1	Población de estudio	49
4.3.2	Muestra	49
4.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	49
4.4.1	Técnicas para recolección de datos	49
4.4.2	Instrumentos de recolección de datos	50
4.4.3	Metodología experimental	53
4.5	Procedimientos de recolección de datos	59
4.5.1	Procedimiento experimental	59
4.6	Procesamiento estadístico y análisis de datos	64
V	RESULTADOS	65
5.1	Obtención del aceite esencial de hierba luisa	65
5.2	Caracterización del aceite esencial obtenido	71
5.3	Actividad antibacteriana de aceite obtenido	75
VI	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
6.1	Contrastación de hipótesis con los resultados	83
6.2	Contrastación de resultados con otros estudios similares	89
VII	CONCLUSIONES	93

VIII	RECOMENDACIONES	95
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXO	105
	Matriz de consistencia	106
	Taxonomía de la hierba luisa	107
	Análisis del aceite de hierba luisa	108
	Composición química de aceite esenciales por cromatografía	109
	Normas técnicas peruanas	112
	Constancia emitida por el Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria	138
	Identificación de la bacteria <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	139
	Identificación de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	140
	Pruebas experimentales en el LOPU- UNAC	141
	Pruebas experimentales en el CET- UNAC	142
	Resultados experimentales	145

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Nº2.1	Taxonomía de la hierba luisa	23
TABLA	Nº2.2	Producción nacional de hierba luisa(toneladas)	23
TABLA	Nº2.3	Exportación de hierba luisa en US\$ (FOB) (2007-2016)	24
TABLA	Nº2.4	Exportación de hierba luisa en peso neto kg (2007 – 2016)	24
TABLA	Nº2.5	Principales países de destino para las exportaciones de hierba luisa en US\$ (FOB)	25
TABLA	Nº2.6	Composición química del aceite esencial de hierba Luisa	30
TABLA	Nº2.7	Clasificación científica del <i>Escherichia coli</i>	37
TABLA	Nº2.8	Clasificación científica del <i>Staphylococcus aureus</i>	40
TABLA	Nº3.1	Operacionalización de variables	45
TABLA	Nº4.1	Factores y niveles	54
TABLA	Nº4.2	Diseño factorial 2 <sup>3</sup> para la obtención por arrastre con vapor del aceite esencial de hierba luisa	54
TABLA	Nº4.3	Velocidad de destilación	55
TABLA	Nº4.4	Diseño experimental para la evaluación de la actividad antibacteriana	58
TABLA	Nº5.1	Condiciones de obtención	65
TABLA	Nº5.2	Variables que influyen en la obtención de aceite esencial de hierba luisa	66
TABLA	Nº5.3	Rendimiento para partículas de tamaño 3 cm y 5 cm	66
TABLA	Nº5.4	Rendimiento para cantidad de materia 1.5 kg y 2 kg	68
TABLA	Nº5.5	Rendimiento para volumen de agua 5 L y 6 L	69

TABLA	N°5.6	Densidad relativa del aceite esencial de hierba luisa.	71
TABLA	N°5.7	Índice de refracción del aceite esencial de hierba luisa	72
TABLA	N°5.8	Índice de yodo del aceite esencial de hierba luisa	72
TABLA	N°5.9	Índice de acidez del aceite esencial de hierba luisa	73
TABLA	N°5.10	Índice de saponificación del aceite esencial de hierba luisa	73
TABLA	N°5.11	Índice de éster del aceite esencial de hierba luisa	73
TABLA	N°5.12	Resultados de los componentes mayoritarios proporcionados por el equipo GC-MS	74
TABLA	N°5.13	Unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de hierba luisa.	76
TABLA	N°5.14	Efecto del aceite esencial de hierba luisa sobre el crecimiento del <i>Escherichia coli</i>	76
TABLA	N°5.15	Unidades formadoras de colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de hierba luisa.	77
TABLA	N°5.16	Efecto del aceite esencial de hierba luisa sobre el crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i>	78
TABLA	N°5.17	Concentración mínima inhibitoria y letalidad del aceite esencial de hierba luisa frente al <i>Escherichia coli</i>	80
TABLA	N°5.18	Concentración mínima inhibitoria y letalidad del aceite esencial de hierba luisa frente al <i>Staphylococcus aureus</i>	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	N°2.1	Planta de hierba luisa	22
FIGURA	N°2.2	Estructura de los componentes mayoritarios del aceite esencial de hierba luisa	29
FIGURA	N°2.3	Cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	38
FIGURA	N°2.4	Cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	40
FIGURA	N°4.1	Acondicionamiento y reducción de tamaño	60
FIGURA	N°4.2	Aceite esencial obtenido	61
FIGURA	N°5.1	Cromatograma GC-MS del aceite esencial de hierba luisa	75
FIGURA	N°5.2	Anova unidireccional :Rendimiento(%) vs tamaño de partícula	81

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	Nº3.1	Variables independiente y dependientes	44
GRÁFICA	Nº4.1	Etapas del diseño de investigación	48
GRÁFICA	Nº5.1	Curva de destilación para partícula de tamaño 3 cm	67
GRÁFICA	Nº5.2	Curva de destilación para partícula de tamaño 5 cm	67
GRÁFICA	Nº5.3	Curva de destilación para cantidad de materia 1.5 kg	68
GRÁFICA	Nº5.4	Curva de destilación para cantidad de materia 2 kg	69
GRÁFICA	Nº5.5	Curva de destilación para volumen de agua 5 L	70
GRÁFICA	Nº5.6	Curva de destilación para volumen de agua 6 L	70
GRÁFICA	Nº5.7	Curva de crecimiento del <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial de hierba luisa.	77
GRÁFICA	Nº5.8	Curva de crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial de hierba luisa.	78
GRÁFICA	Nº5.9	Letalidad (-K) deL aceite esencial de hierba luisa sobre el <i>Escherichia coli</i>	79
GRÁFICA	Nº5.10	Letalidad (-K) deL aceite esencial de hierba luisa sobre el <i>Staphylococcus aureus</i>	80
GRÁFICA	Nº5.11	Rendimiento(%) vs tamaño de partícula	82

## RESUMEN

La obtención de aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) se realizó por arrastre con vapor de agua. El rendimiento promedio obtenido fue de 0,375 % para hojas de 3 cm. y 0,354 % para 5 cm.

La caracterización física y química del aceite obtenido dio como resultado: densidad relativa igual a 0,887 y un índice de refracción promedio igual a 1,484. Además, se determinó un índice de yodo de 2,40 g de yodo absorbido/100 g de muestra, un índice de acidez de 2.219 mg KOH/g de aceite, un índice de saponificación 6,752 mg KOH/g de aceite y un índice de éster de 4,534 mg KOH/g de aceite.

Se evaluó su actividad antibacteriana frente a dos cepas: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria fue de 0,04 ml de aceite esencial en 10 ml de medio para *Escherichia coli* y de 0.01 ml de aceite esencial en 10 ml de medio para *Staphylococcus aureus*. La velocidad de letalidad fue de 1,0974 UFC/ml/hora para *Escherichia coli* y de 0,1581 UFC/ml/hora para *Staphylococcus aureus*.

**Palabras clave:** Destilación, Caracterización, aceite esencial, actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria, letalidad.

## ABSTRACT

The essential oil of "lemongrass" (*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf.) was obtained using the method of steam distillation. The average yield retrieved was from 0,375% to 3 cm leaves and 0,354% for the 5 cm leaves.

The physical and chemical characterization of the oil resulted an relative density equal to 0,887 and an average refractive index equal to 1,484. Also found a iodine index of 2,40 g of iodine absorbed/100 g of sample, a acidity index of 2,219 mg KOH/g of oil, a saponification index 6,752 mg KOH/g oil and an index of ester of 4,534 mg KOH/g oil.

The antibacterial activity of lemongrass essential oil was studied against two strains: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. It was identified the minimum inhibitory concentration of 0,04 ml of essential oil in 10 ml of medium for *Escherichia coli* and 0,01 ml of essential oil in 10 ml of medium for *Staphylococcus aureus*.

The rate of lethality was 1,0974 UFC/ml/hour for *Escherichia coli* and 0,1581 UFC/ml/hour for *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** distillation, Characterization, essential oil, antibacterial activity, minimal inhibitory concentration, lethality.

# I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

## 1.1. Identificación del problema

El Perú presenta una biodiversidad de plantas medicinales nativas, siendo utilizadas en forma empírica y tradicional por sus bondades terapéuticas en el cuidado de la salud. Son pocas las investigaciones que se desarrollan en el país que se enfocan en dar conocer sus propiedades y principios activos, por lo tanto, muchas de estas plantas no son aprovechadas a profundidad, pero si en el resto del mundo ya que son utilizadas por las diferentes industrias principalmente por sus propiedades analgésicas y antibacterianas.

El mayor porcentaje de enfermedades patógenas están asociados a bacterias que afectan principalmente a personas vulnerables como son los niños y ancianos. Debido a esta problemática se busca obtener un producto natural que ayude a controlar el crecimiento o proliferación de microorganismos patógenos, como es el caso del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), sin alterar sus propiedades y evaluar su actividad antibacteriana debido a sus componentes activos mayoritarios como por ejemplo el citral, mediante pruebas microbiológicas frente a las bacterias comunes como el *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus*.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuáles son las características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor?

### **1.2.2. Problemas específicos**

- a. ¿Cuáles deben ser las condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor?
- b. ¿Cuáles son los componentes principales del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor?
- c. ¿Cuál es la actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), frente al *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Determinar las características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- a. Determinar las condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor.
- b. Determinar los componentes principales del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.
- c. Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), frente al *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### **1.4. Justificación**

#### **1.4.1. Teórica**

El aceite esencial de hierba luisa es utilizado para la elaboración de productos agroindustriales tales como desinfectantes, perfumería, etc.

Por lo tanto, se contribuye en promover la obtención de este aceite esencial para su aprovechamiento industrial debido a su poder antibacteriano.

#### **1.4.2. Económica**

La hierba luisa es un recurso natural que se encuentra en abundancia en nuestro país principalmente en la selva como es el caso de la provincia de Chanchamayo - Junín debido al clima y su geomorfología, por lo tanto la producción del aceite esencial de hierba luisa sería una fuente de ingreso que conllevará a mejorar el bienestar socioeconómico de los pobladores de esta provincia.

#### **1.4.3. Legal**

Los resultados que se obtuvieron productos de la investigación fueron realizados con las siguientes normas técnicas peruana (NTP): Densidad NTP-ISO 279:2011; índice de iodo NTP-ISO 3961:2012; índice de acidez NTP 319.085:1974; índice de refracción NTP-ISO 280:2011; índice de saponificación NTP-ISO 3657:2016, número de éster NTP 319.088:1974.

#### **1.5. Importancia**

La importancia de la investigación fue la determinación de las condiciones adecuadas que nos permitirá diseñar la tecnología en la obtención del

aceite esencial de hierba luisa que posteriormente puede ser utilizado con fines industriales, así como su caracterización física y química.

Otra importancia de esta investigación fue encontrar la concentración mínima inhibitoria para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* demostrando así su poder antibacteriano, la cual posteriormente puede ser utilizada en la industria de cosmética o farmacéutica.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

Para el presente trabajo de investigación se consideró los siguientes antecedentes:

Guerra, Rodríguez, García (2004). Desarrollaron un trabajo de investigación titulado "Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf "que trata sobre la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf, especie medicinal cultivada en Cuba, así como de una crema elaborada a partir del mismo. Se emplea el método de diluciones en medio líquido. Se determina la concentración mínima inhibitoria frente a microorganismos de interés clínico humano. La caracterización del aceite esencial reveló la presencia de citral como componente mayoritario. El aceite mostró una notable actividad antifúngica, superior a la que se observó con la crema, lo que justifica el uso tradicional de esta planta en Cuba. La especie microbiana más sensible resultó ser *Trichophyton rubrum*.

Alzamora, Morales, Armas, Fernández (2001). Desarrollaron un trabajo de investigación titulado "Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas". El objetivo fue la

investigación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en medicina tradicional en el Perú: *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto"; *Cymbopogon citratus*, (DC.) Stapf "hierba luisa"; *Tagetes pusilla* Lag. "Anís serrano"; *Senecio tephrosioides* Turcz "huamanripa" y *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling "salvia". Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron a *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P y *Candida albicans* ATCC 10231. Se empleó discos de antibióticos como controles. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*.

Armijo, Vicuña, Romero y Otiniano, Condorhuaman (2012). Desarrollaron una investigación titulada "Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor". Se analiza el proceso y se desarrolla un modelo para la extracción de aceite esencial de eucalipto en escala piloto con un flujo de vapor de 5.73 g / min. Según el modelo de Dunckhorst-Houghton, que considera el efecto de dispersión axial, y el uso de procedimientos de optimización para establecer los parámetros del modelo, se obtuvo una excelente concordancia entre la cantidad extraída de aceite teórico y el experimental.

Mayanquer, Salazar (2009). Desarrolló un trabajo de investigación titulado "Obtención de aceites esenciales de Cedrón (*Aloysia Triphylla*), Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), en un alambique tipo cachimbo por cohobación" cuyo objetivo principal de esta investigación fue extraer aceite esencial de plantas aromáticas de cedrón, sunfo y hierba Luisa, usando dos tiempos de extracción. El primer tiempo fue de 45 minutos y el segundo de 90 minutos. Se utilizó plantas en estado fresco con una humedad inicial promedio de 70.30 %, y plantas deshidratadas con una humedad promedio de 53.98 %, la deshidratación se la realizó en un desecador de bandejas durante 2 horas y media, con un flujo de aire del 50 % y una temperatura de 35 °C.

Peredo, Palou, López (2009). Desarrollaron un trabajo de investigación titulado "Aceites esenciales: métodos de extracción" donde explica los diferentes métodos de extracción de los aceites esenciales, la destilación por arrastre de vapor, la extracción con disolventes, la extracción por fluidos supercríticos y por medio del uso de microondas estableciendo algunas de sus ventajas y limitaciones.

Borja (2007). Desarrolló una investigación titulada "Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans* in vitro" cuyo objetivo era evaluar la actividad antibacteriana de este aceite esencial a través del método de

difusión en agar a las 24 y 48 horas y a su vez hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans*. Encontraron que la CMI del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans* fue de 0.4%. Al evaluar la actividad antibacteriana en 80  $\mu$ /ml y 160  $\mu$ /ml del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* encontraron una media de los halos de inhibición de 21.8 mm y 23 mm respectivamente.

Camacho (2011). Desarrolló una tesis titulada "Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de la muña (*Minthostachys setosa*) y su estudio antibacteriano" donde se realiza métodos fisicoquímicos y la evaluación de los parámetros de crecimiento de 4 microorganismos comprometidos en la contaminación microbiana de alimentos y 1 microorganismo responsable de la formación de placa dental con muestras recolectada de la zona de Yauyos.

Meza, Vargas (2013). Desarrollaron una tesis titulada "Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica. Tiene como objetivo principal evaluar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon Citratus*) contra *Propioni bacteriumacnes*, bacteria causante del acné,

elaborar una loción y evaluar la eficacia in vitro de la loción formulada a partir de este aceite.

Quintana Rojas (2014). Desarrolló una investigación titulado "Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de citrus limón en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*", donde determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y utilizo el método de macrodilución en caldo nutritivo.

Stanciuc Viorica (1999). Desarrolló un trabajo de investigación titulado "Estudio de la extracción y separación del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus Stapf*) ", donde determinó parámetros óptimos de operación a nivel laboratorio, planta piloto e industrial.

Reyes, Palou, López (2014). Desarrollaron un trabajo de investigación titulado "Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales" donde se busca estandarizar los diferentes métodos que determinen el efecto antimicrobiano y los componentes químicos presentes en los aceites esenciales en fase vapor y por contacto directo. Entre los métodos más empleados para la evaluación antimicrobiana se incluyen: dilución, difusión, caja Petri invertida y cámara hermética y la técnica empleada para determinar y cuantificar los componentes químicos es la cromatografía.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Hierba Luisa**

Planta herbácea denominada popularmente como limoncillo, mide de 60 a 120 cm. de altura, sus hojas son largas como listones y desprende agradable aroma si se estrujan. Las flores están agrupadas en espigas y se doblan como las hojas. (Gonzales, M,2006)

Está presente en climas cálidos, semi-cálidos y templados. El limoncillo es originario de las regiones cálidas y tropicales de Asia, es un tipo de pasto perenne, tiene un rizoma corto ramificado que origina numerosas macollas, consta de hojas alargadas y planas pubescentes y acentuadamente verdes que despiden un aroma similar al del limón. En climas templados o de estaciones no florece, pero en clima cálido produce densas panojas, con espigas de granos verde amarillentos. (Mayanquer, Salazar, 2009).

Crece adecuadamente en una gama de suelos, pero, su mayor productividad se da en los suelos fértiles de textura media a ligera (franco a franco arenoso) y con buena capacidad retentiva de agua.

En los suelos arenosos se tiene mayor producción de follaje, pero menor aceite esencial. No tolera las condiciones de mal drenaje. Desarrolla bien en zonas con temperatura media entre 22 y 28° C.

Se encuentra en áreas con precipitaciones pluviales en el rango de 1 500 a 4 000 mm/año con lluvias bien distribuidas se cosecha de 3 a 6 meses

después de la siembra. El contenido de aceite en la hierba luisa fresca esta alrededor de 0,2 a 0,4 % (Rev. Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación, 2015).

**FIGURA N° 2.1**

**PLANTA DE HIERBA LUISA**



**Fuente: Elaboración propia**

**2.2.2. Clasificación Taxonómica**

La muestra vegetal recibida por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha sido estudiada y clasificada como "*Cymbopogon Citratus* (DC.) Stapf." y tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación de Cronquist (1981)

**TABLA N° 2.1  
TAXONOMÍA DE LA HIERBA LUISA**

<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Sub clase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Poaceae
<b>Genero</b>	<i>Cymbopogon</i>
<b>Especie</b>	<i>Cymbopogon citratus (DC.) Stapf.</i>

**Fuente: Museo de Historia Natural de la Universidad  
Nacional Mayor de San Marcos**

### 2.2.3. Producción y exportación de la hierba luisa

#### a. - Producción de la hierba luisa en el Perú

La producción de hierba luisa se concentra principalmente en el departamento de Ucayali, igualmente para el último periodo anual se ha registrado una variación porcentual negativa de -61,84%, el total producido en este periodo ha sido de tan solo 108 toneladas. (MINAG/ AREX).

**TABLA N° 2.2  
PRODUCCIÓN NACIONAL DE HIERBA LUISA (TONELADAS)**

<b>Departamento</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
Ucayali	155	283	283	108

**Fuente: MINAG / Elaboración: AREX**

## b.- Evolución de las exportaciones peruanas

La exportación de hierba luisa en el año 2016, referida al año 2015, disminuyó en un 44,78% como se puede apreciar en la tabla N° 2.3, recaudando US\$ 44 mil. Además, se muestran los montos en kilos netos para la hierba luisa en la tabla N°2.4.

**TABLA N° 2.3**  
**EXPORTACIÓN DE HIERBA LUISA EN US\$(FOB) (2007-2016)**

<b>Producto</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
<b>Hierba</b>	<b>25,880</b>	<b>30,621</b>	<b>38,716</b>	<b>68,491</b>	<b>108,25</b>
	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
	<b>334,31</b>	<b>165,68</b>	<b>79,401</b>	<b>79,888</b>	<b>44,112</b>

Fuente: Sunat-Aduanas/Elaboración: Agrodata Perú

**TABLA N° 2.4**  
**EXPORTACIÓN DE HIERBA LUISA EN PESO NETO KG (2007-2016)**

<b>Producto</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>
<b>Hierba</b>	<b>8,881</b>	<b>7,097</b>	<b>11,849</b>	<b>19,143</b>	<b>42,549</b>
<b>luisa</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
	<b>170,449</b>	<b>86,448</b>	<b>31,684</b>	<b>31,684</b>	<b>11,029</b>

Fuente: Sunat-Aduanas/Elaboración: Agrodata Perú

## c.- Principales mercados de destino:

La hierba luisa ha tenido un crecimiento notable y esto puede atribuirse a la apertura y crecimiento de la demanda de mercados como se aprecia en la tabla N° 2.5.

**TABLA N° 2.5**

**PRINCIPALES PAÍSES DE DESTINO PARA LAS EXPORTACIONES DE HIERBA LUISA EN US\$ (FOB)**

Nº	País	2007	2008	2009	2010	2011
1	EEUU	21,281	26,175	27,064	58,936	56,296
2	Brasil	-	-	-	-	31,375
3	Japón	579	747	2,186	4,841	11,331
4	Ecuador		1,500	5,760	4,400	4,218
5	Chile	3,600	1,500	3,100		3,300
6	España	-	-	376	-	1,278
7	Suiza	26	125	62	105	218
8	Canadá	248	28	-	157	152
9	Rep. Checa			60		42
10	Francia		13	19	17	37
11	Otros	146	533	89	36	5
	<b>Total</b>	<b>25,880</b>	<b>30,621</b>	<b>38,716</b>	<b>68,491</b>	<b>108,252</b>

**Fuente: Sunat-Aduanas /Elaboración: AREX**

Estados Unidos lidera el ranking con una participación de 51% del total exportado durante el año 2011, si bien el total exportado en ese último año disminuyó en -4.48% la cantidad exportada supera los US\$ 56 mil. En segundo lugar, se encuentra Brasil con una participación de 47% del total exportado y como se puede apreciar recién se inicia el vínculo comercial durante el año 2011, el total exportado supera los US\$ 31 mil.

**2.2.4. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son compuestos naturales, líquidos, volátiles y de agradable aroma extraídos de las plantas mediante procesos de destilación. Es por esto que son productos químicos que forman las

esencias odoríferas de un gran número de vegetales (Mayanquer, Salazar, 2009).

Se encuentran casi exclusivamente en las fanerógamas y en especial en algunas familias como las rosáceas, labiadas, umbelíferas, lauráceas, etc. (Font Quer; P. "Diccionario de Botánica". Pág. 6. 1953)

El concepto de aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas obtenidas a partir del alquitrán de la hulla y a las sustancias semi sintéticas preparadas con aceites o esencias naturales. Estos productos de origen vegetal son volátiles, olorosos, solubles en grasas, disolventes orgánicos, pero insolubles en agua. Estas características de solubilidad permiten definirlos como aceites y su característica de olor como esencias.

Si muchos aceites esenciales son utilizados por sus propiedades medicinales, otros son utilizados en agroalimentación como las especias y los aromáticos. (Camacho Bautista 2003)

Son sustancias muy ligeras y de textura muy fina, se fabrican a partir de una amplia variedad de flora que va desde las plantas más modestas hasta las exóticas orquídeas, rosas y de algunas frutas, como la naranja y la manzana. También se extraen aceites esenciales de las hojas las raíces,

las cortezas de los árboles, flores, semillas y frutos. En las diferentes partes de las plantas, las esencias son almacenadas, localizadas o sintetizadas en lugares bien precisos, especializados, próximos a la superficie de la planta. Así es posible encontrar los aceites esenciales, retenidos en células especiales, en bolsillos, pelos o canales secretos (Mayanquer, Salazar, 2009).

Los aceites esenciales tienen una enorme cantidad de usos y se obtienen tanto de plantas cultivadas como de plantas silvestres FAO (1998), estima que existen alrededor de 3000 aceites esenciales conocidos a nivel mundial, de los cuales aproximadamente el 10% tienen importancia comercial. (Santos Carrillo, 2006)

La mayoría de los aceites se usan en cosméticos, masajes, aromaterapia, alimentos o en productos de limpieza, otros son usados como repelentes de insectos tanto para el hombre como para el ganado y en medicina se aplican en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones.

#### **2.2.5. Composición química de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes en concentraciones muy diferentes, se caracterizan por dos o tres grandes constituyentes en concentraciones bastante altas (20-70%) que determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales.

El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides, también presentan en menor proporción componentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por el bajo peso molecular. Los aceites esenciales están formados principalmente por monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ).

Los primeros son las moléculas más representativas que constituyen el 90% de los aceites esenciales y permiten una gran variedad de estructuras tales como: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos, fenoles (Castro, Jessica, 2011).

El factor principal del éxito en el uso de algunos aceites para eliminar bacterias y hongos patógenos guarda relación con la composición muy compleja de estos aceites, que son mezcla formadas con actividad biológica muy diversa, que ejercen un sinergismo potenciando su poder antimicrobiano.

### **2.3. Aceite esencial de hierba luisa**

El aceite esencial destilado que se obtiene de esta planta tiene una fragancia distintiva a limón pero menos intensa que el toronjil. Está presente en las hojas en una proporción de 0.25 a 0.35% (Damián P. y Damián K., 1996).

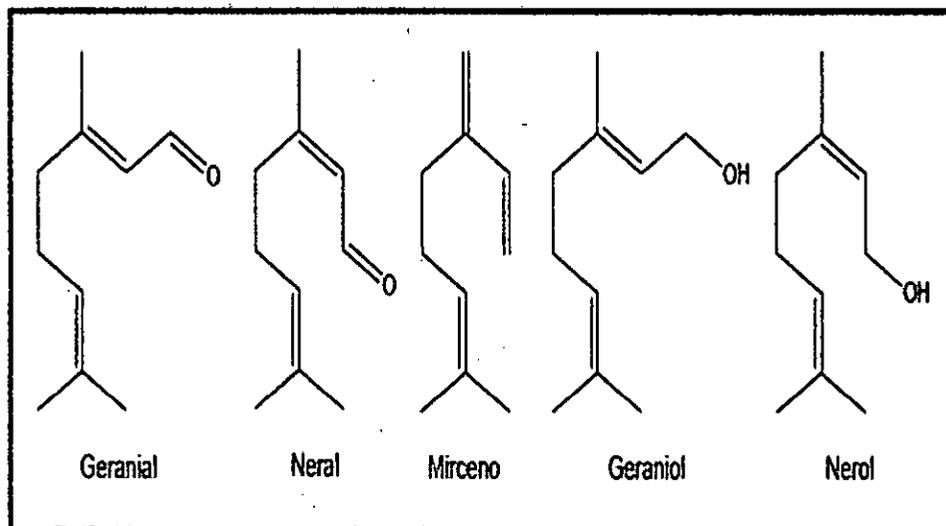
La composición química del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), corresponde a compuestos tales como monoterpenos, hidrocarburos, cetonas, aldehídos y ésteres.

El aceite está caracterizado por un alto porcentaje de citral (70-85%), también se compone de pequeñas cantidades de mirceno, geraniol, nerol, entre otros.

En la figura N° 2.2 se presentan las estructuras químicas de los principales compuestos del aceite.

**FIGURA N° 2.2**

**ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**



**Fuente: Castro Jessica (2011)**

El citral es un monoterpeno compuesto por dos isómeros, geranial y neral (Castro Jessica, 2011).

El citral formado por los isómeros citral A (trans) y citral B (cis). El citral es un líquido amarillo pálido y posee un intenso olor a limón (Lewis, 2007).

El  $\alpha$ -citral y  $\beta$ -citral provocan una acción antibacteriana sobre los organismos Gramnegativos y Grampositivos (Gagan Shah, 2011).

En la tabla N° 2.6 se presenta la composición química del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)

**TABLA N° 2.6  
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

<b>COMPUESTO</b>	<b>PORCENTAJE (%)</b>
<i><math>\alpha</math>-citral</i>	40,8
<i><math>\beta</math>-citral</i>	32,0
<i>Nerol</i>	4,18
<i>Geraniol</i>	3,04
<i>Citronelal</i>	2,10
<i>Terpenoleno</i>	1,23
<i>Acetato de geraniol</i>	0,83
<i>Mirceno</i>	0,72
<i>Terpineol</i>	0,45
<i>Metilheptona</i>	0,2
<i>Borneol</i>	0,1-0,4
<i>Acetato de linalilo</i>	0,1
<i><math>\alpha</math>-Pino</i>	0,07
<i><math>\beta</math>-Pino</i>	0,04
<i>Limoneno</i>	<i>Rastros</i>
<i>Linalool</i>	<i>Rastros</i>

Fuente: Gagan Shah (2011)

### **2.3.1. Duración del aceite esencial de hierba luisa**

El aceite esencial de hierba luisa tiene un tiempo de vigencia de 3 meses, en un lugar a temperatura ambiente y con poca luz, a partir de esta fecha el aceite tiende a degradarse, ya que es sensible a la exposición a la luz y al aire, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía. (Guerra, 2004)

### **2.3.2. Usos del aceite esencial de hierba luisa**

El aceite esencial de hierba luisa se utiliza para:

- ✓ Obtención de iononas y metil iononas.
- ✓ Síntesis de vitamina A y de compuestos aromáticos.
- ✓ Extraer el citral, el cual se utiliza como saborizante en la industria alimenticia.
- ✓ En la industria cosmética se lo utiliza como componente para elaborar shampoo contra cabellos grasos y también como componente de cremas contra el acné y pieles con celulitis.
- ✓ En la aromaterapia se lo utiliza para dar masajes y de esta manera lograr que los músculos se relajen, también se lo utiliza para calmar los dolores producidos por exceso de actividad.

### **2.4. Métodos de obtención de aceites esenciales**

Los aceites esenciales se pueden obtener de diversas formas, ya que depende del órgano de la planta del cual va a ser extraído, además de que al momento de ser extraído el aceite no pierda sus características organolépticas, ni sus propiedades. Los procesos pueden ser:

#### **a.- Obtención por arrastre con vapor.**

Este proceso se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, generado usualmente por una caldera o calderín, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. Generalmente los aceites son más livianos que el agua y muy poco solubles en ella; por ende, pueden ser separados por decantación. El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas. (Stashenko, 2009).

Este método no se utiliza en aquellos aceites donde las altas temperaturas les alteran sus características organolépticas. (Cairo, 1997).

#### **b.- Extracción con solvente:**

En este método la muestra seca y molida se pone en contacto con el disolvente seleccionado, como por ejemplo etanol, cloroformo u otros solventes volátiles. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también extraen otras como grasas y ceras obteniendo una esencia impura. (Martínez, 2003).

#### **c.- Expresión en frío:**

Este método se utiliza para extraer el aceite esencial de los frutos de los cítricos, los cuales no soportan las altas temperaturas de la destilación.

Mediante una esponja mojada con etanol que tiene alfileres, picar la cáscara de los frutos, va a ir adsorbiendo el aceite, posteriormente se procede a la separación aceite-etanol mediante destilación al vacío. (Cairo, 1997).

**d.- Enfleurage:** Es muy usado para extraer el aceite esencial de las flores. Se colocan las flores en medio de dos placas de vidrio las cuales se encuentran con grasa, se dejan estas placas a temperatura ambiente durante un mes, cada semana se debe cambiar las flores. (Cairo, 1997).

## **2.5. Actividad antibacteriana**

El aceite esencial de las hierbas y especias es rico en compuestos aromáticos con propiedades bactericidas (Botanical, 2012). Es útil en afecciones de la piel como acné, pie de atleta, para desbloquear los poros y sarna (EOP, s.f), ya que en ensayos in vitro el aceite esencial inhibe el 80% de las cepas de dermatofitos como es el caso de *M. canis* (Kishore y otros, 1993), mientras que, otros ensayos demuestran actividad en algunas especies del genero *Aspergillus* (Mishra y Dubey, 1994).

### **2.5.1. Agentes antimicrobianos**

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos presentes o añadidos en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o causan la muerte de los microorganismos. (Reyes, Palou, López , 2014).

Los agentes antimicrobianos con acción indirecta son sustancias químicas añadidas con otros objetivos diferentes a la acción antimicrobiana, como por ejemplo los fosfatos y antioxidantes fenólicos (Davidson y Branen, 1993).

### **2.5.2. Agentes antimicrobianos derivados de especias y hierbas:**

La actividad antimicrobiana de las especias y hierbas se atribuye generalmente a compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales de las mismas (Reyes, Palou, Lopez 2014).

### **2.6. Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana**

Los métodos de evaluación de los aceites esenciales mediante el contacto directo han sido probablemente los más utilizados en los diversos estudios, ya que se busca reemplazar a los conservadores sintéticos; los cuales son añadidos durante la formulación de un alimento, de tal manera que los aceites esenciales se evalúan al añadirlos directamente en forma líquida, ya sea en un producto alimenticio o un medio sintético. (Reyes, Palou, López 2014).

- **Dilución en agar**

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el aceite esencial es letal contra un microorganismo, además se usa con microorganismos aeróbicos o microaerofílicos con una velocidad variable de

crecimiento. Para esta técnica se preparan diferentes diluciones de los aceites esenciales; posteriormente las diluciones se añaden los agares y estos son puestos en cajas Petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (de 16 a 24 h). (Reyes, Palou, López 2014).

- **Dilución y microdilución en caldo**

El método de dilución y micro dilución seriada se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de aceites esenciales diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (cuando se utiliza tubos con un volumen total de 1-10 mL) o de micro dilución (si se realiza en placas de pocillos un máximo de 500  $\mu$ L por pocillo). Posterior a la incubación (16-24 Horas dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo.

Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace un sembrado en agar. (Reyes, Palou, López 2014).

- **Difusión en agar**

El método de difusión en agar ha sido probablemente el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos.

En este método, existen dos formas de identificar la difusión y por la tanto, la efectividad del aceite esencial.

En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida del aceite esencial, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del aceite esencial en las perforaciones.

Posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del aceite esencial hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición. Lo anterior supone que el diámetro de las zonas aumentará al incrementar la concentración del aceite esencial (Bonev, Hooper y Parisot, 2008). Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos.

## 2.7. Bacterias Gram negativas y Gram positivas

Entre las más comunes tenemos a las siguientes bacterias:

### 2.7.1. Escherichia coli

Es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, asporógeno, tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermental la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa positivos y oxidasa negativos. *Escherichia coli* puede crecer en un amplio rango de temperatura, comprendido entre 7-46 °C con un óptimo de 37 °C, pH de 4,4 a 9, con un óptimo de 6 a 7, su actividad de agua (Aw) mínima es 0.95 y su (Aw) óptimo es 0.995. (Naim F, Messier S, Saucier L, Piette G. 2004).

La *Escherichia coli* se la clasifica de la siguiente manera:

**TABLA N° 2.7**  
**CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL *ESCHERICHIA COLI***

<b>Reino:</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Clase:</b>	<i>Gamma Proteobacteria</i>
<b>Orden:</b>	<i>Enterobacteriales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Escherichiacoli</i>

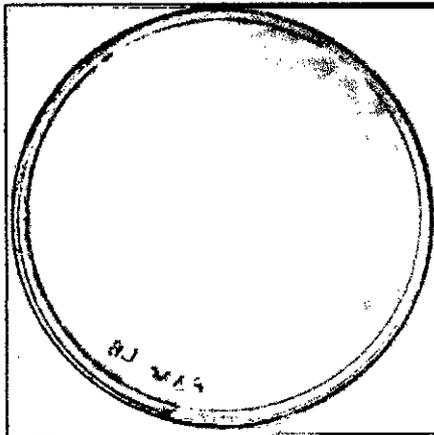
Fuente: David Henricks Bergey (1957)

Localización: Se encuentra en el tubo digestivo de los mamíferos. En condiciones normales constituye una parte esencial de la flora bacteriana humana.

Utilización: Se la utiliza la *E. coli* para experimentos de genética y biotecnología molecular.

Existen cepas de *E. coli* específicas que son patógenas, las cuales provocan alteraciones infecciosas graves en forma de enteritis. La manera de transmisión es feco-oral.

**FIGURA N° 2.3**  
**CEPA *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922**



**Fuente: UNICACH, ceparío (2014)**

La infección más común causada por *Escherichia coli* es la urinaria, que por lo general es una infección ascendente (desde el periné, a través de la uretra).

Normalmente, la *Escherichia coli* habita en el tracto gastrointestinal; sin embargo, algunas cepas han adquirido genes que les permiten causar infecciones intestinales. Pueden causar las siguientes enfermedades:

- Cistitis
- Pielonefritis aguda
- Neumonía típica
- Intoxicación alimentaria bacteriana
- Colecistitis aguda
- Gastroenteritis por *E. coli* enterotoxígeno
- Prostatitis aguda bacteriana

Fuente: Pagina Web: [www.Diagnosmd.com](http://www.Diagnosmd.com)

### **2.7.2. *Staphylococcus aureus***

Es una bacteria Gram positiva, anaerobio facultativo; se encuentra en la piel, la nariz y en la piel de animales de sangre caliente. Hasta 30-50 % de la población humana son portadores. *S. aureus* puede crecer en un amplio rango de temperatura, comprendido entre 7- 48,5° C con un óptimo de 30-37 °C, pH de 4,2 a 9,3 con un óptimo de 7 a 7.5 y concentración de cloruro de sodio hasta 15%, puede crecer y sobrevivir a baja actividad de agua ( $A_w=0.86$ ). (Carrasco E, García G , 2009).

A la *S. aureus* se la clasifica de la siguiente manera:

**TABLA N° 2.8**  
**CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

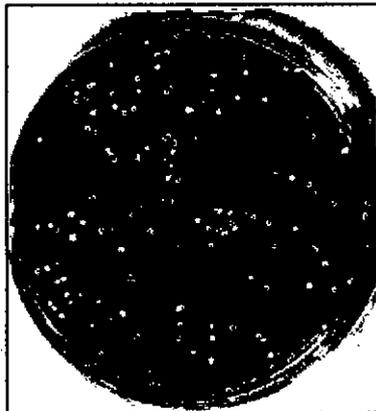
<b>Reino</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Filo:</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Clase:</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Orden:</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Especie:</b>	<i>S. aureus</i>

Fuente: David Henricks Bergey (1957)

Localización: Generalmente se encuentra en los alimentos, producidos por animales infectados con esta bacteria.

*S. aureus* y sus diversas cepas patógenas producen infecciones en la piel y en el tracto nasofaríngeo.

**FIGURA N°2.4**  
**CEPA S. AUREUS ATCC 6538**



Fuente: UNICACH, ceparío (2014)

Puede causar las siguientes enfermedades:

- Neumonía típica
- Impétigo (por estreptococos y estafilococos)
- Blefaritis por *Staphylococcus aureus*
- Conjuntivitis bacteriana
- Orzuelo
- Osteomielitis aguda

Fuente: Pagina Web: [www.Diagnosmd.com](http://www.Diagnosmd.com)

## 2.8. Definición de términos básicos

- **Concentración mínima inhibitoria.** - Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas.
- **Aceites esenciales.** - Son compuestos naturales, líquidos, volátiles y de agradable aroma, situados en cualquier parte del vegetal, extraídos de las plantas mediante procesos de arrastre con vapor o extracción por solvente.
- **Destilación de arrastre con vapor.** – Separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otros productos no volátiles; de esta forma, compuestos orgánicos de alto punto de

ebullición son destilados con cierta rapidez por debajo del punto de ebullición del agua, al lograr ser arrastrados por el vapor generado.

- **Medio de cultivo.** - Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro.
- **Estándares de turbidez de McFarland** .-se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos.
- **Agar nutritivo.**- Medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacteria. Es muy útil porque permanece sólido incluso a relativamente altas temperaturas. Además, el crecimiento bacteriano en este agar lo hace en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas.

### III. VARIABLES E HIPÓTESIS

#### 3.1. Variables de la investigación

Para el presente trabajo de investigación se han considerado las siguientes variables.

##### 3.1.1. Variable independiente

Y: Características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.

##### 3.1.2. Variables dependientes

X<sub>1</sub> : Condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor.

X<sub>2</sub> : Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.

X<sub>3</sub> : Actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), frente al *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En la gráfica N° 3.1 se muestra un esquema donde se relacionan la variable independiente con las variables dependientes.

### GRÁFICA N°3.1

#### VARIABLES INDEPENDIENTE Y DEPENDIENTES

Y : Características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ), obtenido por el método de arrastre con vapor.

X<sub>1</sub>: Condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) por el método de arrastre con vapor.

X<sub>2</sub>: Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

X<sub>3</sub>: Actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) frente al *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Elaboración propia

#### 3.2. Operacionalización de variables:

Las variables dependientes, independientes involucradas en el proceso de obtención y evaluación de la actividad antibacteriana se presentan en la siguiente tabla N° 3.1.

**TABLA N° 3.1**  
**OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>VARIABLES INDEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>MÉTODOS</b>
Y <sub>1</sub> : Características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.) obtenido por el método arrastre con vapor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densidad</li> <li>• Índice de yodo</li> <li>• Índice de acidez</li> <li>• Índice de saponificación</li> <li>• Número de ésteres</li> <li>• Índice de refracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• g/mL</li> <li>• g yodo abs/100 g de muestra</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• adimensional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis experimental</li> </ul>
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>MÉTODOS</b>
X <sub>1</sub> : Condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.) por el método de arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño de muestra</li> <li>• Materia prima</li> <li>• Volumen de agua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cm</li> <li>• kg</li> <li>• L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medición longitudinal</li> <li>• Gravimetría</li> <li>• Medición volumen</li> </ul>
X <sub>2</sub> : Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.) por el método de arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• citral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• %</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</li> </ul>
X <sub>3</sub> : Actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa frente al <i>Escherichia Coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración mínima inhibitoria (CMI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ml de aceite /ml de medio de cultivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de dilución en caldo</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia

### **3.3. Hipótesis general e hipótesis específicas**

#### **3.3.1. Hipótesis general**

El aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor reducen la carga bacteriana significativamente debido a la actividad antibacteriana de sus componentes.

#### **3.3.2. Hipótesis específicas**

##### **Hipótesis específica N°1**

Las condiciones de operación, así como el tamaño de la hoja de hierba luisa y el volumen de agua y cantidad de materia utilizados influye en el rendimiento de la obtención del aceite.

##### **Hipótesis específica N°2**

El componente activo mayoritario del aceite esencial de la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), que le confieren un efecto antibacteriano es el citral.

##### **Hipótesis específica N°3**

El efecto antibacteriano del aceite de hierba luisa(*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ), sobre el *Escherichiacoli* y *Staphylococcus aureus* es significativo.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1. Tipo de investigación**

Los tipos de investigación que se realizarán en nuestra tesis son:

a) Por su finalidad: Aplicada

Se aplicará una tecnología óptima y de impacto ambiental mínimo en el proceso de obtención del aceite esencial de hierba Luisa por el método de arrastre con vapor.

b) Por su diseño interpretativo: Experimental

Se realizará la experimentación en el laboratorio y la interpretación de resultados obtenidos en la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba Luisa.

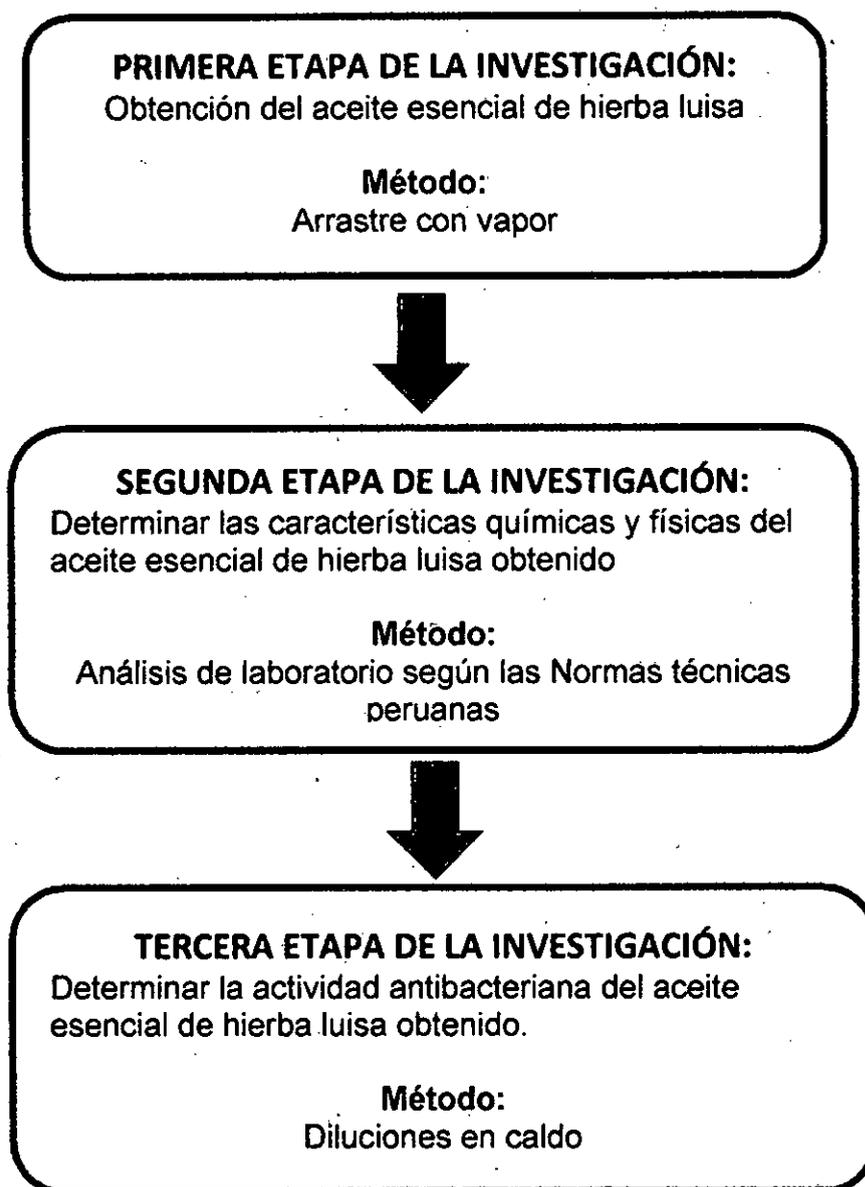
c) Por el énfasis en la naturaleza de los datos manejados: Cuantitativo

Los datos obtenidos en la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba Luisa, son de carácter cuantitativo.

## 4.2. Diseño de la Investigación

El diseño de la presente investigación ha considerado tres etapas, los cuales se observan en la gráfica 4.1

**GRÁFICA N° 4.1**  
**ETAPAS DEL DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**



Fuente: Elaboración propia

### **4.3. Población y muestra**

#### **4.3.1. Población de estudio**

Para esta investigación se utilizó como materia prima hierba luisa, procedente del anexo Kimiri Sur del distrito La Merced, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín, que está ubicado a 751 m.s.n.m.

#### **4.3.2. Muestra**

El tamaño de muestra estuvo conformado por 20 kg de hierba luisa que se utilizó para la obtención del aceite esencial.

### **4.4. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos**

#### **4.4.1. Técnicas para recolección de datos**

Para la recolección de datos se usaron las siguientes técnicas:

##### **Recolección de datos para evaluar la velocidad de destilación:**

Para ello se realizaron las lecturas de los volúmenes del aceite esencial recogidos en el vaso florentino que estará correlacionado con el tiempo

##### **Recolección de datos de los siguientes análisis al producto final:**

densidad, índice de refracción, índice de iodo, índice de acidez, índice de saponificación, índice de éster, y la composición de los compuestos del aceite esencial por cromatografía de masas.

##### **Recolección de datos en la evaluación de la actividad antibacteriana:**

Para determinar unidad formadora de colonias (UFC) se utilizó la técnica de conteo de placa.

#### **4.4.2. Instrumentos de recolección de datos**

Para la recolección de datos se hizo uso de los siguientes equipos, materiales y reactivos que usaremos en el laboratorio de operaciones de procesos unitarios y en el laboratorio de microbiología del Centro Experimental Tecnológico.

##### **a.-Equipos:**

- Equipo destilador de arrastre con vapor
- Balanza analítica T.WINER, sensibilidad 0,1g
- Balanza analítica BOECO sensibilidad 0,0001g
- Picnómetro de 5mL
- Refractómetro
- Termómetro TAYLOR 0° a 200°C
- Micropipeta BOECO, 10 – 100 µL
- Estufa esterilizadora a calor seco U50 MEMMERT
- Incubadora de cultivo B40 MEMMERT
- Autoclave 25X ALL AMERICAN
- Contador mecánico de colonias D6072 KARLKOLB
- Balanza de precisión: ADVENTURE OHAUS, sensibilidad 0,1g
- Baño María XMTD2301 GUTER LEITER

- Congeladora
- Vibrador VF10IKA-VIBRO-FIX
- Mechero Bunsen
- Cromatógrafo de gases AGILENT TECHNOLOGIES 789

**b.- Materiales y reactivos:**

- Tijeras
- Probeta de 100ml y 1000ml
- Frasco ámbar de 10ml
- Vaso Florentino
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus*
- Asa de siembra
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Gradillas
- Espátulas
- Pipetas de 5ml y 10 ml
- Papel Kraft
- Frasco seco con tapas
- Agujas estériles de 1mL
- Placas Petri
- Mechero Bunsen
- Vernier

- Agar nutritivo PlateCount
- Caldo nutritivo Tryptona de soya
- Caldo diluido Tryptona de soya
- Jeringas de 1ml
- Pinzas
- Alcohol etílico 96
- Dimetil sulfóxido
- Gluconato de clorhexidina al 4%
- Agua desionizada
- Suero fisiológico
- Papel Wathman N°1
- Lejía
- Papel toalla
- Algodón
- Picetas
- Frascos de 250 ml
- Vaso precipitado de 1000ml

### **4.4.3. Metodología experimental**

#### **A. De la obtención del aceite esencial**

##### **A.1 Bases del Diseño**

Se estudió la obtención del aceite esencial de hierba luisa en forma experimental mediante el método de destilación por arrastre con vapor.

Las variables cuantitativas de importancia son: la cantidad de materia vegetal, volumen de agua y tamaño de partícula, siendo la variable de respuesta el porcentaje rendimiento y tiempo de obtención del aceite esencial de hierba luisa.

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Operaciones de Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, para determinar los efectos de las variables mencionadas sobre el rendimiento y tiempo de destilación.

Para este caso se seleccionó el diseño factorial para analizar los efectos causados por los diferentes factores estudiados durante el proceso de obtención, esto nos permitió visualizar la influencia de cada uno sobre la obtención del aceite esencial y la interacción entre ellas. La estructura de diseño de experimento tiene como modelo  $2^3$ , donde el 2 representa para este diseño dos niveles, uno alto y uno bajo, y 3 representa los tres factores como la cantidad de hierba luisa, volumen de agua y tamaño de partícula dando un total de 8 experimentos.

**TABLA N° 4.1  
FACTORES Y NIVELES**

<b>FACTOR</b>	<b>NIVEL BAJO</b>	<b>NIVEL ALTO</b>
Cantidad de materia (kg)	1,5	2
Volumen de agua (L)	5	6
Tamaño de partícula (cm)	3	5

Fuente: Elaboración propia

**TABLA N°4.2  
DISEÑO FACTORIAL 2<sup>3</sup> PARA LA OBTENCIÓN POR  
ARRASTRE CON VAPOR DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA  
LUIA**

<b>NÚMERO DE EXP.</b>	<b>VARIABLES</b>			<b>NIVELES</b>			<b>VECTOR DE RESPUESTA</b>	
	Tamaño de partícula (cm)	Volumen de agua(L)	Cantidad de materia (kg)				Rendimiento %	Tiempo de destilación (min)
1	3	5	1,5	-	-	-	R1	t1
2	3	5	2	-	-	+	R2	t2
3	3	6	1,5	-	+	-	R3	t3
4	3	6	2	-	+	+	R4	t4
5	5	5	1,5	+	-	-	R5	t5
6	5	5	2	+	-	+	R6	t6
7	5	6	1,5	+	+	-	R7	t7
8	5	6	2	+	+	+	R8	t8

Fuente: Elaboración propia

## A.2. Parámetros a evaluar

De los datos obtenidos en el proceso de la obtención del aceite esencial se obtuvo la velocidad de destilación y el rendimiento.

- **Velocidad de destilación**

En una tabla se recolecta los datos del volumen de aceite esencial por minuto que se recoge, luego con estos datos se hallaron las curvas de destilación, que luego nos ayuda para ser evaluadas

**TABLA N° 4.3  
VELOCIDAD DE DESTILACIÓN**

Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	V1
1	V2
2	V3
n	Vn

Fuente: Elaboración propia

- **Rendimiento de la obtención**

Para determinar el rendimiento de obtención del aceite esencial se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

Donde:

$W_f$  = peso del aceite esencial obtenido en gramos

$W_i$  = peso de la materia prima en gramos

## **B. De la caracterización del aceite esencial**

Se evaluaron las caracterizaciones físicas y químicas del aceite esencial de hierba luisa en forma experimental empleando las normas técnicas peruanas utilizadas por un laboratorio certificado.

- **Determinación de la Densidad Relativa.**

Se realizó nuestros ensayos por triplicado en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química, en comparación con los requeridos por un laboratorio certificado que utilizó la NTP-ISO 279:2011.

- **Determinación del Índice de Refracción.**

Se realizó nuestros ensayos por triplicado en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química, en comparación con los requeridos por un laboratorio certificado que utilizó la NTP-ISO 280:2011.

- **Determinación del Índice de yodo**

Se utilizó los servicios de un laboratorio certificado que utiliza la Norma Técnica Peruana: NTP-ISO 3961:2012.

- **Determinación del Índice de Acidez.**

Se utilizó los servicios de un laboratorio certificado que utiliza la Norma Técnica Peruana: NTP 319 085:1974.

- **Determinación del Índice de Ester.**

Se utilizó los servicios de un laboratorio certificado que emplea la Norma Técnica Peruana: NTP 319 088:1974.

- **Determinación del Índice de saponificación**

Se utilizó los servicios de un laboratorio certificado que utiliza la Norma Técnica Peruana: NTP-ISO 3657: 2016.

- **Identificación y Cuantificación de los componentes del Aceite**

- Esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.)**

Se empleó la técnica por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas realizadas en la Unidad de Investigación en productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **C. De la evaluación de la actividad antibacteriana**

Se empleó el método de dilución en caldo, para ello las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud.

Las variables cuantitativas de importancia son: las concentraciones iniciales de aceite esencial (por 10 mL de solución de medio de cultivo empleado), tiempo de incubación (horas), diluciones sucesivas de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus*, donde posteriormente se contabiliza las UFC/ mL que nos servirá para hallar la

concentración mínima inhibitoria en base a la reducción de la carga bacteriana.

**TABLA N° 4.4**  
**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Tiempo de incubación aproximada (horas)	UFC/mL				
	Control (Cepa bacteriana)	Concentraciones experimentales de mL de aceite esencial/ 10 mL medio cultivo			
		C1	C2	C3	...Cm
T 0	Y 0	X 0;1	X 0;2	X 0;3	X 0;m
T 1	Y 1	X 1;1	X 1;2	X 1;3	X 1;m
T 2	Y 2	X 2;1	X 2;2	X 2;2	X 2;m
T 3	Y 3	X 3;1	X 3;2	X 3;3	X 3;m
T 4	Y 4	X 4;1	X 4;2	X 4;3	X 4;m
...T n	...Yn	X n;1	X n,2	X n,3	X n;m

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de reducción de la carga microbiana lo hallamos según la ecuación:

$$\% \text{ Reducción} = 100 - \frac{Cb}{Ca} * 100$$

Dónde: Ca = Cantidad de UFC/mL al inicio, antes de la incubación  
 Cb= Cantidad de UFC/mL al final, después de la incubación  
 en un tiempo determinado.

Para que un antibiótico sea reconocido como tal, debe eliminar en 99,9 % al microorganismo, según la NCCLS (Comité nacional de normas de

laboratorios clínicos) por lo tanto tomándolo como referencia, evaluaremos esa reducción para poder hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial.

#### **4.5. Procedimientos de recolección de datos**

##### **4.5.1. Procedimiento experimental:**

###### **A. Para la obtención del aceite esencial de hierba luisa**

Se procesaron 1,5 kg para cuatro muestras de 3 cm y 2 kg para cuatro muestras de 5 cm, mediante un equipo de destilador por arrastre por vapor, empleando 5 y 6 litros agua destilada durante un tiempo 30 minutos aproximado por experiencia.

###### **A.1.- Acondicionamiento de la materia prima**

Luego de la recepción la materia prima se procedió a separar las hojas de los tallos y raíz. Esta etapa tiene como finalidad eliminar las hojas amarillentas, secas y otros contaminantes como tierra.

###### **A.2.- Picado de la materia prima**

La hierba luisa fue cortada a unos 15 cm de su raíz y se descartó la nervadura central, usando así sola las hojas. El picado o cortado se realizó con una tijera para la reducción de tamaño de la hoja, aproximadamente 3 y 5 cm.

**FIGURA N° 4.1**  
**ACONDICIONAMIENTO Y REDUCCIÓN DE TAMAÑO**



Fuente: Elaboración propia

**A.3.- Obtención del aceite por arrastre con vapor**

Las operaciones de obtención por el método de arrastre con vapor se realizaron a nivel piloto y el equipo utilizado consta de un generador de vapor, un alambique, un condensador y un separador florentino.

- Se depositó 5 y 6 litros de agua en el generador según la experiencia realizada, el generador está previsto con una resistencia eléctrica de 2000 watts.
- Se cargó 1,5 kg y 2 kg de hierba luisa en el alambique destilador previamente cortada en trozos según la experiencia, la distribución de la hierba luisa en interior de la caldera debe ser uniforme, para evitar

aglomeraciones y se coloca telas metálicas que impiden los arrastres de materia sólida.

- El condensador es de tipo tubular y enfriado con agua. Los vapores sufren un enfriamiento proporcionado por el agua fría que circula dentro de los tubos en contracorriente. En esta operación tiene importancia el control de la temperatura del condensador y el volumen de vapor a utilizarse.
- El condensado es una mezcla de agua y aceite, y el tiempo de obtención fue de aproximadamente 11 minutos, a partir de cuándo notamos la primera gota. La obtención será considerada concluida cuando el condensado es un líquido claro y notamos que ya es constante la cantidad de aceite obtenido.
- Del condensador sale una emulsión formada por agua y aceite esencial, que se separó al dejarla en reposo, debido a la diferencia de densidades. En la fase superior tenemos al aceite esencial como ve en la figura N° 4.2.

**FIGURA N°4.2**  
**ACEITE ESENCIAL OBTENIDO**



Fuente: Elaboración propia

## **B. Para la caracterización del aceite esencial de hierba luisa**

Se realizaron las siguientes determinaciones físicas y químicas al producto final tomando en cuenta las normas técnicas peruanas de aceites esenciales y por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Esta técnica permite obtener el espectro de masas de cada componente del aceite esencial mediante la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semi-volátiles. Esta se llevó a cabo en un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C de la Unidad de Investigación en productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## **C. Actividad antibacteriana**

El método aplicado para el análisis de la actividad antibacteriana fue el método de dilución en caldo, para ello las cepas estándar ATCC (American Type Culture Collection) *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus*, fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud (Anexo N° 5, N°6 y N°7).

El procedimiento fue el siguiente:

- Se trabajó para cada cepa estandar ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* con el método de dilución en caldo por separado.
- Se activó la cepa bacteriana haciendo una resiembra por estría simple en una placa con agar Plate Count, luego se incubó a 37 °C por 48 horas.
- La preparación del inóculo fue según escala de Mc Farland 0.5, para lo cual se tomó con un asa estéril de 2 a 3 colonias de cepa de bacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922 o *Staphylococcus aureus*) en estudio, que se transfirieron a un tubo con 10 ml de solución salina estéril (suero fisiológico), controlando la turbidez del inóculo hasta obtener la misma turbidez aproximada que el patrón de Mc Farland 0,5, la cual fue diluida a fin de obtener una suspensión de trabajo de aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  y  $1-2 \times 10^4$  UCF/mL respectivamente (según cepa a experimentar).
- Se procedió a realizar diluciones del aceite esencial de hierba luisa obteniendo varias concentraciones con los tubos esterilizados preparados previamente conteniendo suero fisiológico estéril y con ayuda del dimetilsulfóxido como disolvente.
- Se preparó previamente tubos esterilizados conteniendo caldo tryptona de soya para la adición de las diferentes concentraciones del aceite

esencial y una de las cepas (*Escherichia coli* ATCC 25922 o *Staphylococcus aureus*) en estudio. Se procede a realizar diluciones sucesivas para cada concentración realizada, luego de estas diluciones se saca un inóculo y se siembra por incorporación en placas Petri esterilizadas conteniendo el agar, homogenizando cuidadosamente.

- Después de la siembra, las placas fueron colocadas en la estufa y llevadas a incubar a 37 °C por un período de 24 horas, cada placa fue examinada y se procedió al conteo con ayuda del contador de colonias.

#### **4.6. Procesamiento estadístico y análisis de datos**

Para la evaluación del efecto del tamaño de partícula sobre el rendimiento; se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), para lo cual se usó el programa Minitab.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Obtención del aceite esencial de hierba luisa

En el proceso de la obtención del aceite esencial de hierba luisa, se trabajó con hojas frescas a ciertas condiciones, estas se muestran en la tabla N° 5.1.

**TABLA N° 5.1  
CONDICIONES DE OBTENCIÓN**

CONDICIONES DE TRABAJO	EXPERIENCIAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Tamaño de partícula(cm)</i>	3	3	3	3	5	5	5	5
<i>volumen de agua(L)</i>	5	5	6	6	5	5	6	6
<i>Cantidad de materia(kg)</i>	1,5	2	1,5	2	1,5	2	1,5	2
<i>Tiempo de operación(min)</i>	30	31	30	30	30	31	29	32
<i>Temperatura de destilación(°C)</i>	100	100	99	100	100	98	100	100
<i>Flujo de vapor (ml/min)</i>	17,11	19,04	18,11	19,07	16,45	17,79	19,10	16,35

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 5.2 realizamos una comparación del rendimiento teniendo en cuenta nuestras variables independientes, en las diferentes experiencias realizadas.

**TABLA N°5.2**  
**VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA OBTENCIÓN DE ACEITE**  
**ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

Número de experiencia	Variables			Vector respuesta	
	Tamaño de partícula (cm)	Volumen de agua (L)	Cantidad de materia (kg)	Rendimiento (%)	Tiempo de destilación (min)
1	3	5	1,5	0,373	11
2	3	5	2	0,363	11
3	3	6	1,5	0,378	10
4	3	6	2	0,387	10
5	5	5	1,5	0,350	10
6	5	5	2	0,361	10
7	5	6	1,5	0,350	9
8	5	6	2	0,356	11

Fuente: Elaboración propia

Para evaluar el rendimiento de obtención del aceite, en función al tamaño de partícula, se presenta la tabla N° 5.3 y en las gráficas N° 5.1 y N°5.2 los resultados para el tamaño de partícula de 3 cm y 5 cm.

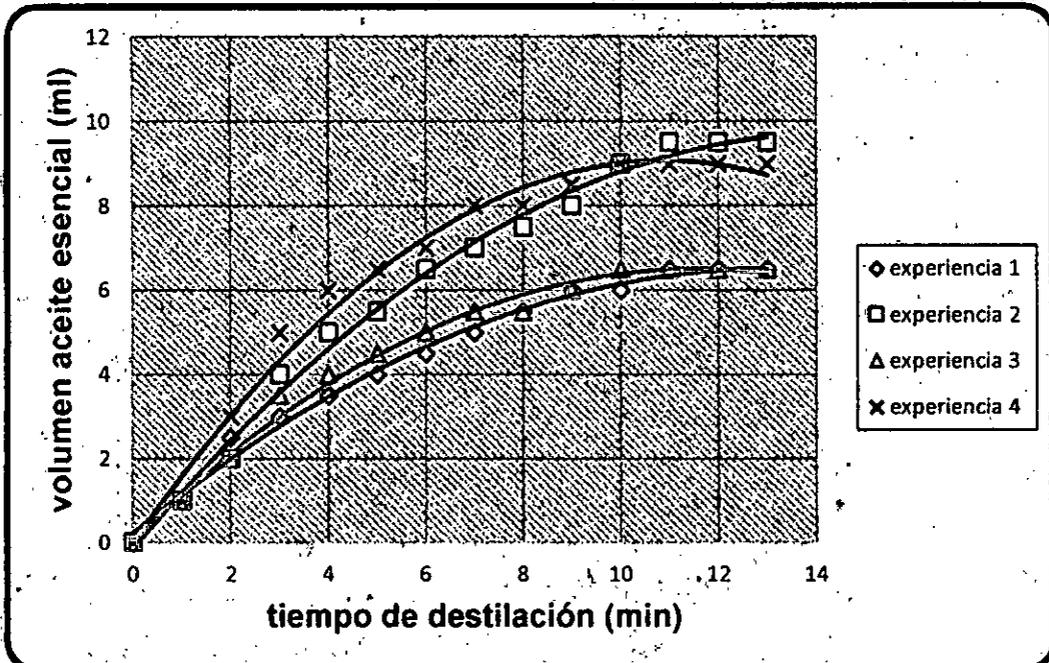
**TABLA N°5.3**  
**RENDIMIENTO PARA PARTÍCULAS DE TAMAÑO 3cm Y 5cm**

Tamaño de partícula 3 cm		Tamaño de partícula 5 cm	
Experiencia	%Rendimiento	Experiencia	%Rendimiento
1	0,373	5	0,350
2	0,363	6	0,361
3	0,378	7	0,350
4	0,387	8	0,356
promedio	0,375	promedio	0,354

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°5.1

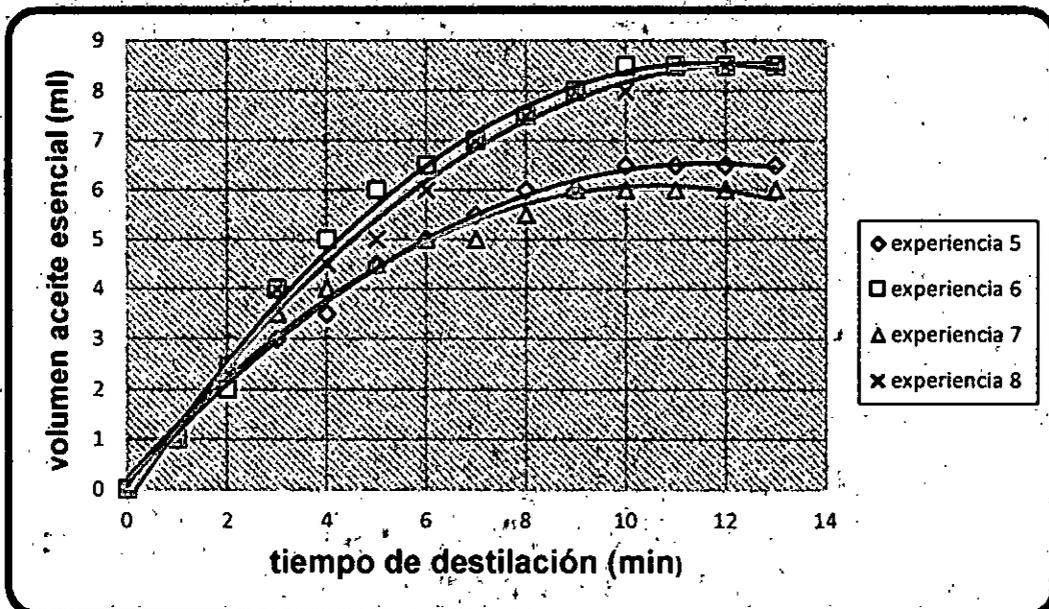
CURVA DE DESTILACIÓN PARA PARTÍCULA DE TAMAÑO 3cm



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°5.2

CURVA DE DESTILACIÓN PARA PARTÍCULA DE TAMAÑO 5 cm



Fuente: Elaboración propia

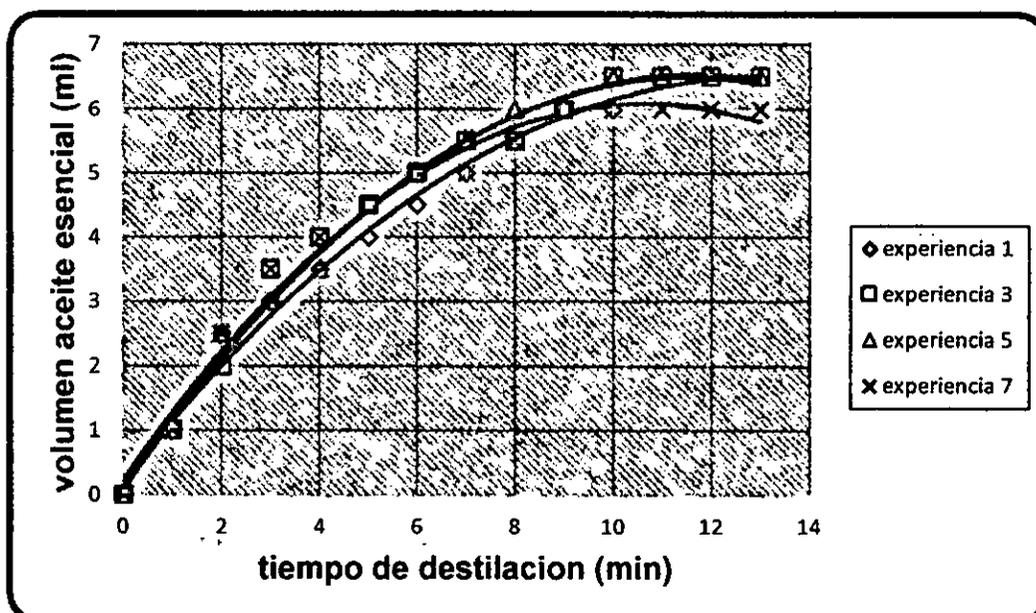
Para evaluar el rendimiento de obtención del aceite, en función a la cantidad de materia, se presenta la tabla N° 5.4 y en las gráficas N° 5.3 y N°5.4 los resultados para cantidad de materia de 1,5 kg y 2 kg.

**TABLA N° 5.4**  
**RENDIMIENTO PARA CANTIDAD DE MATERIA 1,5 kg y 2 kg**

Cantidad de materia 1.5kg		Cantidad de materia 2 kg	
Experiencia	%Rendimiento	Experiencia	%Rendimiento
1	0,373	2	0,363
3	0,378	4	0,387
5	0,350	6	0,361
7	0,350	8	0,356
promedio	0,363	promedio	0,367

Fuente: Elaboración propia

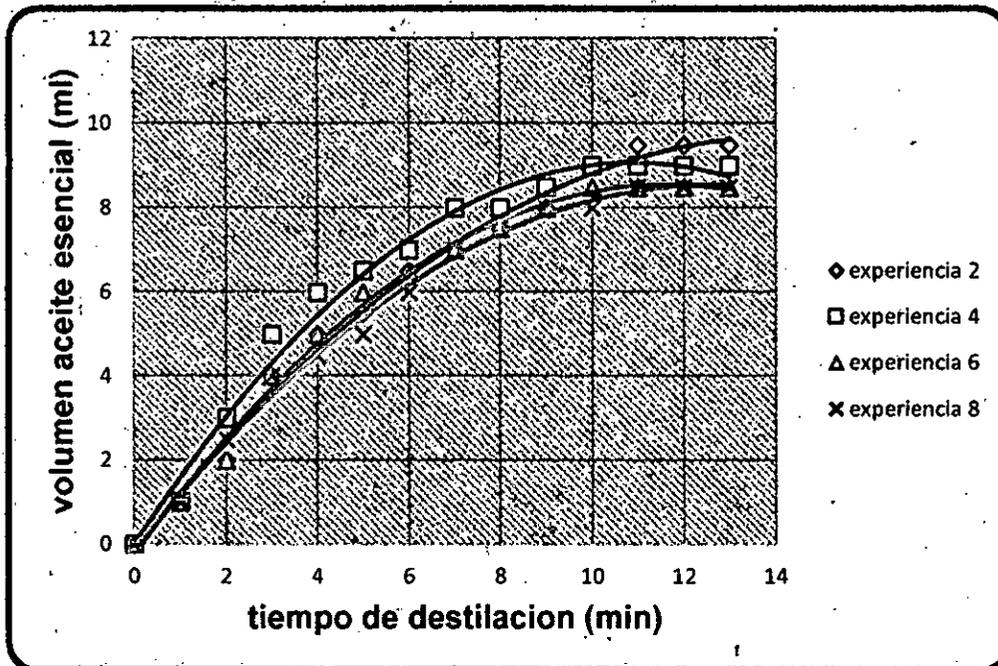
**GRÁFICA N°5.3**  
**CURVA DE DESTILACIÓN PARA CANTIDAD DE MATERIA 1,5 kg**



Fuente: Elaboración propia

**GRÁFICA N°5.4**

**CURVA DE DESTILACIÓN PARA CANTIDAD DE MATERIA 2 kg**



Fuente :Elaboración propia

Para evaluar el rendimiento de obtención del aceite, en función al volumen de agua, se presenta la tabla N° 5.5 y en las gráficas N° 5.5 y N°5.6 los resultados para volumen de agua de 5 L y 6L

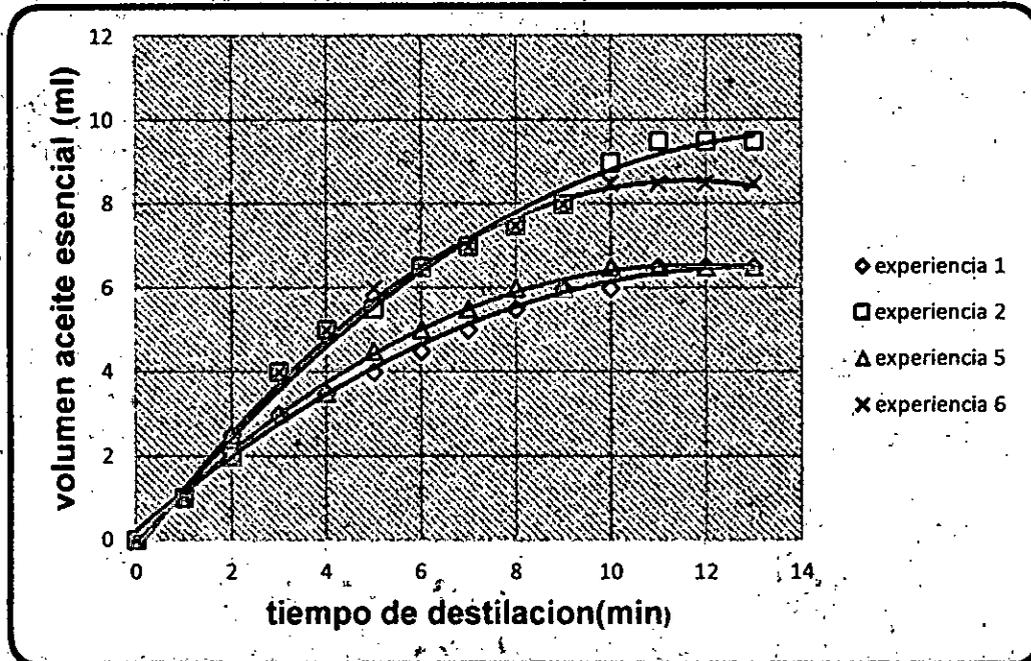
**TABLA N°5.5**  
**RENDIMIENTO PARA VOLUMEN DE AGUA 5 L y 6 L**

volumen de agua 5L		volumen de agua 6L	
Experiencia	%Rendimiento	Experiencia	%Rendimiento
1	0,373	3	0,378
2	0,362	4	0,387
5	0,350	7	0,350
6	0,361	8	0,356
promedio	0,362	promedio	0,368

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°5.5

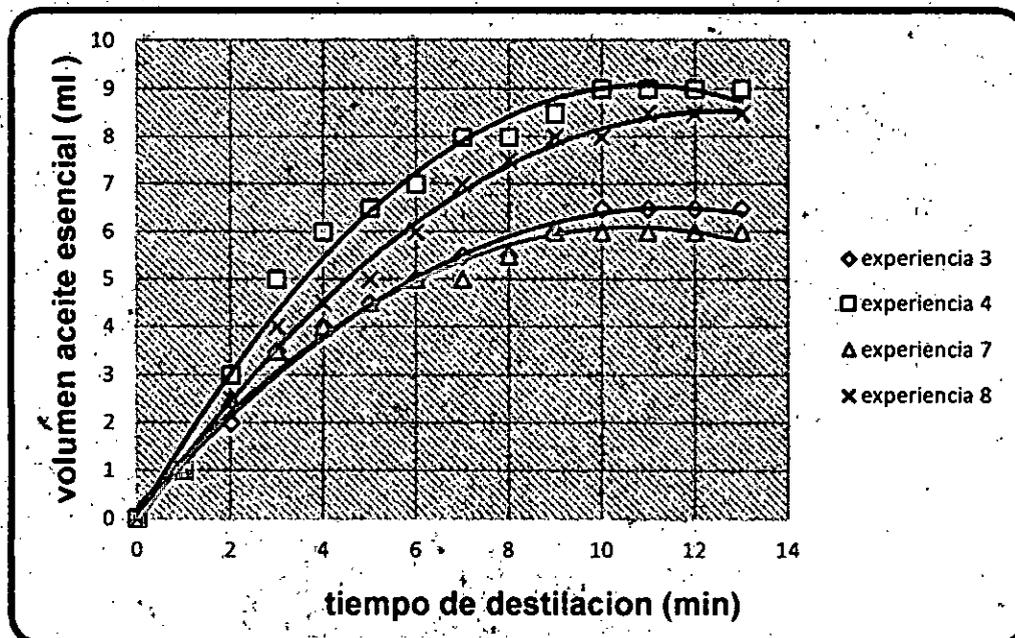
CURVA DE DESTILACIÓN PARA VOLUMEN DE AGUA 5 L



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°5.6

CURVA DE DESTILACIÓN PARA VOLUMEN DE AGUA 6 L



Fuente: Elaboración propia

## 5.2. Caracterización del aceite esencial obtenido

### 5.2.1. Caracterización física

- **Determinación y comparación de la Densidad Relativa**

En la Tabla N° 5.6 se presentan los resultados de la densidad relativa obtenidos en el laboratorio de la FIQ-UNAC y los de un laboratorio certificado:

**TABLA N° 5.6**  
**DENSIDAD RELATIVA DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**

Experiencia	Laboratorio Facultad Ingeniería Química	Laboratorio certificado según NTP-ISO 279:2011
N°1	0,889	0,887
N°2	0,881	
N°3	0,882	
Promedio	0,884	

Fuente : Elaboración propia

- **Determinación y comparación del Índice de refracción**

En la tabla N° 5.7 se presentan los resultados de los índices de refracción obtenidos en el laboratorio de la FIQ-UNAC y los de un laboratorio certificado:

**TABLA N° 5.7**

**ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**

<b>Experiencia</b>	<b>Laboratorio Facultad Ingeniería Química</b>	<b>Laboratorio certificado según NTP-ISO 280:2011</b>
<b>N°1</b>	<b>1,485</b>	<b>1,48</b>
<b>N°2</b>	<b>1,483</b>	
<b>N°3</b>	<b>1,486</b>	
<b>Promedio</b>	<b>1,484</b>	

Fuente: Elaboración propia

**5.2.2. Caracterización química.**

- **Determinación del Índice de yodo**

En la tabla N° 5.8 se presentan los resultados de los índices de yodo obtenidos de un laboratorio certificado:

**TABLA N°5.8**

**ÍNDICE DE YODO DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

<b>Laboratorio certificado según NTP-ISO 3961:2012</b>	<b>g de yodo absorbido /100 g de muestra</b>
	<b>2,40</b>

Fuente : Elaboración propia

- **Determinación del Índice de acidez**

En la tabla N° 5.9 se presentan los resultados de los índices de yodo obtenidos de un laboratorio certificado:

**TABLA N°5.9**

**ÍNDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

<b>Laboratorio certificado según NTP 319 085:1974</b>	<b>mg KOH/g de aceite</b>
	<b>2,219</b>

Fuente : Elaboración propia

- **Determinación del Índice de saponificación**

En la tabla N° 5.10 se presentan los resultados de los índices de saponificación obtenidos de un laboratorio certificado:

**TABLA N°5.10**

**ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

<b>Laboratorio certificado según NTP-ISO 3657: 2016</b>	<b>mg KOH/g de aceite</b>
	<b>6,752</b>

Fuente: Elaboración propia

- **Determinación del Índice de éster**

En la tabla N° 5.11 se presentan los resultados de los índices de éster obtenidos de un laboratorio certificado:

**TABLA N°5.11**

**ÍNDICE DE ÉSTER DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**

<b>Laboratorio certificado según NTP 319 088:1974</b>	<b>mg KOH/g de aceite</b>
	<b>4,534</b>

Fuente : Elaboración propia

**5.2.3. Identificación y Cuantificación de los componentes del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) por Cromatografía de Gases acopiada a Espectrometría de Masas.**

En la tabla 5.12 podemos observar el porcentaje de los componentes mayoritarios proporcionados por el equipo GC-MS

**TABLA N°5.12  
RESULTADOS DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS  
PROPORCIONADOS POR EL EQUIPO GC-MS**

Número	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	% en la muestra
1	$\beta$ - mirceno	15,15	14,23
2	$\beta$ - citral (Neral)	23,04	29,61
3	$\alpha$ - citral (Geranial)	23,89	37,88

Fuente: Elaboración propia

En la figura 5.1 se observa el cromatograma del aceite esencial de hierba luisa, cada componente necesitó un tiempo de retención para eluir del cromatógrafo de gases; esto se debe a que cada tiempo de retención es característico para cada molécula, lo que permite obtener un mayor grado de seguridad al momento de identificar las sustancias.

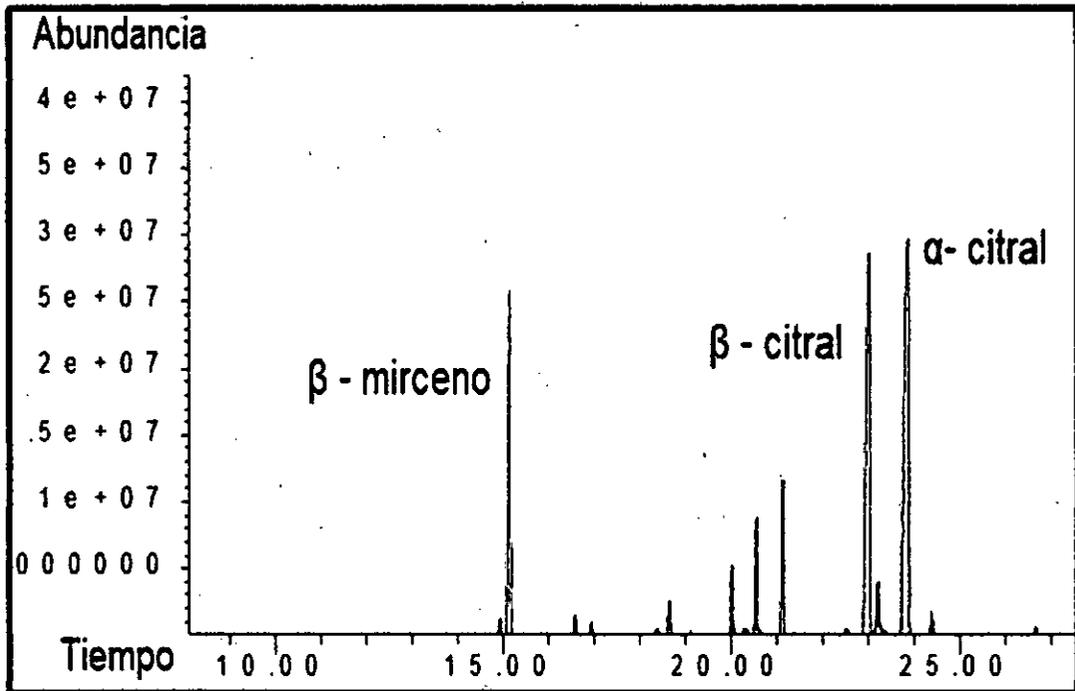
Los tiempos de retención de cada compuesto se detallan a continuación:

Tiempo de retención Geranial (37,88%) = 23,89 min.

Tiempo de retención Neral (29,61%) = 23,04min.

Tiempo de retención  $\beta$  - mirceno (14,23 %) =15,15 min.

**FIGURA N° 5.1**  
**CROMATOGRAMA GC-MS DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA**  
**LUISA**



Fuente: Unidad de investigación en productos naturales - UPCH

### 5.3. Actividad antibacteriana del aceite obtenido

#### 5.3.1. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria

##### a.-*Escherichia coli* ATCC 25922:

Se realizó una batería de 4 concentraciones más un control, cuyos resultados se muestran en la tabla N° 5.13, tabla N°5.14 y en la gráfica N°5.7.

**TABLA N° 5.13**

**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *ESCHERICHIA COLI* FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**

Tiempo (horas)	UFC/mL				
	Control	Concentraciones experimentales de mL de aceite esencial/ 10 mL medio cultivo			
		0,005	0,01	0,02	0,04
0	1900000	379000	263027	604750	260000
0,52	6760830	933254	128825	102329	33113
1,40	14125375	2454709	288403	9120	3802
1,95	23988329	3311311	301995	5370	1259
2,20	22800004	574700	288403	5500	911
5,47	72443596	26786500	316228	20238000	916
7,40	81283052	1744000	31622777	3445333	10471

Fuente: Elaboración propia

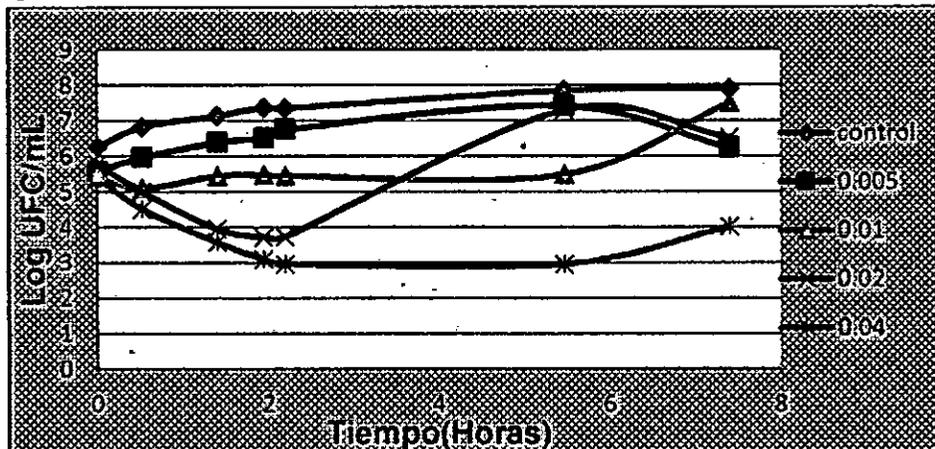
**TABLA N° 5.14**

**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL *ESCHERICHIA COLI***

Tiempo (horas)	Log UFC/mL				
	control	Concentraciones experimentales de mL de aceite esencial/ 10 mL medio cultivo			
		0,005	0,01	0,02	0,04
0	6,27	5,5	5,42	5,78	5,41
0,52	6,83	5,97	5,11	5,01	4,52
1,40	7,15	6,39	5,46	3,96	3,58
1,95	7,38	6,52	5,48	3,73	3,12
2,20	7,35	6,759	5,46	3,74	2,9
5,47	7,86	7,42	5,5	7,30	2,96
7,40	7,91	6,24	7,5	6,53	4,02

Fuente: Elaboración propia

**GRÁFICA N° 5.7**  
**CURVA DE CRECIMIENTO DEL *ESCHERICHIA COLI* A DIFERENTES**  
**CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**



Fuente: Elaboración propia

b.-*Staphylococcus aureus* : Se realizó una batería de 4 concentraciones más un control, cuyos resultados se muestran en la siguientes tablas N° 5.15 y 5.16 y en la gráfica N°5.8.

**TABLA N° 5.15**  
**UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *STAPHYLOCOCCUS***  
***AUREUS* FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL**  
**ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**

Tiempo (horas)	UFC/mL				
	Control	Concentraciones experimentales de mL de aceite esencial/ 10 mL medio cultivo			
		0,01	0,02	0,04	0,08
0	63096	78000	61660	66069	57544
4	297000	6607	4677	3090	1820
6	196125000	3311	1549	979	550
8,5	691830971	1738	380	234	141
21	467735141	92	2	0	0
27	561047976	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

**TABLA N° 5.16**

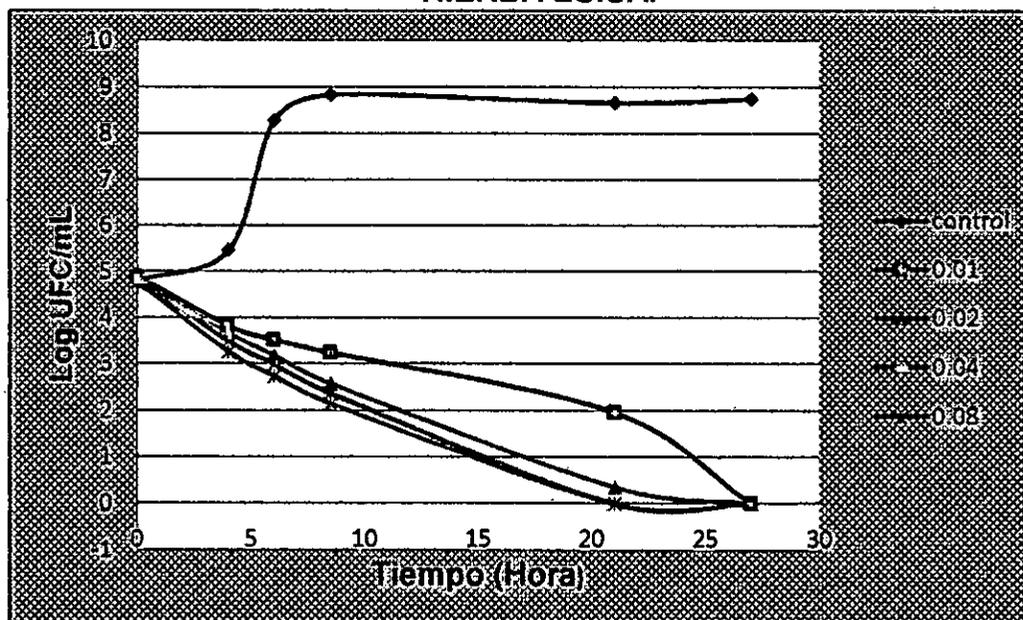
**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tiempo (horas)	Log UFC/mL				
	control	Concentraciones experimentales de mL de aceite esencial/ 10 mL medio cultivo			
		0,01	0,02	0,04	0,08
0	4,80	4,89	4,79	4,82	4,76
4	5,47	3,82	3,67	3,49	3,26
6	8,29	3,52	3,19	2,990	2,74
8,5	8,84	3,24	2,58	2,37	2,15
21	8,67	1,96	0,36	0	0
27	8,74	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia

**GRÁFICA N°5.8**

**CURVA DE CRECIMIENTO DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA.**



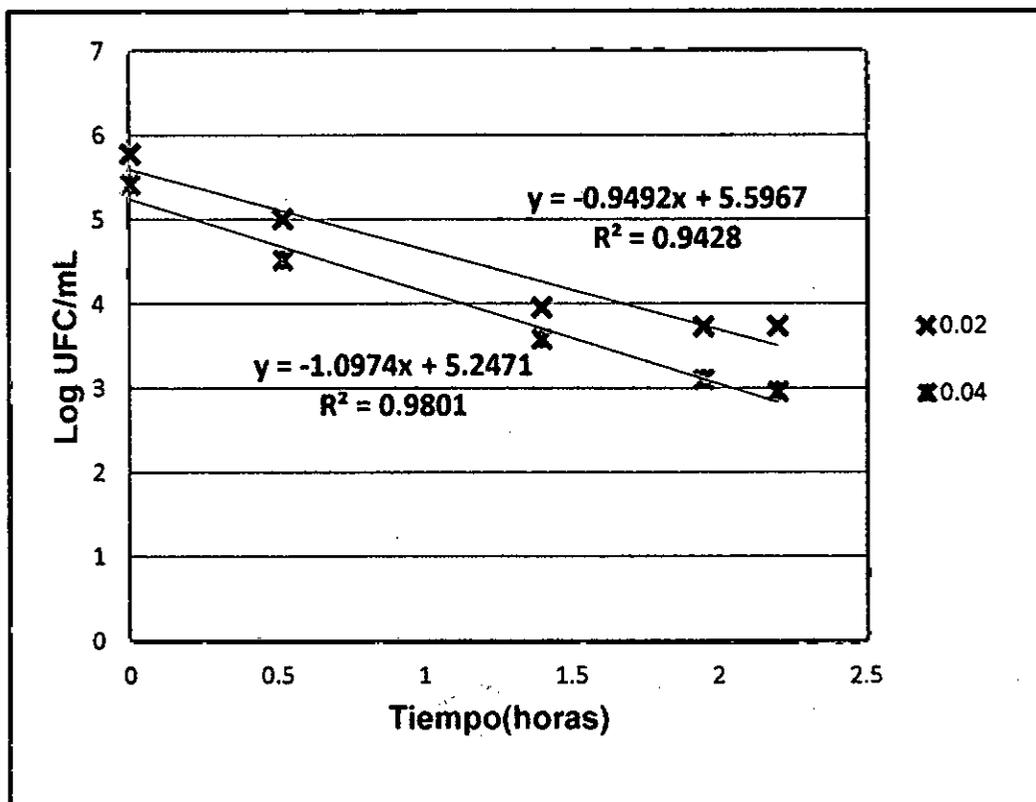
Fuente: Elaboración propia

### 5.3.2. Letalidad y Concentración Mínima inhibitoria (CMI)

#### a.- *Escherichia coli* ATCC 25922

Se presenta los resultados de la letalidad en la gráfica N°5.9

**GRÁFICA N°5.9**  
**LETALIDAD (-K) DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA SOBRE**  
**EL *ESCHERICHIA COLI***



Fuente: Elaboración propia

De las pendientes de la gráfica N°5.9 se obtienen los siguientes resultados en la tabla N°5.17

TABLA N° 5.17

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LETALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA FRENTE AL *ESCHERICHIA COLI*

Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial/ 10 mL de medio cultivo	% Reducción	Letalidad -K(UFC/mL/hora)	R <sup>2</sup>
0,02	99,0905	0,9492	0,9428
0,04	99,9964	1,0974	0,9801

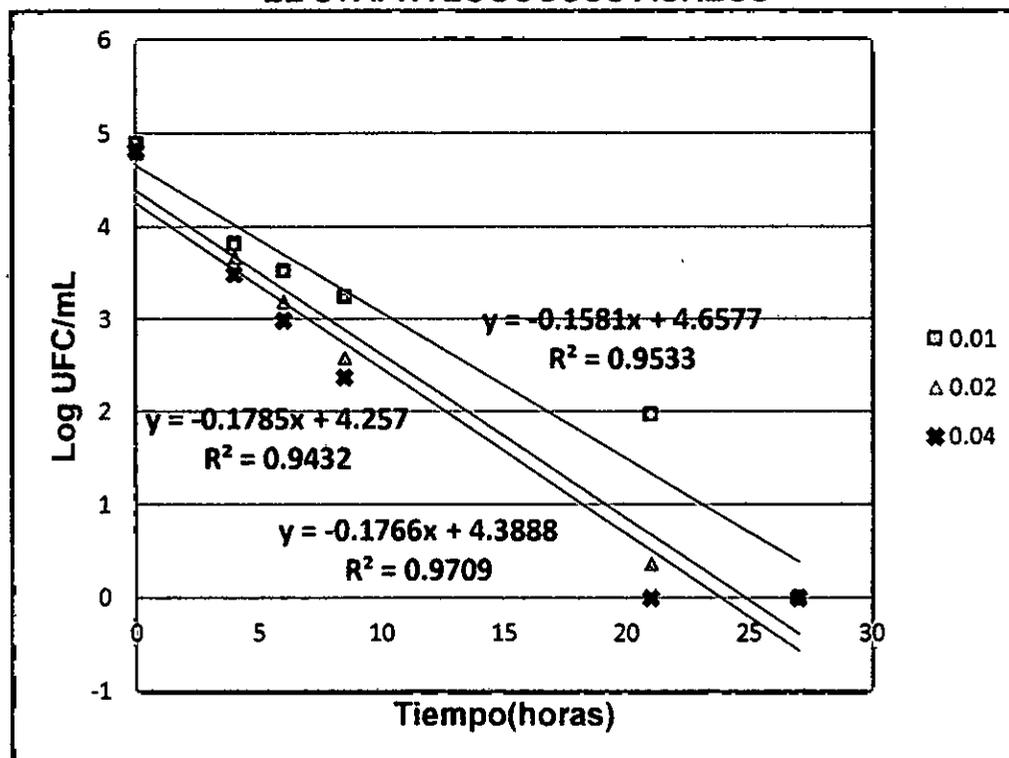
Fuente: Elaboración propia

b.- *Staphylococcus aureus*

Se presenta los resultados de la letalidad en la gráfica N°5.10

GRÁFICA N°5.10

LETALIDAD (-K) DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA SOBRE EL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*



Fuente: Elaboración propia

De las pendientes de la gráfica N°5.10 se obtienen los siguientes resultados en la tabla N°5.18

**TABLA N° 5.18**  
**CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y LETALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA FRENTE AL STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial/ 10 mL de medio cultivo	% Reducción	Letalidad K(UFC/mL/hora)	R <sup>2</sup>
0,01	99,8820	0,1581	0,9533
0,02	99,9962	0,1766	0,9709

Fuente: Elaboración propia

#### 5.4. Para el procesamiento estadístico y análisis de datos

Se efectuó los análisis de varianza para el caso rendimiento vs. tamaño de partícula.

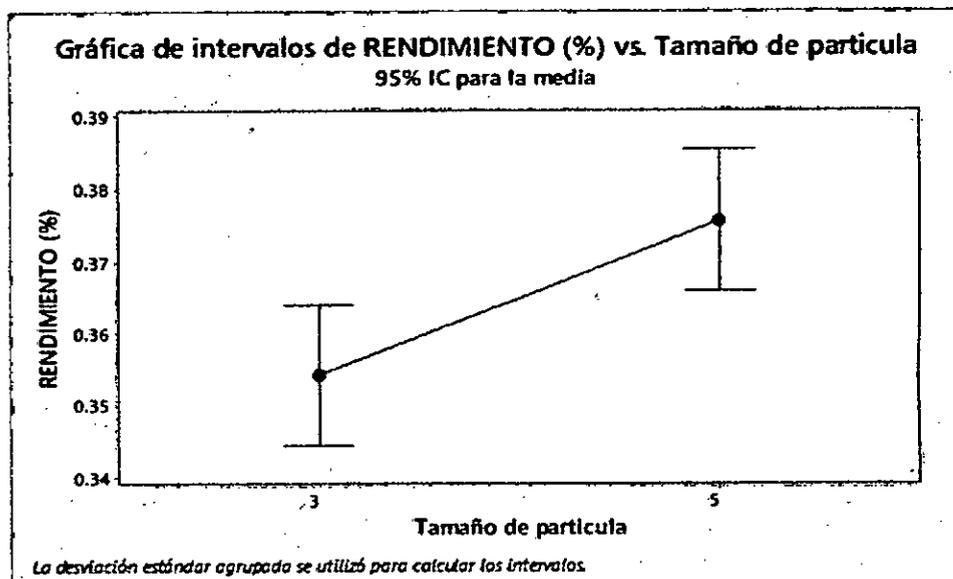
**FIGURA N°5.2**  
**ANOVA UNIDIRECCIONAL: RENDIMIENTO (%) VS. TAMAÑO DE PARTÍCULA**

<b>Método</b>		
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales	
Hipótesis alterna	Por lo menos una es diferente	
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$	
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.		
<b>Información del factor</b>		
<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>	<b>valores</b>
Tamaño de partícula	2	3 ; 5
<b>Análisis de Varianza</b>		

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust	Valor F	Valor P
Tamaño de partícula	1	0.000918	0.000918	14.53	0.009
error	6	0.000379	0.00063		
total	7	0.001297			
Model summary					
	s	R-cuad	R-cuad (adj)	R-cuad (pred)	
	0.0079479	70.78%	65.91%	48.05%	
Medias					
Tamaño de partícula	N	Media	Desv.Est	IC de 95%	
3	4	0.35435	0.00521	(0.34463; 0.36407)	
5	4	0.37578	0.00996	(0.36605; 0.38550)	
Desv.Est agrupada = 0.00794793					

Fuente: Elaboración propia

### GRÁFICA N°5.11 RENDIMIENTO (%) VS TAMAÑO DE PARTÍCULA



Fuente : Elaboración propia

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. Contrastación de hipótesis con los resultados

#### a.- Hipótesis General:

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo experimental se demostró que el porcentaje de reducción de la carga bacteriana del *Escherichia coli* fue de 99,9964 % y para el *Staphylococcus aureus* es 99,8820%, entonces se determinó una reducción significativa de la carga bacteriana cumpliendo así con la hipótesis general.

#### b.-Hipótesis Especifica:

##### Hipótesis 1

- En la etapa de obtención del aceite esencial se observó; en la tabla N°5.3 que según tamaño de partícula el rendimiento promedio para tamaño de partícula de 3 cm fue de 0,375 % la cual es mayor en comparación con el de tamaño 5 cm donde se obtuvo el 0,354 % , donde se determinó que a menor tamaño de partícula, mayor es el rendimiento esto se debe que hay un mayor contacto con el vapor de agua; en la tabla N°5.4, tenemos que para la cantidad de materia de

2 kg obtuvimos un ligero mayor rendimiento promedio que es 0,367 % en comparación con la cantidad de 1,5 kg . donde obtuvimos 0,363%; en la tabla N°5.5, tenemos que para el volumen de 6L obtuvimos un mayor rendimiento promedio que es 0,368 % ya que con el volumen de 5 L obtuvimos 0,362% , esto demostró que estas condiciones de operación influyen en el rendimiento de la obtención del aceite .

Para evaluar mediante el análisis de varianza (ANOVA), en lo que corresponde al tamaño de partícula se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los tamaños de partículas producen diferencias significativas en el rendimiento al 95% del nivel de confianza, ya que representa un valor F calculado de 14,35 superior al F tabular. Además, se observa que el P-Valor es menor a 0,05 ( $p < 0.05$ )

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo experimental (tabla N°5.2) se estableció que en la obtención del aceite esencial de hierba luisa se tuvo un mayor rendimiento (0,387 %) para las siguientes condiciones: tamaño de partícula 3 cm, volumen de agua 6 litros y cantidad de materia 2 kg.
- Además de la gráfica N°5.1, se observó de las curvas de destilación para tamaño de partícula de 3 cm, que los datos de la experiencia 1 y experiencia 3 tienden a superponerse, así mismo se observó la misma

tendencia en la experiencia 2 y experiencia 4, entonces para estos casos el volumen de agua no es significativo para la velocidad de destilación, dado que se obtiene la misma cantidad de aceite a una determinada velocidad de destilación.

- De la gráfica N°5.2, se puede observar que las curvas de destilación para tamaño de partícula de 5 cm, en la experiencia 6 y experiencia 8 tienden a superponerse, se observa la misma tendencia para la experiencia 5 y experiencia 7, entonces como las curvas son similares, la velocidad de destilación es independiente al volumen de agua utilizada.

De la gráfica N°5.3, se puede observar que las curvas de destilación para la cantidad de materia de 1,5 kg, de la experiencia 1, experiencia 3, experiencia 5 y la experiencia 7 tienden a superponerse, la misma tendencia se puede observar respecto a la gráfica N°5.4 para la cantidad de materia de 2 kg en la experiencia 2, experiencia 4, experiencia 6 y la experiencia 8, entonces el volumen de agua y tamaño de partícula no son significativos para estos casos, se puede determinar que se obtienen la misma cantidad de aceite a una misma velocidad de destilación.

De la gráfica N°5.5, se observó que las curvas de destilación para el volumen de agua de 5 L, de la experiencia 2 y experiencia 6 tienden a superponerse, la misma tendencia se puede observar para la experiencia 1 y experiencia 5, entonces la cantidad de materia no es significativa para estos casos, se puede concluir que obtienen la misma cantidad de aceite a una misma velocidad de destilación

De la gráfica N°5.6, se observó que las curvas de destilación para el volumen de agua de 6 L, de la experiencia 4 y experiencia 8 tienden a superponerse, la misma tendencia se observó para la experiencia 3 y experiencia 7, entonces como las curvas son similares, la velocidad de destilación es independiente a la cantidad de materia utilizada.

- Además según la tabla N°5.1, con los datos obtenidos en la destilación podemos determinar que el tiempo de operación promedio es de 30,37 minutos siendo 29 minutos el mínimo y 32 minutos el máximo, y el promedio de flujo de vapor fue de 17,8775 mL/min, siendo 16,35 ml/min el mínimo y 19,10 mL/min el máximo

## **Hipótesis 2**

- El aceite esencial de hierba luisa analizado por GC-MS, tuvo un perfil cromatográfico similar al detallado en el marco teórico. El compuesto que se encuentra en mayor proporción según la Tabla 5.12 es el

Citral, monoterpeno compuesto por dos isómeros geométricos Geranial ( $\alpha$  - citral) y Neral ( $\beta$  - citral), alcanzando una concentración conjunta de 67,49%. A continuación, aparece el  $\beta$  - mirceno, con una composición de 14,23%. Los 3 compuestos dan en conjunto una composición de 81,72%, mientras que, lo restante pertenece a compuestos con baja composición, entonces se cumple que el componente mayoritario es el citral.

### Hipótesis 3

Se ha determinado que el aceite esencial de hierba luisa tiene propiedades antibacterianas:

- En la tabla N° 5.13 y N° 5.14 se muestran las concentraciones iniciales empleadas para el *Escherichia coli* de la cual se obtiene la gráfica N° 5.7 en donde se observa las curvas de crecimiento o inhibición para cada concentración, se determina que a medida que aumenta la concentración del aceite esencial de hierba luisa disminuye la población inicial, particularmente se observa que para el *Escherichia coli* en la Grafica N° 5.7 a una concentración de aceite esencial de 0,04 mL se tiene una disminución poblacional de manera significativa en 2,2 horas en comparación con las demás.

En la Tabla N° 5.17 para una concentración de aceite esencial de 0,02 mL su reducción poblacional es del 99,090 % mientras que para la concentración de aceite esencial de 0,04 es de 99,9964 % el cual éste último se considera que es el CMI (Concentración mínima inhibitoria) ya que cumple el porcentaje de reducción de 99,9 %. Se observa además en la Grafica N°5.9 y en la Tabla N° 5.17 se observa que la letalidad del aceite esencial de hierba Luisa se incrementa al aumentar la concentración de aceite esencial utilizado.

Según la Tabla N° 5.17 la velocidad de la letalidad es de 1,0974 UFC/mL/hora para la concentración mínima inhibitoria (CMI) encontrada de 0,04 ml aceite esencial de hierba luisa.

- Para el *Staphylococcus aureus* Se observa que en la Grafica N° 5.10 la letalidad ocurre a las 27 horas para todas las concentraciones de aceites empleados, sin embargo se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI ) según la Tabla N° 5.18 a la concentración de 0,01 mL de aceite esencial debido a que reduce la población de *Staphylococcus aureus* a un 99,882% (99,9%) en 21 horas aproximadamente la cual cumple con la reducción del 99,9% de la población bacteriana.

Se manifiesta también en la Grafica N°5.10 y en la Tabla N° 5.18 que la letalidad del aceite esencial de hierba Luisa frente al

*Staphylococcus aureus* se incrementa al aumentar la concentración de aceite esencial utilizado.

Siendo la velocidad de la letalidad con 0,1581 UFC/mL/hora con la concentración de 0,01 ml aceite esencial de hierba luisa.

## 6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares

### Hipótesis general:

- En el estudio realizado por Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO, cuyo trabajo de investigación titulado:

"Componentes antibacterianos en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf" concluyó que los componentes alfa-citral (geranial) y beta-citral (neral) inducen individualmente acción antibacteriana sobre organismos gramnegativos y grampositivos, por lo tanto el aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor redujo la carga bacteriana significativamente debido a la actividad antibacteriana de sus componentes, aquello además se determinó experimentalmente hallando su letalidad y respectivas concentraciones mínimas inhibitorias para cada bacteria.

## **Hipótesis específicas:**

### **Hipótesis 1**

- En el informe realizado por la Ing. Viorica Stanciuc S. titulado "Estudio de la extracción y separación del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* Stapf)" las condiciones de operación a nivel laboratorio que realizó fueron las siguientes: Tamaño de hojas secadas al ambiente :1 a 2 cm; masa de hojas: 3,7 a 4,3 kg; Tiempo de operación: 40 a 60 minutos; volumen de agua:4 a 4.5 L obteniendo un rendimiento entre 0,40 y 0,51%, en la presente tesis las condiciones de operación que se realizó fueron: tamaño de hoja fresca: 3 y 5 cm, cantidad de materia prima: 1,5 y 2 kg; tiempo de operación: 29 a 32 minutos; volumen de agua: 5 y 6 L obteniendo un rendimiento promedio de 0,375 y 0,354 % respectivamente, por lo tanto se determinó que las condiciones de operación si influyen en el rendimiento de la obtención del aceite de hierba luisa, la cual fue menor en nuestra experiencia debido principalmente al tamaño de la muestra y al uso de hojas frescas.

### **Hipótesis 2**

- Según la norma ISO 3217: 1974 Oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) señala que el aceite esencial de hierba Luisa debe tener una

densidad relativa entre 0,872 - 0,897, en el caso del aceite esencial en estudio se obtuvo una densidad de 0,887, por lo que se encuentra dentro de los parámetros normales de calidad establecidos para los aceites esenciales.

Esta norma indica además que el aceite debe tener un índice de refracción entre 1,4830 – 1,4890, en el caso de la muestra tiene un valor de 1,484, dicho resultado se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

Presenta además el análisis de aceite de hierba luisa resultados de índice de yodo de 2,40 g de yodo absorbido/100 g de muestra, índice de acidez de 2,219 mg KOH/g de aceite, índice de saponificación de 6,752 mg KOH/g de aceite y un índice de ester de 4,534 mg KOH/g de aceite.

Distintos estudios y referencias bibliográficas muestran que el componente mayoritario del aceite esencial de hierba luisa es el Citral con una concentración entre 70% – 85% (Castro, J y Bedoya, I, 2006) , de igual manera Guenther (1963) citado por Reeves (1975) indica que el porcentaje varía entre 65 y 85 % dependiendo de la variedad de hierba luisa. Por lo que se concluye que el porcentaje de citral obtenido (67,49%) en la tesis corrobora el % alto de este componente contrastado con estos estudios, además considerando que el tiempo de

almacenamiento del aceite de hierba luisa influye en el contenido final de citral, la cual disminuye con el transcurrir de los días.

### Hipótesis 3

- La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial obtenido de hierba luisa frente *Escherichia coli* fue de 0,04 ml de aceite / 10 mL de medio de cultivo ,cuyo resultado confirmó el efecto antibacteriano significativo que posee frente a esta bacteria Gram negativa, lo que se contrastó con el estudio realizado por el Lic.Quintana Rojas (2014) titulado " Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *citrus limon* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* "cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 0,80 µLde aceite/mL frente a esta bacteria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenido del aceite esencial de hierba luisa frente al *Staphylococcus aureus* fue de 0,01 mL de aceite / 10 mL de medio de cultivo, cuyo resultado también confirmó el efecto antibacteriano significativo que posee frente a esta bacteria Gram positiva, lo que se contrastó con el estudio realizado por el Lic.Quintana Rojas (2014) titulado " Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *citrus limon* en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* " cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 0,10 µL de aceite/mL frente a esta bacteria.

## VII. CONCLUSIONES

1. Al analizar las características físicas y químicas del aceite esencial de hierba luisa, según la norma ISO 3217: 1974 Oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*), se determinó que el aceite se encuentra dentro de los parámetros normales de calidad obteniendo los siguientes resultados: densidad relativa de 0,884, índice de refracción de 1,484, además parámetros como índice de yodo de 2,40 g yodo absorbido/100 g de aceite, índice de acidez de 2,219, índice de éster de 4,534 e índice de saponificación de 6,752 mg KOH/g de aceite, además se determinó la concentración mínima inhibitoria, que fue de 0,04 ml de aceite esencial para *Esecherichia coli* y 0,01 ml para *Staphylococcus aureus*.
2. Se determinó las siguientes condiciones para la obtención de aceite esencial de hierba luisa: para un tamaño de 3 cm de hojas, un volumen de agua de 6 L y una cantidad de masa de 2 kg, se obtuvo un rendimiento de 0,3875 % que es mayor en comparación con las otras condiciones, determinando así que éstas influyen de manera significativa en el proceso de obtención.
3. Se determinó que el componente principal según el análisis cromatográfico de gases es: el Citral (67,49%), compuesto por dos

isómeros  $\alpha$  – citral (neral) y  $\beta$  – citral (geranial), con una composición de 29,61 % y 37,88 % respectivamente, seguida del  $\beta$  - mirceno, con una composición de 14,23%.

4. De acuerdo a los ensayos microbiológicos realizados se determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, conformada por sus concentraciones mínimas inhibitorias que son de 0,04 y 0,01 ml de aceite respectivamente (en 10 mL de medio de cultivo), y sus letalidades que son 1,0974 y 0,1581 UFC/mL/hora respectivamente, por lo tanto el aceite esencial de hierba luisa puede ser destinado como un producto antibacteriano debido a la actividad antibacteriana que posee debido a los diferentes principios activos presentes, principalmente por el componente mayoritario: el citral.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda, debido a las múltiples aplicaciones que se le da al aceite de hierba luisa, darle un valor agregado, como, por ejemplo: aditivo natural en la elaboración de artículos de limpieza o de aseo personal como desinfectantes, jabones, etc. debido a su efecto antibacteriano, para ello se deben realizar más pruebas experimentales.
2. Se recomienda empezar la búsqueda de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de más microorganismos evaluando diferentes concentraciones de inhibición y letalidad ya que hay diversas cepas de mucha importancia en la salud pública.
3. Se recomienda experimentar con hojas secadas al ambiente o en estufa para conocer la influencia de la humedad de las hojas en el rendimiento del aceite esencial de hierba luisa.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALZAMORA, Libertad; MORALES, Liliana; ARMAS, Lourdes, FERNÁNDEZ, Gilma. **Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas.** *Anales de la Facultad de Medicina.* Vol 62: 156 a 161. 2001.
2. ARMIJO J; VICUÑA, E; ROMERO, P; CONDORHUAMAN, C; HILARIO, B. **Modelamiento y Simulación del Proceso de Extracción de Aceites Esenciales Mediante la Destilación por Arrastre con Vapor** *Revista Peruana de Ingeniería Química:* 19 a 27. Vol. 15. N° 2. 2012.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, INC. **Official Methods Of Analysis.** 14th Edition.
4. BONEV , HOOPER **Principios de evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos mediante el método de difusión en agar,** *Quimioterapia antimicrobiana.* Vol 61: 1 a 6. Junio 2008.
5. BORJA SIHUINTA, F. **Actividad Antibacteriana y Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial del *Cymbopogon citratus* Frente a *Streptococcus mutans* in Vitro.** Tesis. Lima, Perú. Universidad Nacional Federico Villarreal. 2007.

6. BRACK EGG, Antonio. **Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú**. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. PNUD. Junio 1999.
7. BRUNETON, Jean. **Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales**. 2da Edición. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 2001.
8. CAIRO, María, Ángel. **Aceite esencial a partir de la Corteza del Limón (*Citrus limonium*)**. Tesis1997.
9. CAMACHO MARTÍNEZ, H. **Caracterización Fisicoquímica del Aceite Esencial de la Muña (*Minthostachys setosa*) y su Estudio Antibacteriano**. Tesis. Callao, Perú. Universidad nacional del Callao. 2011.
10. CARRASCO E. GARCÍA, GARCÍA GIMENO **Estudiar los límites del crecimiento y el tiempo subsiguiente al crecimiento de serotipos patogénicos de *Escherichia coli***, Microbiología Alimentaria. 2009.
11. CASTRO BETANCUR, J; BEDOYA GÓMEZ, I. **Aislamiento y Epoxidación con Dimetildioxirano ce los Constituyentes Mayoritarios de los Aceites Esenciales de *Tagetes lucida***,

- Cymbopogon citratus*, *Lippia alba* y *Eucalyptus citriodora*. Tesis.**  
Pereira, Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. 2011.
12. DAMIAN, P; DAMIAN, K. **Utilización de los Aceites Esenciales para el bienestar físico y emocional.** México D.F: Étoile S.A. 1996.
  13. DAVIDSON, P.M; BRANEN, A.L. (Eds.). **Antimicrobials in Foods.** New York. Marcel Dekker, Inc. 1993.
  14. HENDRICKS BERGEY , DAVID , **Determinación bacteriológica,** Pensilvania. Novena edición .1992.
  15. FONT QUER, Pío. **Diccionario de Botánica.** Barcelona. Ediciones Península S.A. 2da Edición. 2001.
  16. GAGAN SHAH; RICHA SHRI; VIVEK PANCHAL; NARENDER SHARMA; BHARPUR SINGH; MANN A. S. **Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass).** *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* Vol 2 (1): 3–8. Marzo 2011.
  17. GUERRA ORDOÑEZ, Martha, RODRIGUEZ JORGE, Mayra, GARCÍA SIMÓN, Gastón. **Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial y Crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf.** Centro de

Investigación y Desarrollo de Medicamentos. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2004.

18. HOLLEY, R.A; PATEL, D. **Improvement of Shelflife and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials.** *Food Microbiology*. Vol. 22: 273–292. Winnipeg Canadá. 2005.
19. LEWIS, Richard J. **Hawley Diccionario de Química y Productos Químicos.** Editorial Omega. Nueva Edición. Barcelona. 1992.
20. LOCK DE UGAZ, Olga. **Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales.** Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1988.
21. MADIGAN, M. MARTINKO, J. DUNLAP, P. CLARK, D. **Brock Biología de los Microorganismos.** 12a Edición. Editorial Pearson.
22. MÁRQUEZ, L. **Extracción del Aceite Esencial de Mandarina (*Citrus reticulata*) Utilizando Dióxido de Carbono en Condición Supercrítica como Solvente.** Tesis. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2003.

23. MARTÍNEZ, A. **Aceites esenciales.** Colombia, Universidad de Antioquia. 2003.
24. MAYANQUER CHUGA, S; SALAZAR MORA, A **Obtención de Aceites Esenciales de Cedrón (*Aloysia triphylla*), Sunfo (*Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), en un Alambique Tipo Cachimbo por Cohobación.** Tesis. Ibarra, Ecuador. Universidad Técnica del Norte. Tesis. 2009.
25. MAZZONI, M. **¿ Qué es la Aromaterapia ?.** Argentina. Editorial Kier. 2002.
26. MEZA ANGOS, K; VARGAS DUQUE, G. **Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro del Aceite Esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) Poaceae en una Formulación Cosmética con Finalidad Antiacnéica.** Tesis. Quito, Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. 2013.
27. MISHRA, A.K; DUBEY, N.K; **Evaluation of Some Essential Oils For their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities.** *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 60. (4): 1101-1 1.Abril 1994.

28. NAIM F, MESSIER S, SAUCIER L, PIETTE G **Postprocesamiento**  
**Desafío de digestión in vitro para evaluar la supervivencia de**  
**Escherichia coli O157: H7 en salchicha seca fermentada ,**  
Microbiología aplicada al medio ambiente Vol1: 6637 a 6642.
29. ONAWUNMI GO, YISAK WA, OGUNLANA EO. **Componentes**  
**antibacterianos en el aceite esencial de Cymbopogon citratus**  
**(DC.) Stapf. 1984.**
30. ORTIZ VARGAS, Nicolás; BASUALDO MONTES, Sabino. **Estudio**  
**Experimental de Extracción de Aceite Esencial de Hierba Luisa**  
**por Arrastre de Vapor a Nivel de Planta Piloto. Tesis. Universidad**  
Nacional Mayor de San Marcos. 1988.
31. PALACIOS AMBROCIO, A; CASTILLO MARTINEZ, E. **Modelamiento**  
**de Extracción del Aceite Esencial de *Aloysia citriodora* y *Schinus***  
***molle*. Rev. Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación Vol. 2. N° 2.**  
Diciembre, 2015.
32. PEREDO, H; PALOU, E; LÓPEZ, A. **Aceites esenciales: métodos**  
**de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. Vol 3 (1):**  
24 a 32. 2009.

33. REYES – JURADO, F; PALOU, E; LÓPEZ MALO, A. **Métodos de Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y de Determinación de los Componentes Químicos de los Aceites Esenciales.** *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* Vol. 8. N° 1: 68 a 78. 2014.
34. REEVES , D , **Estudio de la extracción como almacenaje y elaboración de bebidas gaseosas con aceite esencial de hierba luisa.** Tesis . UNAM , Lima . 1975.
35. QUINTANA ROJAS , ANTHONY, **Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de Citrus limón en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*,** Tesis Trujillo .Universidad Nacional de Trujillo. 2014.
36. SANTOS, C. **Evaluación del Rendimiento de Aceite Esencial de Hinojo (*Foeniculum vulgare miller*) Procedente de dos Niveles Altitudinales de Guatemala.** Tesis. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2006.
37. STASHENKO, ELENA. **Aceites Esenciales.** Bucamaranga – Santander. Universidad Industrial de Santander División de Publicaciones. 1ra Edición. Octubre 2009.

38. Stanciuc Vioria. **Estudio de la extracción y separación del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon Citratus Stapf*)** , Informe, Callao. Universidad Nacional del Callao. 1999.
39. STEPHEN J. CAVALIERI, **Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana**. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington, 2005.
40. TREASE, G.E; EVANS, W.G. **Tratado de Farmacognosia**. México. Nueva editorial Interamericana. 12 Edición. 1987.
41. WILKINSON, J.F. **Introducción a la Microbiología**. Madrid España. H. Blume Ediciones. 1ra edición. 1976.

#### **PÁGINAS WEB**

1. FUNDACIÓN CHANKUAP. **Ficha Técnica: Aceite Esencial hierba luisa**. Disponible en: <http://ikiam.com.ec/wp-content/uploads/2014/02/FICHA-T%C3%89CNICA-AE-HIERBA-LUISA.pdf>. Consultado el: 06 de Abril del 2017.
2. GONZÁLEZ BARRALES, M. **Medicina Tradicional, Té Limón (*Cymbopogon citratus Stapf*)**. 2006. Disponible en:

[www.tlahui.com/medic/medic21/telimon.htm](http://www.tlahui.com/medic/medic21/telimon.htm). Artículo web. Consultado el 08 de Marzo del 2017.

3. **INKAPLUS SAC. Materias primas: Hierba luisa.** Disponible en: [www.inkaplus.com/media/web/pdf/Hierbaluisa.pdf](http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Hierbaluisa.pdf). Artículo web. Consultado el: 06 de Abril del 2017.

4. **UNICASH. Cepario UNICASH.** Disponible en: [www.cepariunicach.wordpress.com/2014/09/19/escherichia-coli/](http://www.cepariunicach.wordpress.com/2014/09/19/escherichia-coli/) Artículo web. Consultado el: 08 de julio del 2017.

# **ANEXOS**

**MATRIZ DE CONSISTENCIA**  
**“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA**  
**(*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) OBTENIDO POR EL MÉTODO DE ARRASTRE CON VAPOR**

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles son las características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.	Determinar las características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.	El aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor reducen la carga bacteriana significativamente debido a la actividad antibacteriana de sus componentes.	Y: Características físicas, químicas y la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Densidad</li> <li>• Índice de yodo</li> <li>• Índice de acidez</li> <li>• Índice de saponificación</li> <li>• Numero de esteres</li> <li>• Índice de refracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• g/ml</li> <li>• g iodo absorbido/10 0g de muestra</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• mg KOH/g aceite</li> <li>• adimensional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis experimental</li> </ul>
SUB – PROBLEMA	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles deben ser las condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor?	Determinar las condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor.	Las condiciones de operación, así como el tamaño de la hoja de hierba luisa y la volumen de agua, cantidad de materia utilizados influye en el rendimiento de la obtención del aceite.	X <sub>1</sub> : Condiciones para la obtención del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), por el método de arrastre con vapor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño de muestra</li> <li>• Cantidad de materia</li> <li>• Volumen de agua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cm</li> <li>• kg</li> <li>• l</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medición longitudinal</li> <li>• Gravimetría</li> <li>• Medición de volumen</li> </ul>
¿Cuáles son los componentes principales del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor?	Determinar los componentes principales del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.	El componente activo mayoritario del aceite esencial de la Hierba Luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), que le confieren un efecto antibacteriano es el citral.	X <sub>2</sub> : Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), obtenido por el método de arrastre con vapor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• citral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Composición química (%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</li> </ul>
¿Cuál es la actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), frente al <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), frente al <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	El efecto antibacteriano del aceite de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), sobre el <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> es significativo.	X <sub>3</sub> : Actividad antibacteriana del aceite esencial de la hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.), frente al <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración mínima inhibitoria (CMI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ml de aceite esencial / ml de medio cultivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método de dilución de caldo</li> </ul>

# TAXONOMÍA DE LA HIERBA LUISA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

## CONSTANCIA Nº 088-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas), recibida de **Dennis Antonio LINO BAUTISTA**, estudiante de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional Del Cálao, ha sido estudiada y clasificada como: ***Cymbopogon citratus*** (DC.) Stapf. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: LILTOPSIDA**

**SUB CLASE: COMMELINIDAE**

**ORDEN: CYPERALES**

**FAMILIA: POACEAE**

**GENERO: *Cymbopogon***

**ESPECIE: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**

Nombre vulgar: "hierba luisa".  
Determinado por: Mag. María I. La Torre A.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 17 de mayo de 2017

  
Mag. ASUNCIÓN CANO ECHEVARRÍA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS USM



AC644db

# ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
 FACULTAD DE CIENCIAS  
 LABICER (Laboratorio N° 12)  
 ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN

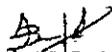


## INFORME TÉCNICO N° 1042 - 17 - LAB. 12

1. DATOS DEL SOLICITANTE
  - 1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE : JOHN FELIX CHAMPI CLAROS
  - 1.2 DNI : 42041637
2. CRONOGRAMA DE FECHAS
  - 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN : 17 / 07 / 2017
  - 2.2 FECHA DE ENSAYO : 19 / 07 / 2017
  - 2.3 FECHA DE EMISIÓN : 20 / 07 / 2017
3. ANÁLISIS SOLICITADO : ANÁLISIS DE ACEITE ESENCIAL
4. DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA SEGÚN EL CLIENTE
  - 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 01 MUESTRA DE ACEITES ESENCIAL DE HIERBA LUISA
5. LUGAR DE RECEPCIÓN : LABORATORIO LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
6. CONDICIONES AMBIENTALES : Temperatura: 25 °C; Humedad relativa: 65%
7. EQUIPOS UTILIZADOS : Refractómetro Leica 10480 Mark II Abbe
8. RESULTADOS

ANÁLISIS	RESULTADOS	MÉTODO DE REFERENCIA
Densidad, g/ml	0.884	NTP-ISO 279:2011
Densidad relativa, g/ml	0.887	NTP-ISO 279:2011
Índice de Iodo, g de Yodo absorbido / 100 g de muestra	2.40	NTP ISO 3961:2012
Índice de acidez, mg KOH/g aceite	2.219	NTP 319.085:1974
Índice de saponificación, mg KOH/g aceite	8.752	NTP-ISO 3857:2016
Número de éster, mg KOH/g aceite	4.534	NTP 319.088:1974
Índice de refracción	1.48	NTP ISO 280:2011

9. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO  
 Los resultados de este Informe técnico son válidos solo para la muestra proporcionada por el solicitante del servicio en las condiciones indicadas del presente Informe técnico.

  
 Bach. Julio Santos LI  
 Analista  
 LABICER - UNI

  
 MSc. Otilia Acha de la Cruz  
 Responsable de Análisis  
 Jefa de laboratorio  
 CQP 202

(\*) El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.

INFORME TÉCNICO N° 1042-17- LABICER

Página 1 de 1

Av. Túpac Amaru 210 Lima 31, Perú. Central: 481 1070. Teléfono: 382 0500. E-mail: otillia@uni.edu.pe

# COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

## UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

### Informe de resultados

**Solicitante:** Dennis Lino Bautista, Universidad Nacional del Callao  
**Muestra:** Aceite esencial de "Hierba Luisa"  
**Análisis:** Composición química de aceites esenciales por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.  
**Fecha de entrega de Resultados:** 12 de julio 2017

### RESULTADOS

En las páginas 2 a 4 del presente informe.

Atentamente,

**Dra. Rosario Rojas Durán**

Unidad de Investigación en Productos Naturales  
LID-Laboratorio 209  
e-mail: [rosario.rojas@upch.pe](mailto:rosario.rojas@upch.pe)  
página web: [www.uipn-upch.pe](http://www.uipn-upch.pe)  
Teléfono: 51-1-3190000 Anexo 2705

Página 1 de 4

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314  
Central Telefónica: (511) 319-0000 2402 Secretaría Académica de  
Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Tallen

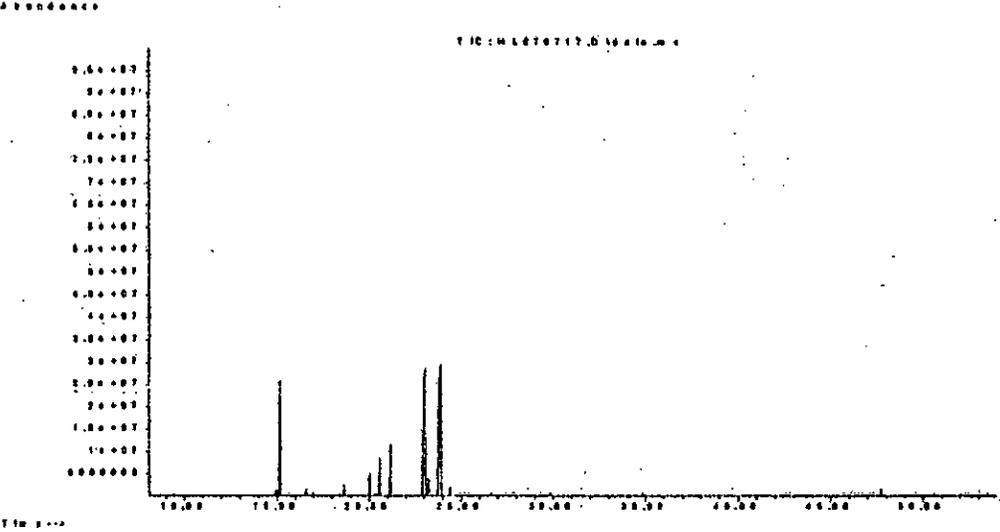
## ACEITE ESENCIAL DE "HIERBA LUISA"

Se identificaron 21 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial.

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t <sub>R</sub> (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	6-metil-5-Hepten-2-ona	14.94	0.48
2	β-Mirceno	15.15	14.23
3	trans-β-Ocimeno	16.59	0.54
4	cis-β-Ocimeno	16.95	0.33
5	Desconocido (C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> )	18.39	0.18
6	β-Linalool	18.66	1.02
7	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	20.03	2.10
8	β-Citronelal	20.30	0.15
9	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	20.37	0.18
10	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	20.57	3.47
11	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	21.14	4.95
12	β-Citronelol	22.52	0.24
13	β-Citral	23.04	29.61
14	Guaniol	23.22	2.46
15	α-Citral	23.89	37.88
16	2-Undecanona	24.40	0.67
17	Acétato de Geraniol	26.68	0.20
18	β-cariofileno	28.32	0.12

19	2-Tridecanona	29.85	0.30
20	Desconocido (C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O)	34.80	0.27
21	Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O)	47.72	0.62

**Cromatograma GC-MS del aceite esencial de "Hierba Luisa"**



## NORMAS TÉCNICAS PERUANAS (NTP)

### A. DENSIDAD RELATIVA (NTP- ISO 279:2011)

**NORMA TÉCNICA  
PERUANA**

**NTP-ISO 279  
2011 (revisada el 2016)**

Dirección de Normalización - INACAL  
Calle Las Camelias 815, San Isidro (Lima 27)

Lima Perú

**Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa a  
20 °C . Método de referencia**

ESSENTIAL OILS. Determination of relative density at 20 °C . Reference method

(EQV ISO 279:1998 Essential oils – Determination of relative density at 20 °C – Reference method)

**2016-07-18  
1ª Edición**

## Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa a 20 °C . Método de referencia

### 1 ALCANCE

La presente Norma Técnica Peruana especifica el método de referencia para la determinación de la densidad relativa de aceites esenciales a 20 °C .

*NOTA:* Si es necesario realizar el ensayo a una temperatura diferente como consecuencia de la naturaleza del aceite esencial, se debe mencionar la temperatura en la Norma Técnica apropiada al aceite esencial en cuestión. La corrección promedio en la región de 20 °C es de 0.000 7 a 0.000 8 por grado Celsius.

### 2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Técnica Peruana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda Norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones recientes de las normas citadas seguidamente. El Organismo Peruano de Normalización posee, en todo momento, la información de las Normas Técnicas Peruanas en vigencia.

#### Norma Técnica Internacional

ISO 356

Aceites esenciales - Preparación de muestras de prueba

### 3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Para efectos de la presente Norma Técnica Peruana se aplican los siguientes términos y definiciones:

**3.1**  
**Densidad relativa a 20 °C**

Es la relación entre la masa de un volumen dado de aceite a 20°C y la masa de un volumen igual de agua destilada a 20 °C .

NOTA: Esta cantidad es adimensional y su símbolo es  $d_{20}^{20}$

**3.2**  
**Densidad absoluta a 20 °C de un aceite esencial**

Es la relación entre la masa de un volumen dado de aceite a 20 °C al mismo volumen.

NOTA: Esta cantidad se expresa en gramos por mililitro.

**4**            **PRINCIPIO**

Volúmenes iguales de aceite esencial y agua, a 20 °C, son pesados sucesivamente en un picnómetro.

**5**            **REACTIVOS**

**Agua destilada**, recién hervida y posteriormente enfriada a aproximadamente 20 °C .

**6**            **APARATOS**

Aparatos de uso común en laboratorio y los siguientes.

**6.1**            **Picnómetro de vidrio**, de una capacidad nominal mínima de 5 ml.

## 9 PROCEDIMIENTO

### 9.1 Preparación del picnómetro

Limpiar cuidadosamente el picnómetro (6.1) y luego enjuagarlo, por ejemplo, con etanol y acetona, luego secar el interior con una corriente de aire seco.  
De ser necesario, limpiar el exterior con un trapo seco o un papel de filtro.

Cuando se alcance el equilibrio de temperatura entre la cámara de la balanza y el picnómetro, considerando su tapón; realizar el pesado con una precisión de 1 mg .

### 9.2 Pesado del agua destilada

Llenar el picnómetro con agua destilada (5.1).

Sumergir el picnómetro en baño maría (6.2). Después de 30 min , llenar con agua hasta la marca, en caso sea necesario. Inserte el tapón, si lo hubiese, y secar el exterior como antes, con un trapo seco o papel de filtro.

Cuando se alcance el equilibrio de temperatura entre la cámara de la balanza y el picnómetro, considerando su tapón; realizar el pesado al 1 mg más cercano.

### 9.3 Pesado del aceite esencial

Vaciar el picnómetro, luego lavarlo y secarlo como se especifica en el apartado 9.1 .

Proceda como se indica en 9.2, reemplazando el agua por la muestra de prueba preparada según lo especificado en el capítulo 8 .

## 10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La densidad relativa,  $d_{20}^{20}$ , se da por la siguiente ecuación:

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

donde:

- $m_0$  es la masa, en gramos, del picnómetro vacío determinado en el apartado 9.1 .
- $m_1$  es la masa, en gramos, del picnómetro llenado con agua, determinado conforme al apartado 9.2 .
- $m_2$  es la masa, en gramos, del picnómetro llenado con aceite esencial, determinado conforme al apartado 9.3 .

Expresar el resultado con tres decimales.

NOTA 1: En la práctica, no se realiza ninguna corrección para el empuje ascendente debido al aire.

NOTA 2: Los instrumentos electrónicos con frecuencia registran niveles más exactos.

Si se requiere la densidad absoluta del aceite esencial, multiplicar el valor obtenido para la densidad relativa por la densidad absoluta del agua a 20 °C (por ejemplo 0,998 23 g/ml).

## 11 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo indicará:

- el método utilizado;
- el resultado obtenido; y
- si se ha verificado la repetibilidad del resultado final obtenido.

© ISO 1998 - © INACAL 2016 - Todos los derechos son reservados

## B.- ÍNDICE DE REFRACCIÓN (NTP – ISO 280:2011)

---

**NORMA TÉCNICA  
PERUANA**

**NTP-ISO 280  
2011 (revisada el 2016)**

---

Dirección de Normalización - INACAL  
Calle Las Camelias 815, San Isidro (Lima 27)

Lima Perú

### **Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción**

ESSENTIAL OILS. Determination of refractive index

(EQV. ISO 280:1998 Essential oils – Determination of refractive index)

**2016-07-18  
1ª Edición**

## Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción

### 1 ALCANCE

Esta Norma Técnica Peruana especifica un método para la determinación del índice de refracción de aceites esenciales.

### 2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Técnica Peruana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda Norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones recientes de las normas citadas seguidamente. El Organismo Peruano de Normalización posee, en todo momento, la información de las Normas Técnicas Peruanas en vigencia.

#### Norma Técnica Internacional

ISO 356

Aceites esenciales - Preparación de muestras de prueba

### 3 TÉRMINO Y DEFINICIÓN

Para fines de esta Norma Técnica Peruana, se aplica el siguiente término y definición.

### 3.1

#### Índice de refracción, $n_D'$

Es la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción, cuando un rayo de luz de longitudes de onda definidas pasa desde el aire hacia el aceite esencial conservado a temperatura constante.

NOTA: La longitud de onda especificada es  $589,3 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$  que corresponde a las líneas  $D_1$  y  $D_2$  del espectro del sodio.

## 4 PRINCIPIO

De acuerdo al tipo de instrumento utilizado, ya sea por medida directa del ángulo de refracción o que el límite de reflexión total sea observado, siendo mantenido el aceite bajo condiciones de isotropismo y transparencia.

## 5 REACTIVOS

5.1 Productos estándar, de grado refractométrico, para ajustar el refractómetro, como sigue:

- 5.1.1 Agua destilada de índice de refracción 1,333 0 a 20 °C .
- 5.1.2 *p*-Cimeno de índice de refracción 1,490 6 a 20 °C .
- 5.1.3 Benzilbenzoato de índice de refracción 1,568 5 a 20 °C .
- 5.1.4 1-Bromonaftalina de índice de refracción 1,658 5 a 20 °C .

## 8 PROCEDIMIENTO

### 8.1 Preparación de la muestra de ensayo

Preparar la muestra de ensayo, de acuerdo con la ISO 356 . Llevar la muestra de ensayo a la temperatura en la que se harán las mediciones.

### 8.2 Regulación del refractómetro

8.2.1 Regular el refractómetro (6.1) midiendo el índice de refracción de los productos estándares descritos en los apartados 5.1.1 a 5.1.4 .

NOTA: Algunos instrumentos pueden ajustarse por medio de una placa de vidrio (6.4), de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el fabricante del instrumento.

8.2.2 Verificar que el refractómetro (6.1) se conserva a la temperatura en la que se harán las lecturas.

Esta temperatura no diferirá de la temperatura de referencia por más de  $\pm 0,2$  °C durante el ensayo.

La temperatura de referencia es 20 °C , excepto para aquellos aceites que no son líquidos a esta temperatura, en cuyo caso se usará una temperatura de 25 °C ó 30 °C , dependiendo del punto de fusión de estos aceites esenciales.

## 9 DETERMINACIÓN

Colocar la muestra de ensayo, preparada de acuerdo con el apartado 8.1, en el refractómetro. Esperar hasta que la temperatura sea estable y hacer las mediciones.

## 10 CÁLCULO

El índice de refracción  $n'_D$ , a la temperatura especificada  $t$ , está dado por la ecuación:

$$n'_D = n''_D + 0,0004(t' - t)$$

donde:

$n''_D$  es la lectura tomada a la temperatura de trabajo,  $t'$  en la que fue realizada verdaderamente la determinación.

Expresar el resultado con 4 decimales.

## 11 REPETIBILIDAD

La diferencia absoluta entre 2 resultados independientes obtenidos de pruebas individuales usando el mismo método en un aceite esencial idéntico, en el mismo laboratorio y realizados por el mismo operador usando el mismo equipo con un intervalo corto de tiempo, no será en más del 5 % de casos, mayor a  $\pm 0,0002$ .

## 12 INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo contendrá la siguiente información:

- Todos los detalles necesarios para la identificación completa del producto;
- El método de muestreo usado, si es conocido;
- El método de ensayo usado con referencia a esta Norma Técnica Peruana;

**C.- ÍNDICE DE ÉSTER (NTP 319.088:1974)**

---

**NORMA TÉCNICA  
PERUANA**

**NTP 319.088  
1974 (revisada el 2016)**

---

Dirección de Normalización - INACAL  
Calle Las Camelias 815, San Isidro (Lima 27)

Lima Perú

**ACEITES ESENCIALES. Determinación del índice de  
éster**

**ESSENTIAL OILS. Determination of ester index**

**2016-07-18  
1ª Edición**

## ACEITES ESENCIALES. Determinación del índice de éster

### NORMAS A CONSULTAR

NTP 319.077	ACEITES ESENCIALES. Preparación de la muestra para análisis
NTP 319.079	ACEITES ESENCIALES. Extracción de muestras
NTP 319.085	ACEITES ESENCIALES. Determinación del índice de acidez

### 1 OBJETO

1.1 La presente Norma Técnica Peruana establece el método de determinación del índice de éster de los aceites esenciales.

1.2 Este método no es aplicable a los aceites esenciales que contienen elevada proporción de aldehídos.

### 2 DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN

2.1 **Índice de Éster (IE.) de un aceite esencial:** Es el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los ésteres contenidos en 1 g de aceite esencial.

**3 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS Y RECEPCIÓN**

3.1 Se realizará de acuerdo a lo indicado en la NTP 319.079 .

**4 MÉTODOS DE ENSAYO**

**4.1 Preparación de la muestra a ensayar**

4.1.1 Se realiza de acuerdo a lo indicado en la NTP 319.077 .

**4.2 Principio del método**

4.2.1 Se basa en la hidrólisis de los ésteres bajo determinadas condiciones, por una solución de título conocido y valoración del exceso de álcali.

**4.3 Aparatos**

4.3.1 Bureta con llave, de 25 ml graduada al 0,1 .

4.3.2 Pipeta volumétrica de 25 ml .

4.3.3 Pipeta volumétrica de 5 ml .

4.3.4 Dispositivo para saponificación, compuesto de un balón de vidrio resistente a los álcalis, de 200 ml de capacidad, con cuello esmerilado, provisto de un tubo de vidrio de por los menos 1 m de longitud y aproximadamente 1 cm de diámetro interno.

4.3.5 Fragmentos de piedra pómez .

#### 4.4 Reactivos

4.4.1 Etanol, solución al 95 % (v/v) a 20 °C , recientemente neutralizada por la solución de hidróxido de potasio (véase apartado 4.4.2) en presencia de fenolftaleína (véase apartado 4.4.4) o de rojo de fenol (véase apartado 4.4.5) cuando el aceite esencial posee constituyentes que contienen grupos fenólicos.

4.4.2 Hidróxido de potasio, solución 0,5 N en etanol.

4.4.3 Acido clorhídrico ó ácido sulfúrico, solución titulada 0,5 N .

4.4.4 Fenolftaleína, solución de 2 g por litro, en etanol de 95 % (v/v) .

4.4.5 Rojo de fenol, solución de 0,4 g por litro en etanol de 20 % (v/v) .

#### 4.5 Procedimiento

4.5.1 Se pesa (')  $2 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$  de muestra, con aproximación del miligramo.

4.5.2 Se introduce la muestra pesada, en el balón del dispositivo de saponificación conteniendo unos fragmentos de piedra pómez, se añaden 25 ml de hidróxido de potasio (véase apartado 4.4.2) (") y se lleva a ebullición suave durante un tiempo que se establece en la norma técnica de cada aceite esencial.

4.5.3 A continuación se deja enfriar. Se añaden 20 ml de agua destilada, luego cinco gotas de fenolftaleína (véase apartado 4.4.4.) (salvo en el caso de aceites esenciales fenólicos para los que es necesario emplear 5 gotas de rojo de fenol (véase apartado 4.4.5)) y se neutraliza la solución obtenida con el acido clorhídrico (véase apartado 4.4.3) ó el ácido sulfúrico (véase apartado 4.4.3) .

#### 4.5.4 Prueba en blanco

4.5.4.1 Paralelamente a la determinación y en las mismas condiciones operatorias, se efectúa una prueba en blanco.

NOTA: Esta determinación puede efectuarse sobre la solución proveniente de la determinación del índice de acidez con la condición de añadir 5 ml de etanol (apartado 4.4.1) en la prueba en blanco antes de los 25 ml de hidróxido de potasio (apartado 4.4.2) (El volumen de etanol corresponde al volumen introducido en el momento de la determinación del índice de acidez (véase NTP 319.085).

#### 4.6 Expresión de resultados

4.6.1 Sea:

P el peso, en gramos, de la muestra tomada

V el volumen en mililitros de ácido clorhídrico (véase 4.4.3) utilizado para la determinación

V<sub>1</sub> el volumen en mililitros de ácido clorhídrico (véase 4.4.3) utilizado para la prueba en blanco

IA el valor del índice de acidez, determinado según la NTP 319.085

4.6.2 El índice de éster IE está dado por la fórmula siguiente:

$$\frac{28,05 (V_1 - V)}{P} - IA$$

NOTA: Cuando la determinación es efectuada sobre la solución proveniente de la determinación del índice de acidez, el índice de éster IE, está dado por la fórmula siguiente:

$$\frac{28,05 (V_1 - V)}{P}$$

4.6.3 El índice de éster se debe expresar con dos cifras significativas si es inferior a 100 y con tres cifras significativas si es igual o superior a 100.

#### 4.6.4 Precisión de los resultados

4.6.4.1 En el caso de aceites esenciales que contengan ésteres fácilmente saponificables, tales como el acetato de linalilo, la variación de resultados entre diferentes laboratorios pueden llegar a 2, en el caso de los aceites esenciales que contengan ésteres difícilmente saponificables, esta variación puede llegar a 4 (estas cifras no son válidas sino en el caso de que  $(V_1 - V)$  sea por lo menos igual a 10).

#### 4.7 Informe

4.7.1 El informe del ensayo debe mencionar, además de los resultados, el método empleado, cualquier particularidad observada durante las determinaciones y cualquier detalle no señalado en esta Norma Técnica Peruana o considerada como opcional, pero que pueda haber influido sobre los resultados.



## **1 OBJETO**

1.1 La presente Norma Técnica Peruana establece el método de determinación del índice de acidez de los aceites esenciales.

## **2 DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN**

**índice de acidez del aceite esencial (I.A.):** Es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio, necesario para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 g de aceite esencial.

## **3 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS**

La toma de muestras se realizará según la NTP 319.079 .

## **4 MÉTODOS DE ENSAYO**

### **4.1 Preparación de la muestra**

4.1.1 La muestra se prepara según la NTP 319.077 .

### **4.2 Principio del método**

4.2.1 Se basa en la neutralización de los ácidos libres por una solución alcohólica de hidróxido de potasio.

### **4.3 Aparatos**

4.3.1 Bureta de 25 ml , con llave, graduada al 0,1 .

4.3.2 Pipeta volumétrica de 5 ml .

4.3.3 Dispositivo de saponificación formado por un balón de vidrio resistente a los álcalis, de 100 ml a 200 ml de capacidad, al cual se puede

adaptar con miras a la determinación ulterior del índice de éster, un tubo de vidrio que sirva de refrigerante a reflujo, con una longitud no menor de 1 m y con aproximadamente 1 cm de diámetro interno.

#### **4.4 Reactivos**

**4.4.1 Etanol:** Solución al 95 % (V/V) a 20 °C recientemente neutralizado con la solución de hidróxido de potasio (apartado 4.4.2) en presencia de fenolftaleína (apartado 4.4.3) o de rojo de fenol (apartado 4.4.4), cuando el aceite esencial posee componentes que contienen grupos fenólicos.

**4.4.2 Hidróxido de potasio:** Solución de aproximadamente 0,1 N (o de normalidad indicada en la Norma específica del aceite esencial) en etanol, controlada diariamente.

**4.4.3 Fenolftaleína:** Solución de 2 g por litro en etanol al 95 % (V/V).

**4.4.4 Rojo de Fenol:** Solución de 0,4 g por litro en etanol al 20 % (V/V).

#### **4.5 Procedimiento**

4.5.1 Una vez pesada la muestra, ésta se introduce en el dispositivo de saponificación.

4.5.2 Se agregan 5 ml de etanol (apartado 4.4.1), 5 gotas de fenolftaleína (apartado 4.4.3) (excepto en el caso de aceites esenciales fenólicos en los cuales es necesario usar 5 gotas de rojo de fenol (apartado 4.4.4)) y se neutraliza la solución con hidróxido de potasio (apartado 4.4.2) hasta la aparición de una coloración que persista por algunos segundos.

4.5.3 Eventualmente, se reserva el balón y su contenido para la determinación del índice de éster (véase NTP 319.088)

#### **4.6 Expresión de los Resultados**

4.6.1 Sea:

P : El peso, en gramos, de la muestra ensayada;

V : el volumen, en mililitros, de hidróxido de potasio (apartado 4.4.2) utilizado

El índice de acidez se encuentra por la siguiente fórmula y se expresa con un decimal.

$$\frac{5,61 \times V}{P}$$

**E.- DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO (NTP- ISO 3961:2012)**

<b>NORMA TÉCNICA PERUANA</b>	<b>NTP-ISO 3961:2012</b>
<b>Determinación del índice del yodo</b>	
<b>2012-02-10 1ª Edición</b>	

## **1. ALCANCE**

Esta Norma Técnica Peruana establece el método de referencia para determinar el índice de yodo en grasas y aceites animales y vegetales, de aquí en adelante denominados como grasas.

## **3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES**

Para los propósitos de esta Norma Técnica Peruana, se aplica la siguiente definición:

**3.1 índice de yodo (WI):** Masa del halógeno, expresado como yodo, absorbido por la porción de ensayo siguiendo los procedimientos especificados, dividido por la masa de porción de ensayo.

## **4. PRINCIPIO**

Se basa en la disolución de una porción de ensayo en un solvente y la adición del reactivo de Wijs. Después de un tiempo especificado, se adiciona yoduro de potasio y agua, y se titula el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio.

## **5. REACTIVOS**

Se utilizan únicamente reactivos de grado analítico reconocido, y agua que cumpla con el grado 3 de la ISO 3696.

**5.1 Yoduro de potasio (KI), solución, concentración de masa,  $\rho(KI) = 100$  g/L** que no contenga yodato o libre de yodo.

**5.2 Solución de almidón:** Mezclar 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua y adicionar a 1000 ml de agua hirviente. Hervir por 3 minutos y dejar enfriar. Preparar solución de almidón todos los días

**5.3 Tiosulfato de sodio:** Solución patrón volumétrica, cantidad de sustancia concentrada,  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , estandarizado como máximo 7 días antes de usar.

**5.4 Solvente:** Preparado por la mezcla de un volumen de ciclohexano y un volumen de ácido acético glacial (50 ml + 50 ml).

**5.5 Reactivo de Wijs:** que contiene monoclóridato de yodo en ácido acético.

Puede utilizarse el reactivo de Wijs disponible comercialmente. Se debe tener en cuenta el tiempo de vida útil del reactivo.

## **6. APARATOS**

Aparatos comunes de laboratorio y en particular lo siguiente:

**6.1 Cuchara de vidrio para pesar,** adecuado para la porción de ensayo y para ser insertado en los matraces (6.2).

**6.2 Matraces cónicos,** de 500 ml de capacidad, con tapones de vidrio esmerilados y completamente secos.

**6.3 Balanza analítica,** capacidad de pesada con una precisión de + - 0,001 g .

**6.4 Fiola,** capacidad de 1 000 ml, ISO 1042[2] clase A

**6.5 Pipeta**, capacidad de 25 ml, automática o ISO 648[1] clase A equipada con una bombilla de succión.

## 9. PROCEDIMIENTO

### 9.1 Porción de ensayo y preparación de la solución en blanco

9.1.1 De acuerdo al índice de yodo esperado para la muestra, pesar con aproximación de 0,001 g, en una cuchara de vidrio para pesar (6.1), la masa de la porción de ensayo indicada en la Tabla 1..

**TABLA 1 - Masa de la porción de ensayo**

Índice de yodo esperado $W_I$ (g/100g)	Masa de la porción de ensayo (g)	Volumen del solvente (ml)
$W_I < 1,5$	15,00	25
$1,5 \leq W_I < 2,5$	10,00	25
$2,5 \leq W_I < 5$	3,00	20
$5 \leq W_I < 20$	1,00	20
$20 \leq W_I < 50$	0,40	20
$50 \leq W_I < 100$	0,20	20
$100 \leq W_I < 150$	0,13	20
$150 \leq W_I < 200$	0,10	20

### 9.2 Determinación

9.2.1 Colocar la cuchara de vidrio para pesar conteniendo la porción de ensayo en el matraz de 500 ml (6.2) y añadir el volumen del solvente (5.4) indicado en la Tabla 1.

Añadir 25 ml del reactivo de Wijs (5.5) con la pipeta (6.5). Insertar el tapón, darle vueltas al contenido y colocar el matraz a oscuras.

9.2.2 Preparar un blanco con el solvente y el reactivo como en 9.2.1 pero

omitiendo la porción de ensayo.

9.2.3 Para muestras que contienen un índice de yodo por debajo de 150, dejar los matraces en la oscuridad por una hora.

Para muestras que contienen un índice de yodo sobre 150 y para productos polimerizados y aceites con ácidos grasos conjugados (como aceite de tung y aceite de castor deshidratado) y cualquier aceite que contenga ceto ácidos grasos (tales como algunos grados de aceites de castor hidrogenados) y productos oxidados de una extensión considerable, dejar los matraces por 02 horas en la oscuridad.

9.2.4 Al finalizar el tiempo de reacción (9.2.3) añadir 20 ml de yoduro de potasio (5.1) y 150 ml de agua.

Titular con solución estándar de tiosulfato de sodio (5.3) hasta que el color amarillo debido al yodo casi haya desaparecido. Añadir unas pocas gotas de solución de almidón (5.2) y continuar la titulación hasta que el color azul casi desaparezca después de una vigorosa agitación. Registrar el volumen,  $V_2$ , de la solución de tiosulfato de sodio requerida para alcanzar el punto final. Notar que la determinación potenciométrica del punto final es permisible.

9.2.5 Simultáneamente realizar la determinación usando la solución en blanco (9.2.2). En la determinación en blanco, en 9.2.4, registrar el volumen

de solución de tiosulfato de sodio requerido para alcanzar el punto final como V1 .

## 10. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El índice de yodo,  $WI$ , expresado en gramos por 100 g de grasa, está dado por la ecuación:

Donde:

$c$ : es el valor numérico de la concentración de la solución de tiosulfato de sodio (5.3) en moles por litro;

$V1$ : es el valor numérico del volumen, en mililitros, de solución de tiosulfato usado para la prueba del blanco;

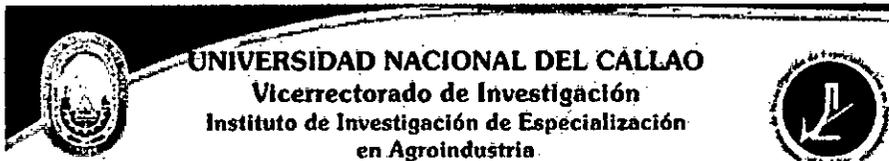
$V2$ : es el valor numérico del volumen, en mililitros de la solución de tiosulfato de sodio usado para la determinación;

$m$ : es el valor numérico de la masa, de la porción de ensayo, en gramos.

**TABLA 2 - Redondeo de los resultados**  
Valores en gramos por 100 g

$WI$ g/100g	Redondeo a
$WI < 20$	0,1
$20 \leq WI < 60$	0,5
$WI \geq 60$	1

CONSTANCIA EMITIDA POR EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE  
ESPECIALIZACIÓN EN AGROINDUSTRIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO  
Vicerrectorado de Investigación  
Instituto de Investigación de Especialización  
en Agroindustria

*"Trío del Bazo Servido al Ciudadano"*

**CONSTANCIA N° 013-2017-IIEA/VRI**

Bellavista, 08 de agosto del 2017

La Directora del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria de la Universidad Nacional del Callao, que suscribe hace CONSTAR:

Que, los Señores:

*Edwin Auccapiña Ramos,*

*John Félix Champi Claros y*

*Dennis Antonio Lino Bautista*

Bachilleres de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, han realizado la parte experimental de la tesis "Caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.) obtenido por el método de arrastre con vapor" en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria, en el periodo comprendido entre el 03 de julio 2017 al 07 de agosto del 2017.

Se expide la presente Constancia, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dennis Antonio Lino Bautista", is written over a circular stamp. The stamp contains the text "INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ESPECIALIZACIÓN EN AGROINDUSTRIA" and "UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO".

Dr. Antonio  
@INVESTIGACION IIEA/VRI

Av. Jirón Pallas 71 N° 306 - Bellavista  
Callao 02 - PERÚ, Tel: (011) 4557325

## IDENTIFICACIÓN DE BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922

PERU	Centro Nacional de Salud Pública	"Año del Buen Servicio al Ciudadano"
<b>DATOS GENERALES:</b>		
Nombre: <i>Escherichia coli</i> ATCC Código: 25922		
<b>IDENTIFICACIÓN:</b>		
Medio de cultivo: 18 - 24 horas, 37°C, Atmósfera normal Agar McCorky: colonias rojas Coloración GRAM: bacilo GRAM negativo miden 0.5 u x 3 u largo		
Pruebas bioquímicas mínimas: Agar TSI: K/A (alcalino / ácido) con gas y sin hidrógeno sulfurado Agar LIA: K/K (alcalino / alcalino) sin hidrógeno sulfurado e Indol positivo		
Pruebas bioquímicas complementarias:		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Citrato : Negativo</li><li>• Movilidad: Positivo</li><li>• Indol : Positivo</li><li>• Ornitina : Positivo</li><li>• Urea : Negativo</li></ul>		
<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN:</b>		
La cepa se mantiene en: <ul style="list-style-type: none"><li>- Temperatura ambiente: Agar triplicasa soya debidamente sellado y rotulado.</li><li>- Criopreservación: Caldo glicero/ peptona a -20°C y a -80°C</li></ul>		
<b>CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD:</b>		
<i>Escherichia coli</i> debe manipularse de acuerdo al nivel 2 de bioseguridad, correspondiente a la clasificación internacional de riesgo NBS 2.		
  Ronnie Gavilan Chavez Responsable del LRN de Enteropatógenos Centro Nacional de Salud Pública Instituto Nacional de Salud		
Cápac Yupanqui No. 1400, Jesús María, Lima 11 Central: 617 0200 - Fax: 617 0244 e-mail: postmaster@ins.gob.pe / Página Web: <a href="http://www.ins.gob.pe">www.ins.gob.pe</a>		

# IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

			Centro Nacional de Salud Pública	"Año del Buen Servicio al Ciudadano"
---	---	---	-------------------------------------	--------------------------------------

**DATOS GENERALES:**  
Nombre: *Staphylococcus aureus*  
Procedencia: Cepa referencia!

**IDENTIFICACIÓN:**  
Medio de cultivo: 18 - 24 horas, 37°C, Atmosfera normal  
Agar sangre: colonias blancas. Forma redondeada, tamaño mediano. Sin hemolisis.  
Agar TSA: colonias blancas pequeñas y redondeadas.  
Manitol salado: colonias amarillas, pequeñas y redondeadas.  
Coloración GRAM: GRAM positivo

Pruebas bioquímicas mínimas:  
Agar TSI: *NA* (ácido / ácido) sin gas y sin hidrógeno sulfurado.  
Agar LIA: *K/A* (alcalino / ácido)

Pruebas bioquímicas complementarias:

- Catalasa : Positivo
- Oxidasa : Negativo

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN:**  
La cepa se mantiene en:  
- Temperatura ambiente: Agar triplicasa soya debidamente sellado y rotulado.  
Crioconservación: Caldo glicerol peptona a -20°C y a -80°C

**CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD:**  
*Staphylococcus aureus* debe manipularse de acuerdo al nivel 2 de bioseguridad, correspondiente a la clasificación internacional de riesgo NBS 2.

  
  
Dr. Ronnie Gavilan Chavez  
Responsable del LRN de Enteropatógenos  
Centro Nacional de Salud Pública  
Instituto Nacional de Salud

Capac Yupanqui No. 1400, Jesús María, Lima 11  
Central: 017 6260 - Fax: 017 6244  
e-mail: [coordinator@ins.gob.pe](mailto:coordinator@ins.gob.pe) / Página Web: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe)

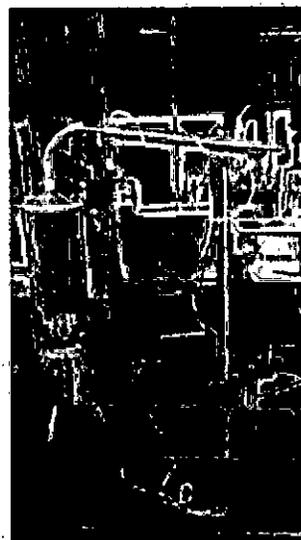
**PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LABORATORIO DE OPERACIONES  
Y PROCESOS UNITARIOS**

**Selección y cortado**

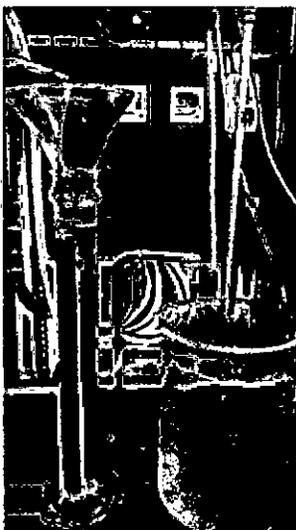


**Equipo de obtención**

**Por arrastre con vapor**



**Obtención del aceite esencial**



**Aceite esencial de**

**hierba luisa**



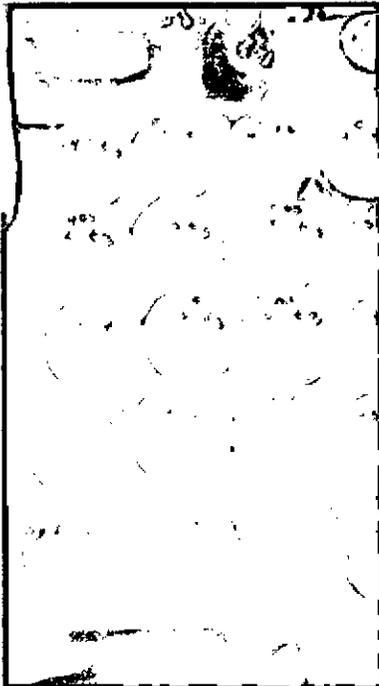
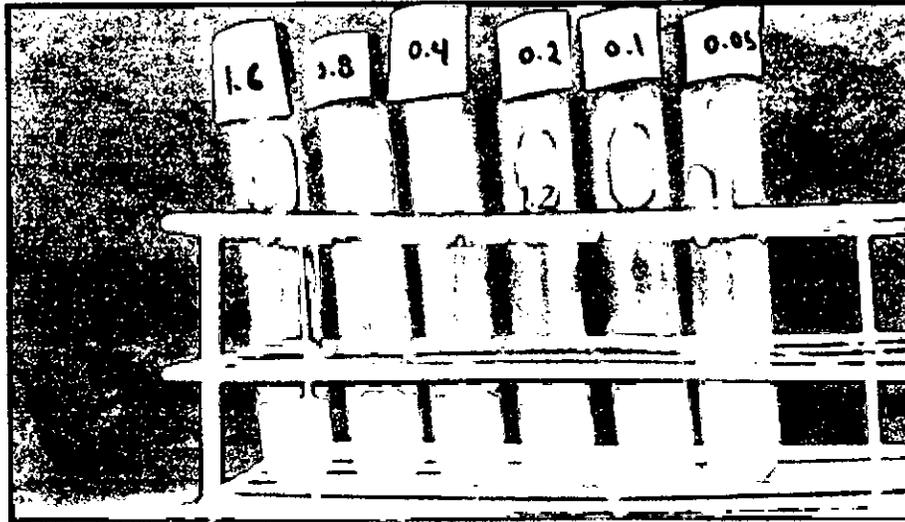
**PRUEBAS EXPERIMENTALES EN LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGÍA DEL CET -UNAC**

**Bacterias solicitadas al Instituto Nacional de Salud**

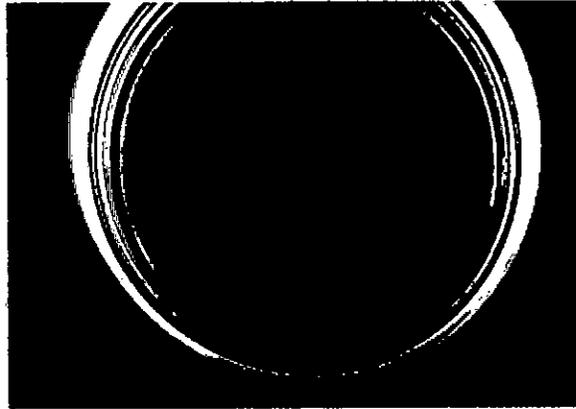


**Pruebas Experimentales**

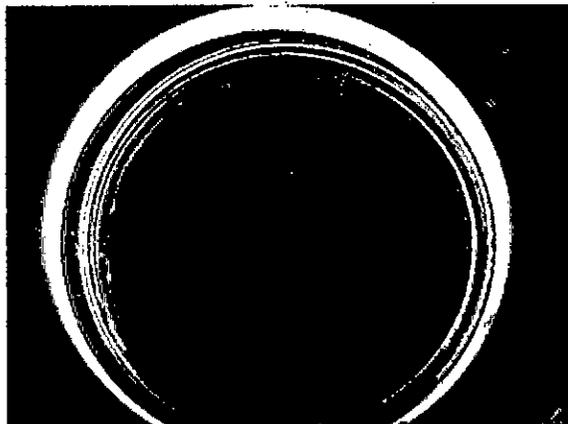




**Prueba de sensibilidad mediante halo de inhibición del *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite esencial de hierba luisa**



**Prueba de sensibilidad mediante halo de inhibición del *Staphylococcus aureus* frente al aceite esencial de hierba luisa.**



## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### EXPERIENCIA N°1

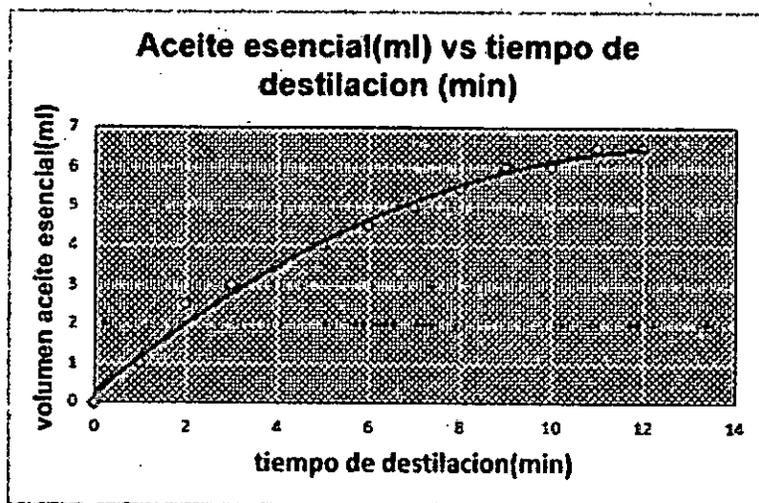
TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2,5
3	3
4	3,5
5	4
6	4,5
7	5
8	5,5
9	6
10	6
11	6,5
12	6,5

#### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	3
W materia prima(g)	1,5
Volumen de agua (L)	5
Temperatura (°C)	100

#### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	6,5
Peso aceite (g)	5,594
Rendimiento(%)	0,373



## EXPERIENCIA N°2

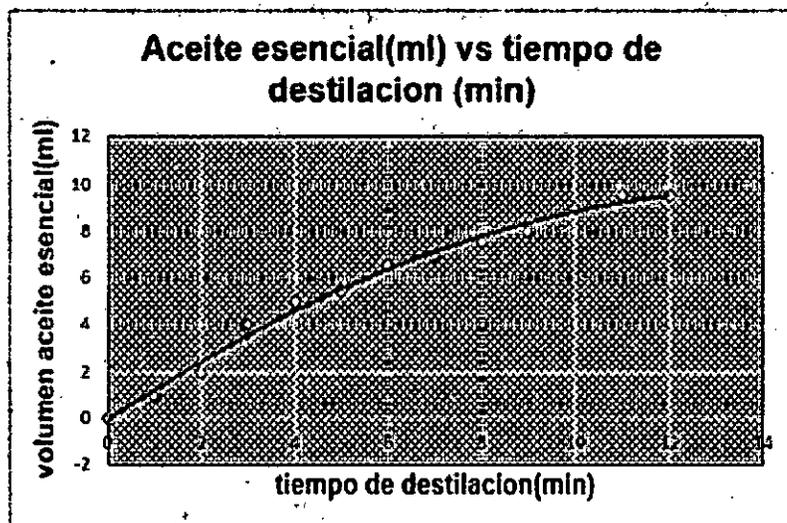
TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2
3	4
4	5
5	5.5
6	6.5
7	7
8	7.5
9	8
10	9
11	9.5
12	9.5

### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	3
W materia prima(kg)	2
Volumen de agua (L)	5
Temperatura(°C)	100

### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	9.5
Peso aceite (g)	7.27
Rendimiento(%)	0.363



### EXPERIENCIA N°3

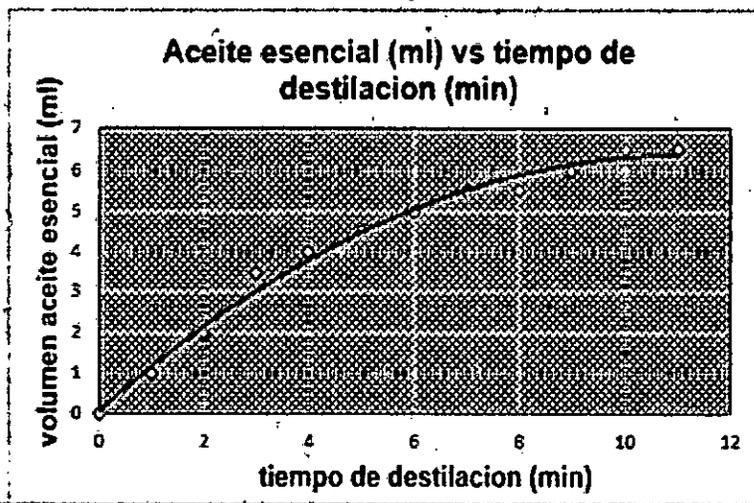
TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2
3	3.5
4	4
5	4.5
6	5
7	5.5
8	5.5
9	6
10	6.5
11	6.5
12	6.5

#### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	3
W materia prima(Kg)	1.5
Cantidad de agua (L)	6
Temperatura (°C)	100

#### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	6.5
Peso aceite (g)	5.673
Rendimiento(%)	0.378



### EXPERIENCIA 4

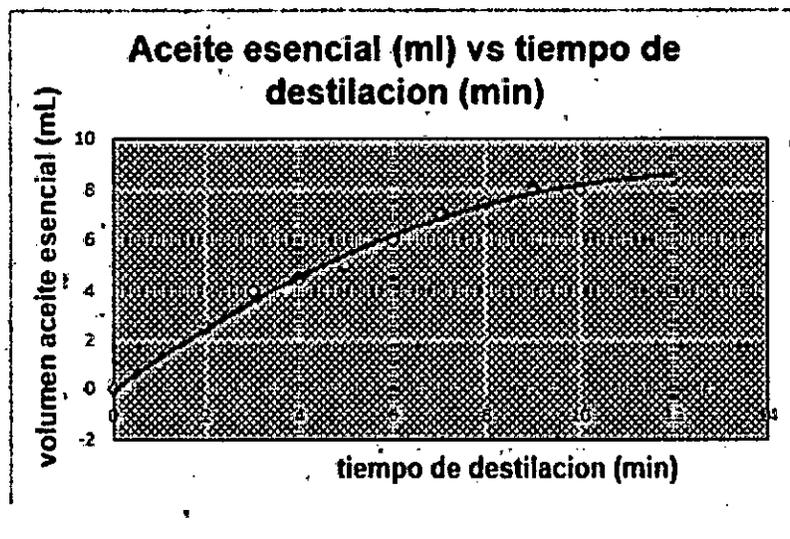
TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	3
3	5
4	6
5	6.5
6	7
7	8
8	8
9	8.5
10	9
11	9
12	9

#### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	30
W materia prima(g)	2000
Cantidad de agua (L)	6
temperatura	100

#### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	9
Peso aceite (g)	7.75
Rendimiento(%)	0.387



### EXPERIENCIA 5

TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2,5
3	3
4	3,5
5	4,5
6	5
7	5,5
8	6
9	6
10	6,5
11	6,5
12	6,5

#### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	5
W materia prima(g)	1500
Cantidad de agua (L)	5
temperatura	100

#### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	6.5
Peso aceite (g)	5.256
Rendimiento(%)	0.350

**Aceite esencial (ml) vs tiempo de destilacion (min)**



## EXPERIENCIA 6



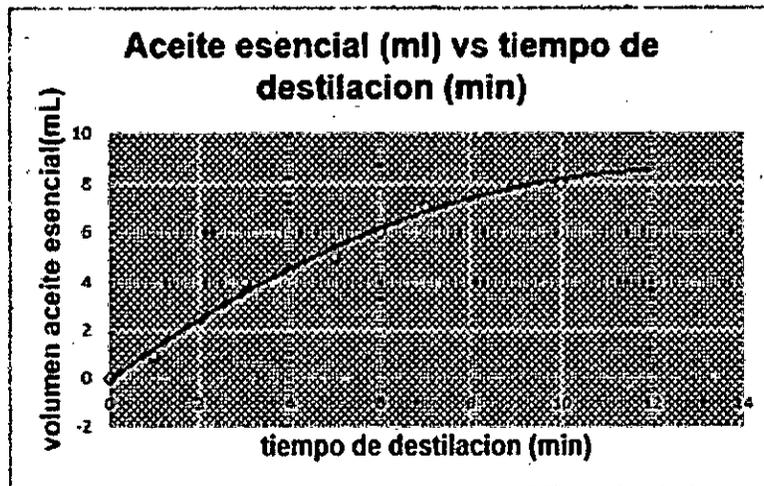
TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2
3	4
4	5
5	6
6	6,5
7	7
8	7,5
9	8
10	8,5
11	8,5
12	8,5

### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (cm)	5
W materia prima(g)	2000
Cantidad de agua (L)	5
temperatura	100

### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	8,5
Peso aceite (g)	7,213
Rendimiento(%)	0,361



## EXPERIENCIA 7

+

TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2.5
3	3.5
4	4
5	4.5
6	5
7	5
8	5.5
9	6
10	6
11	6
12	6

### DATOS DE ENTRADA

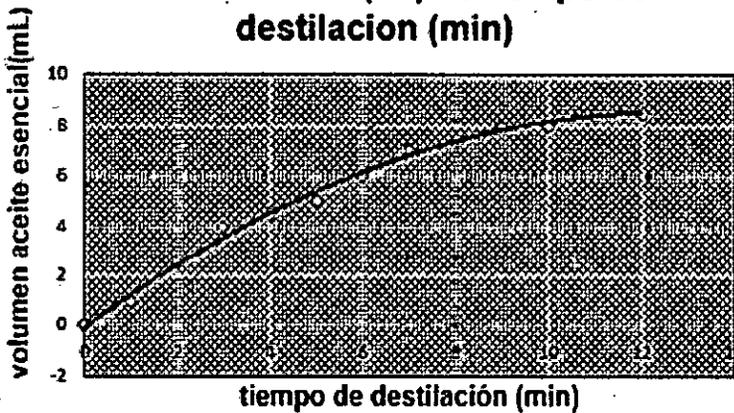
Tamaño de partícula (cm)	5
W materia prima(Kg)	1.5
Cantidad de agua (L)	6
temperatura	100

### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	6
Peso aceite (g)	5.25
Rendimiento(%)	0.35

□

**Aceite esencial (ml) vs tiempo de destilación (min)**



### EXPERIENCIA 8

TIEMPO(min)	VOLUMEN(mL)
0	0
1	1
2	2.5
3	4
4	4.5
5	5
6	6
7	7
8	7.5
9	8
10	8
11	8.5
12	8.5

#### DATOS DE ENTRADA

Tamaño de partícula (mm)	5
--------------------------	---

W materia prima(g)	2000
--------------------	------

Cantidad de agua (L)	6
----------------------	---

temperatura	100
-------------	-----

#### DATOS OBTENIDOS

Volumen(ml)	8.5
-------------	-----

Peso aceite (g)	7.11
-----------------	------

Rendimiento(%)	0.356
----------------	-------

