



Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya)

Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya)

Kiev Ochoa Pumaylle¹, Luis Ricardo Paredes Quiroz^{1,*}, Dagnith Liz Bejarano Luján², Reynaldo Justino Silva Paz³

¹ EAP Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

² Unidad Formuladora de Proyectos, Gerencia Regional de Desarrollo Social (GRDS), Gobierno Regional de Apurímac.

³ Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITAL), Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Peruana Unión.

Recibido 15 abril 2012; aceptado 15 diciembre 2012

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue extraer, caracterizar y evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 29923. Las hojas y tallos se recolectaron a una altitud de 3800 m.s.n.m. en el distrito de Puquio, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho. El aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y tallos desecados de *S. graveolens*, con rendimiento de 1,26 % (p/p). La muestra extraída fue caracterizada a través de ensayos físicos. La composición química del aceite se evaluó mediante cromatografía de gas con detector de masa (CG-SM). La actividad antibacteriana del aceite de *S. graveolens* se realizó por el método de difusión en agar en pocillos, utilizando cepas de microorganismos gram positivo como *S. aureus* y gram negativo como *E. coli*. La densidad del producto resultó 0,8755 g/ml a 20 °C; índice de refracción 1,4726; índice de rotación 102°85' y soluble en etanol; el cromatograma mostró componentes mayoritarios con un contenido de 52,39 % Sabineno, 8,20 % (+)-4-careno, 7,11 % τ -terpineno, 6,74 % β -myrceno, 3,78 % 4-terpinolol, 3,67 % Pulegona. Los resultados mostraron actividad antibacteriana marcada y moderada, para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente, observándose formación de halos de inhibición para concentraciones del aceite esencial a 80, 90 y 100 %. El aceite esencial de *S. graveolens* se presenta con actividad antibacteriana promisoría.

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

Abstract

The aim of this work was extract, characterize and evaluate the antibacterial activity of the essential oil of *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* ATCC 29923. The leaves and stems of *S. graveolens* were collected in the district of Puquio 3800 m.s.n.m., Lucanas province, and department of Ayacucho. The essential oil was obtained by steam water destillation dried leaves and stems with yield 1.26% (w/w) to which physical testing were performed. The chemical composition was evaluated by gas chromatography with mass detector (GC-MS). Antibacterial activity of *S. graveolens* oil was tested by agar diffusion method in wells against Gram positive strains such as *S. aureus* ATCC 29923 and Gram negative as *E. coli*. The density a 20 °C was 0.8755 g/ml; the index refraction was 1.4726 and the rate rotation was 102° 85' and the solubility miscible in ethanol. The GC-MS showed the main components sabinene (52.39 %), (+)-4-carene (8.20 %), τ -terpinen (7.11 %), β -myrcene (6.74 %), 4-terpinolol (3.78 %) and pulegone (3.67 %). The results showing activity strong antibacterial activity and moderate, respectively, for the strains tested, observing formation of inhibition halos for essential oil concentrations at 80, 90 and 100 % in both strains. The essential oil of *S. graveolens* presented with promising antibacterial activity.

Keywords: Wiskataya, *Senecio graveolens* Wedd, essential oil, antibacterial activity.

* Autor para correspondencia

Email: lrpq72@hotmail.com (L. Paredes)

1. Introducción

Los aceites esenciales, son líquidos aromáticos obtenidos de diferentes partes de la planta y utilizados ampliamente en la industria alimentaria, como condimentos y saborizantes; y en las industrias farmacéutica, cosmética y tabacalera, como perfumes y esencias (Ramírez *et al.*, 2009). No obstante, investigaciones muestran que algunos aceites poseen actividades antibacteriana, antifúngica y antiviral (Mesa *et al.*, 2007; Delgado y Cuca, 2007; Olivera *et al.*, 2004), insecticida, antitóxica (Kahriman *et al.*, 2011) y antioxidante (Kordali *et al.*, 2005). Las enfermedades producidas por patógenos (*E. coli*, *S. aureus*) generalmente están asociados con la ingesta de alimentos contaminados, las mismas que causan gastroenteritis y diarrea, siendo responsables de más de 5000 muertes diarias (Benites *et al.*, 2011). En el 2008, la cantidad mundial de muertes por diarrea en niños menores de 5 años fue estimada en 1,87 millones, lo cual constituye el 19% de las muertes en niños (González *et al.*, 2011). El surgimiento de cepas resistentes a antibióticos ha resultado en un serio problema de salud, obligando a la búsqueda de nuevas fuentes, encontrándose en los aceites esenciales un alto potencial para ello.

Estos resultados hacen relevante el estudio de los aceites esenciales debido a la importancia que tienen para la industria farmacéutica y de alimentos.

El Perú presenta una biodiversidad de plantas medicinales nativas, siendo utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado de la salud. Dentro de este contexto, la región andina del Perú posee una variada flora destacándose la especie conocida como *S. graveolens*, esta especie vegetal se desarrolla sobre los 3800 m.s.n.m. en llanuras y quebradas de las regiones de Apurímac, Ayacucho, Arequipa, Huancavelica, Huánuco, Cusco y Puno (Salvador *et al.*, 2009) y se utiliza en la medicina tradicional para aliviar

malestares estomacales y el soroche (Villagrán *et al.*, 2004).

La recolección del *S. graveolens*, en el distrito de Puquio, se debe a la necesidad de incorporar esta nueva especie a los procesos de la agroindustria, evitando así que cada año se pierda en su medio geográfico, producto del abandono y desaprovechamiento. Con la extracción del aceite esencial se pretende dar un valor agregado e incrementar su valor económico como comercial en los mercados locales y nacionales, creando nuevas alternativas de trabajo e ingresos para el agricultor que viene sufriendo pérdidas de rentabilidad en sus cultivos tradicionales y orientar su uso futuro como agente antibacteriano.

El objetivo del presente trabajo fue extraer, caracterizar y determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. graveolens* en microorganismos gram positivos y gram negativos que son causantes de diversas patologías en el hombre y animales. Las bacterias utilizadas fueron *S. aureus* y *E. coli*.

2. Material y Métodos

2.1. Recolección de la muestra

Las muestras de *S. graveolens* (Wiskataya) fueron recolectadas el 25 de marzo del 2011, en Km 18 ruta Puquio-Andamarca, lugar Ccechuica (zona volcánica), territorio perteneciente a la comunidad campesina del barrio de Chaupi, distrito Puquio, provincia de Lucanas, región Ayacucho, a una altitud de 3800 m.s.n.m., siendo transportado a las instalaciones de producción de la Empresa BOKAWSAY S.A.C., para su procesamiento. Se trabajó con tallos y hojas deshidratados.

Los tallos y hojas recolectados fueron pesados en una balanza de plataforma, capacidad 50 kg, y seleccionados de forma manual manteniendo su homogeneidad y representatividad (frescura y color uniforme), posteriormente la muestra se sometió a un lavado a chorro para remover materias extrañas, el secado fue bajo sombra con ventilación en estantes de

mallá, seguido del despiece de la materia prima para reducirla a partículas pequeñas, para su posterior extracción.

2.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de colección del Laboratorio Veterinario del Sur (LABVETSUR). Gramnegativa: *E. coli*, cepa aislada de un ganado bovino con diagnóstico de colitis hemorrágico, aislado en la ciudad de Arequipa. Grampositiva: *S. aureus* ATCC 29923. Cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC).

2.3. Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial de *S. graveolens* se realizó en el laboratorio de la Dirección Regional de la Producción – Gobierno Regional de Apurímac, utilizándose un equipo extractor por arrastre con vapor de agua, material acero inoxidable y con capacidad de 10 kg de materia prima y 20 litros de agua. El material vegetal preparado (tallos y hojas deshidratados) fue pesado en cantidad de 2000 g y colocado en la cámara extractora, sometiéndolo a corriente de vapor de agua, la esencia así arrastrada fue posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. La separación de la mezcla aceite/agua se realizó con pera de decantación, y el aceite extraído se purificó con sulfato de sodio saturado, y almacenado en botellas de color ámbar de 20 ml, para posterior análisis fisicoquímico y cromatográfico. El proceso de extracción se realizó en 4 ciclos de 120 min cada uno, utilizando un total de 8 kg de materia prima deshidratada. Para cada ciclo se utilizó 2 kg de *S. graveolens*. El rendimiento del aceite esencial (% p/p) se determinó mediante la expresión:

$$P = (M_1/M_2) * 100$$

Donde: M_1 es la masa final del aceite esencial; M_2 la masa inicial del follaje; y 100 es un factor matemático.

2.4. Caracterización física

a) Preparación de la muestra

En un matraz Erlenmeyer se adicionó aceite esencial de *S. graveolens*, en una

cantidad no mayor al 66% del volumen total del matraz. Posteriormente se adicionó sulfato de magnesio recién desecado, neutro, igual a más o menos el 10% del peso del aceite esencial, se agitó vigorosamente y luego se filtró (Norma Técnica Peruana: NTP 319.077:1974). La muestra preparada se utilizó para los análisis respectivos.

b) Densidad por el método picnométrico

La densidad y densidad relativa fueron determinados según la Norma Técnica Peruana: NTP 319.081:1974. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Química General de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial-UNAMBA. Para la determinación de la densidad se procedió a pesar el picnómetro vacío y anotar el peso (P), utilizando una balanza analítica marca Chyo Balance Corp. modelo 305896. Luego fue pesado el picnómetro conteniendo agua destilada a aproximadamente 20°C. La densidad relativa ρ_{20} , en gramos por mililitro, se calculó con la siguiente fórmula:

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

Dónde: P es el peso (en g) del picnómetro vacío; P_1 el peso (en g) del picnómetro lleno con agua destilada a 20 °C; P_2 es el peso (en g) del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C.

c) Índice de Refracción

El análisis se realizó en el laboratorio de SERVILAB de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. El equipo utilizado fue refractómetro ABBE, marca Ivymen System, Modelo RI-71, cuyo principio es la relación de aire, sustancia medida a 20°C. A la muestra preparada se le verificó la acción del agente desecador por una serie de modificaciones del índice de refracción, después de cada desecado. (Norma Técnica Peruana: NTP 319.075:1974).

d) Poder Rotatorio

Este análisis se desarrolló en el laboratorio de SERVILAB de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. La determinación del poder rotatorio específico fue

realizado sobre el aceite esencial diluido en metanol 99% (Norma Técnica Peruana: NTP 319.076:1974). El poder rotatorio específico, de un aceite esencial, es el ángulo sobre el cual rotaría el plano de polarización de la luz si éste atravesara un espesor de 1 dm de una solución convencional de aceite esencial que contuviera 1 g de sustancia activa por mililitro. Se expresa en grados y minutos, a una temperatura conocida, generalmente 20°C, y en relación a una longitud de onda de luz señalada. Está dado por la siguiente expresión:

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

Donde: A es el ángulo de rotación observado (en grados); L es el espesor atravesado (en dm); V es el volumen de la solución (en mL); P es el peso de la sustancia disuelta (en g).

e) Solubilidad en etanol

Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Química General de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial-UNAMBA. A una probeta fue transferido 1 mL de muestra y posteriormente se agregó etanol de concentración de 50 a 96° GL, hasta un volumen máximo de 20 mL, agitándose constantemente en un agitador Vortex, marca Cenco Instruments, N° 34525-200. Obtenido la disolución translúcida, se anotó el volumen V de etanol utilizado. Si se producía turbidez antes de haber agregado los 20 mL de etanol, se anota el volumen V' con el que apareció la turbidez y eventualmente el volumen V'' con el cual desaparecía (Norma Técnica Mexicana: NMX-K-081-1976).

2.5. Análisis por cromatografía de gases

En una fiola se adicionó 10 µL de aceite esencial, aforándose con 10 mL de metanol, después de homogeneizar, se trasvasó a un vial de 1,5 mL para el análisis. La composición química del aceite se determinó en un cromatógrafo de gases, modelo HP 6890, Serie II, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975B Network

System, ambos provenientes de la firma Agilent Technologies. El detector trabajó en un rango de masas de hasta 800 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 260°C y 130°C respectivamente. Se utilizó una columna HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m x 0,25 mm de diámetro x espesor 0,5 µm). Helio fue usado como gas portador con un flujo de 1 mL/min a volumen constante, Presión 8,23 psi. La inyección fue realizada en un inyector del tipo "split splitless" a 260°C. 1 µL de solución de aceite esencial en metanol fue inyectado y analizado. La temperatura del horno del CG fue programada inicialmente a 60°C y luego hasta una temperatura final de 260°C a razón de 5°C/min. Tiempo de corrida 54,17min. La identificación de los compuestos se realizó con un sistema computarizado de datos MSD Chem Station (Versión D.02.00.275); mediante el uso combinado de la base de datos NIST v 5.0; pertenecientes a este sistema. Los padrones utilizados para comparar los tiempos de retención fueron padrones del aceite esencial de anís.

2.6. Actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial, frente a bacterias gram positivas como *S. aureus* y gram negativas como *E. coli* se aplicó la técnica microbiológica de difusión en agar en pocillo (Lis-Balchin *et al.*, 1998). Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros. La actividad antibacteriana también fue evaluada por la técnica de difusión por disco, sin embargo los resultados de esta técnica no fueron considerados, debido a que hubo pérdida de aceite esencial de *S. graveolens* en el momento de realizar el secado del disco y por la deficiente difusión del aceite en el mismo.

La actividad del aceite esencial de *S. graveolens* a diferentes concentraciones

(100, 90, 80, 70 y 60%) se clasificó en marcada, moderada, ligera o sin actividad, según los rangos de la escala de Toda *et al.* (1991). Para la disolución del aceite esencial se utilizó como disolvente caldo Mueller-Hinton. El ensayo se efectuó por triplicado y como control positivo se utilizó un antibiótico comercial, la amoxicilina. El medio de cultivo empleado para las cepas fue Agar Mac Conkey y Agar Sangre, esterilizados en autoclave a 121°C x 15 min. Las cepas de *E. coli* se incubó en agar Mac Conkey y la cepa de *S. aureus* en agar Sangre a 37°C + 2°C, permaneciendo en baño termostático marca Büchi modelo B-465, durante toda la noche para la obtención de cultivos jóvenes (18 – 24 h). Posteriormente se procedió a realizar la dilución de los cultivos en solución salina al 0,85% estéril, obteniéndose una densidad igual al 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Las placas que contenían Agar Mueller-Hinton fueron inoculadas con la suspensión microbiana, eliminándose el líquido sobrenadante con un hisopo de algodón estéril, seguidamente se extendió por la superficie del agar en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo. A cada placa se colocó el disco del antibiótico, y por placa fueron perforados 5 orificios de 5 mm de diámetro cada uno utilizando un sacabocado estéril. A estos orificios se le añadió 15 µL de cada una de las concentraciones de aceite esencial y las placas se incubaron a 37 °C ± 2 °C por 24 h. Este procedimiento fue seguido para cada microorganismo. Transcurrido el periodo de incubación se observó la formación de halos de inhibición procediendo a registrar los diámetros en mm.

Se empleó un diseño experimental de bloques completo al azar (DBCA) con 3 réplicas para cada variante estudiada. La evaluación estadística se realizó mediante un análisis de varianza, la única fuente de variabilidad son los tratamientos y los

bloques son completos porque todos los tratamientos aparecen en igual número. Se empleó la prueba de rango múltiple de Duncan para la comparación de las medias, a un nivel de significancia de 5%.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción por arrastre con vapor

El peso obtenido del aceite esencial de *S. graveolens* fue de $100,8 \pm 0,01$ g, con rendimiento de $1,26 \pm 0,01$ % p/p. Este valor corresponde al rendimiento de aceites esenciales relatado en la literatura científica. En general, el rendimiento de la extracción de aceites esenciales es bajo, variando entre 0,01 % y 2,00 % (Zekaria, 2006).

Algunos autores informan rendimientos para aceites esenciales, tales como Muña 0,19 % p/p (Cano, 2007), Ruyaq muña 2,4 % v/p (Carhuapoma *et al.*, 2009); Orégano 1,30 % v/p (Albado *et al.*, 2001); Eucalipto 3 % v/p (Libertad *et al.*, 2001); Salvia 0,80 % v/p (Ricciardi y Ricciardi, 2000). De acuerdo a los resultados obtenidos el rendimiento para aceite esencial de *S. graveolens* fue 1,26 % p/p (1,44% v/p), valor superior al aceite esencial de muña, salvia y orégano, pero inferior al aceite esencial de eucalipto.

La variación en el rendimiento de aceites esenciales es influenciada por factores tales como el origen, especie y órgano de la planta, condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, tierra de cultivo), así como el método de extracción y la forma de almacenamiento del aceite (Blanco y Agudelo, 2007; Zekaria, 2006).

Pocos son los estudios reportados sobre la composición del aceite esencial de la especie *S. graveolens*. Pérez *et al.* (1999) relatan rendimiento de 0,57% v/p para aceite esencial obtenido a partir de hojas de *S. graveolens* Wedd (*Compositae*) por hidrodestilación. Otros autores relatan valores de rendimiento para dos especies del género Senecio: *S. subpanduratus* 0,81 % v/p y *S. mustesii* 0,72% v/p, obtenidos

por hidrodestilación, a partir de hojas y tallos frescos (Arancibia *et al.*, 2010).

Aceite esencial de *S. pandurifolius* fue extraído por hidrodestilación a partir de hojas, flores y tallos con rendimientos de 0,24% v/p, 0,15% v/p y 0,19 v/p respectivamente, observándose diferencias en los rendimientos en función a los órganos de la planta (Kahrman *et al.*, 2011).

Mishra *et al.* (2011) obtuvieron aceite esencial de *S. rufinervis* para hojas y tallos deshidratados con rendimientos de 0,5% (p/p) y 0,4% (p/p) respectivamente, siguiendo las mismas condiciones de extracción del presente trabajo, verificandose diferencias significativas de rendimiento en relación a la especie evaluada (1,26 % p/p).

Probablemente el método de secado y extracción influyó en el rendimiento del aceite esencial para las especies *S. subpanduratus* y *S. mustesii*, estudiadas por Arancibia *et al.* (2010); *S. rufinervis* relatado por Mishra *et al.* (2011), *S. graveolens* Wedd (*Compositae*) reportado por Pérez *et al.* (1999) y *S. graveolens* evaluado en el presente estudio.

El mayor rendimiento obtenido para *S. graveolens* en el presente estudio puede haber sido influenciado por el método de extracción, destilación por arrastre con vapor, el cual presenta la ventaja de producir menor hidrólisis en relación a la hidrodestilación. Bandoni (2000) relata que en la presencia de agua y principalmente a altas temperaturas pueden ocurrir reacciones que favorecen la formación de compuestos, como alcoholes y ácidos por descomposición de los ésteres, causantes de disminución en la producción del aceite, siendo una de las desventajas de la hidrodestilación, dado que la cantidad de agua presente en la extracción puede producir mayor hidrólisis.

Pierozan *et al.* (2009) relata que el proceso de secado de la muestra es otro factor de importancia en el rendimiento del aceite esencial, debido a que durante el cortado se

rompen células que contienen aceite esencial y en el secado se pierden debido a su alta volatilidad.

En el presente estudio el método de extracción probablemente influyó en el mayor rendimiento obtenido para *S. graveolens* y adicionalmente al método de extracción se sumarían el área de cultivo, especie, edad de la planta y factores genéticos (Pierozan *et al.*, 2009).

3.2. Análisis físico del aceite esencial de *S. graveolens*

Las características físicas del aceite esencial de *S. graveolens* fueron: densidad (20 °C) $0,8756 \pm 0,12$ g/mL; índice de refracción (20 °C) $1,4726 \pm 0,02$; índice de rotación $102^{\circ}85' \pm 0,04$; y soluble en etanol 85° , 90° y 96° .

La densidad del aceite obtenido por destilación con arrastre de vapor fue semejante al relatado por Pérez *et al.* (1999) que obtuvieron 0,873 g/mL para *S. graveolens* Wedd (*compositae*) extraído por hidrodestilación. El valor obtenido es comparable con la literatura científica, la densidad del aceite esencial de *S. graveolens* es menor que la densidad del agua; está en el promedio en comparación a otros aceites esenciales de especies obtenidos por diferentes métodos de extracción, tales como, limón 0,8534 g/mL destilación por arrastre con vapor (Albaladejo, 1999), jengibre 0,877 g/ml extracción por arrastre con vapor (Vásquez *et al.*, 2001) y salvia morada 0,8843 g/mL extracción por hidrodestilación (Ricciardi y Ricciardi, 2000); y con valor por debajo del aceite esencial de Muña 0,9189 g/ml (Cano, 2007) y Orégano 0,9232 g/ml (Albado *et al.*, 2001) extraídos por destilación con arrastre de vapor. El resultado de densidad del presente trabajo indicaría calidad y pureza del aceite extraído, no siendo influenciado por el método de extracción en comparación a otras especies pero si probablemente por la naturaleza de la planta y condiciones climáticas del área geográfica de procedencia (Albaladejo, 1999).

Los resultados de la evaluación sensorial del aceite esencial de *S. graveolens* se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Características sensoriales del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

Característica	Descripción
Aspecto	Líquido oleoso
Color	Ligeramente amarillo
Olor	Fuerte, característico de la planta
Sabor	Picante

El índice de refracción del aceite esencial de *S. graveolens* a 20 °C fue similar a los valores relatados para aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas: orégano 1,4774 (Albado *et al.*, 2001); muña 1,4727 (Cano, 2007); salvia morada 1,4916 (Ricciardi y Ricciardi, 2000); arrayan 1,4774 (Carhuapoma *et al.*, 2009). Según Albaladejo (1999) el índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura y es directamente proporcional a la densidad. Este parámetro, varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y con la temperatura y es referido a la longitud de onda correspondiente a la línea D 589,3 nm de la luz del sodio.

El valor de rotación óptica obtenida, $102^{\circ}85' \pm 0,04$, para el aceite esencial de *S. graveolens* fue superior a los resultados de rotación específica a 20°C de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas, tales como muña $+3^{\circ}45'$ (Cano, 2007), arrayan $+6^{\circ}8'$ (Carhuapoma *et al.*, 2009), salvia $-21,26^{\circ}$ (Ricciardi y Ricciardi, 2000), limón $+62,98^{\circ}$ (Albaladejo, 1999). Las diferencias de valores de rotación óptica entre muestras aromáticas probablemente esté relacionada a la presencia de componentes mayoritarios. Así, para *S. graveolens* la presencia de proporciones de Sabineno y (+)-4-careno serían responsables del alto valor de rotación óptica obtenido. La comparación de los datos obtenidos (Tabla 3) con los reportados en la literatura, presentó en su

perfil químico a los hidrocarburos monoterpénicos como los principales componentes de los aceites esenciales al igual que varias especies del género *Senecio* (Kahrman *et al.*, 2011; Benites *et al.*, 2011; Lawal y Oyedeji, 2009).

En relación a la solubilidad del aceite esencial de *S. graveolens*, los volúmenes gastados fueron 4.2 ml para 96°; 5.7 ml para 90° y 8.1 ml para 85° de alcohol etílico, gastos de volumen similares a lo relatado por Calvarano *et al.* (1988), comprendidos entre 5,0 y 8,5 volúmenes de alcohol de 90 % (v/v) a 20 °C para aceite esencial de limón. En la solubilidad de los aceites esenciales en solventes orgánicos, se emplean normalmente disoluciones de alcohol etílico de elevada graduación alcohólica, comprendidas entre 80 y 96%, y la solubilidad será tanto mayor cuanto mayor sea la riqueza en componentes oxigenados (Albaladejo, 1999). De acuerdo al perfil cromatográfico, la muestra estudiada presentó en su composición a hidrocarburos monoterpénicos como componentes mayoritarios requiriendo para su solubilidad alcohol etílico de mayor graduación.

3.3. Caracterización del aceite esencial por cromatografía

La identificación de los componentes del aceite esencial de *S. graveolens* y sus cantidades relativas, por el análisis de Cromatografía de Gases, es presentada en la Tabla 2. De los 20 componentes separados en el aceite esencial (Figura 1), 19 fueron identificados y representan el 99,75% de la composición relativa, de los cuales, cuatro constituyen hidrocarburos monoterpénicos (74,44%) y tres compuestos oxigenados (11,48%), representando cuantitativamente la mayor proporción del aceite esencial. El componente mayoritario fue el hidrocarburo monoterpénico sabineno (52,39%) seguido de (+)-4-careno (8,20%), τ -terpineno (7,11%), β -myrceno (6,74%), y algunos monoterpénicos con grupos funcionales, tales como, 5-

isopropil-2-metilbiciclo [3.1.0] hexano-2-ol (3,78%), 4-terpineol (3,78%) y pulegona (3,67%). Estudios relacionados a la composición química de aceites esenciales del género *Senecio*, relatan cómo constituyentes principales a los monoterpenoides y sesquiterpenoides (Lawal y Oyedeji, 2009; Benites *et al.*, 2011; Kahriman *et al.*, 2011).

Tabla 2

Composición química del aceite esencial de *S.graveolens*; en concordancia con la Biblioteca NIST v 5.0.

Compuestos	Cantidad relativa (%)	Número de compuestos
<i>Hidrocarburos monoterpenos</i>	80,11	8
α -felandreno	1,40	
4-metil-1-(1-metiletil)-, didihidro deriv, biciclo [3.1.0] hexano	2,30	
Sabineno	52,39	
β -mirceno	6,74	
(+)-4-careno	8,20	
ρ -cimeno	1,33	
<i>trans</i> - β -ocimeno	0,64	
τ -terpineno	7,11	
<i>Monoterpenos oxigenados</i>	15,46	7
5-isopropil-2-metilbiciclo [3.1.0] hexano-2-ol	4,03	
Cis-1-metil-4-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ol	0,39	
Mentona	1,26	
4-Terpineol	3,78	
Estragol	1,72	
Pulegona	3,67	
δ -cadineno	0,61	
<i>Hidrocarburos sesquiterpenos</i>	1,58	2
Naptaleno, 1,2,4a,5,6,8a - hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)	0,86	
Ciclohexano,1-etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)-4-(1-metiletilidene)-	0,72	
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>	1,06	1
Ácido 1,2 -benzenodicarbóxico, di(2-metilpropil) éster	1,06	
<i>Compuestos relacionados a terpenos</i>	0,51	1
2,2-dimetoxibutano	0,51	
<i>Sin identificar</i>	1,03	1
Total	99,75	20

El análisis del aceite esencial de *S. graveolens* mostro una composición predominante de monoterpenoides, similar a los resultados obtenidos por Benites *et al.* (2011) para aceite esencial de

S.atacamensis Phil. y Lawal y Oyedeji (2009) para aceite esencial de *S. polyanthemoides* Sch. Bip.

Estudios relacionados con la composición de algunas especies del género *Senecio* relatan al sabineno como uno de los principales componentes. Niemeyer y Teillier (2007) identificaron para el aceite esencial de *S. nutans* Sch Bip, proveniente de la región Arica-Parinacota (Chile), principalmente 4-terpinenol (23,7%), metil cinamato (11,4%) y sabineno (10,3%). Los mismos autores identificaron como principales componentes para el aceite esencial de *S. nutans* Sch Bip, procedente de Arequipa (Perú), hidrocarburos monoterpenos, tales como α -felandreno (15,5%), α -terpineno (15,1%), sabineno (13,3%), δ -3-careno (8,8%) y ρ -cimeno (8,8%). A diferencia de estos resultados, Benites *et al.* (2011) observaron que en la composición del aceite esencial de *S. atacamensis* de la región Tarapacá (Chile), los componentes sabineno y δ -3-careno eran casi inexistentes.

Diferencias relacionadas a la composición del aceite, en cuanto al contenido de sabineno y la presencia de otros componentes minoritarios pueden explicarse por variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta y condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima) que pueden producir en el aceite cambios cualitativos y cuantitativos (Sánchez *et al.*, 2009).

3.4. Actividad antibacteriana

El aceite esencial de *S. graveolens* mostró actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*, inhibiendo el crecimiento, con formación de halos de inhibición de 23,67 y 29,33 mm de diámetro, en concentraciones de 100%; 13,33 y 20,67 mm de diámetro, en concentraciones de 90%; y 7,67 y 10 mm de diámetro, respectivamente, en concentraciones de 80%.

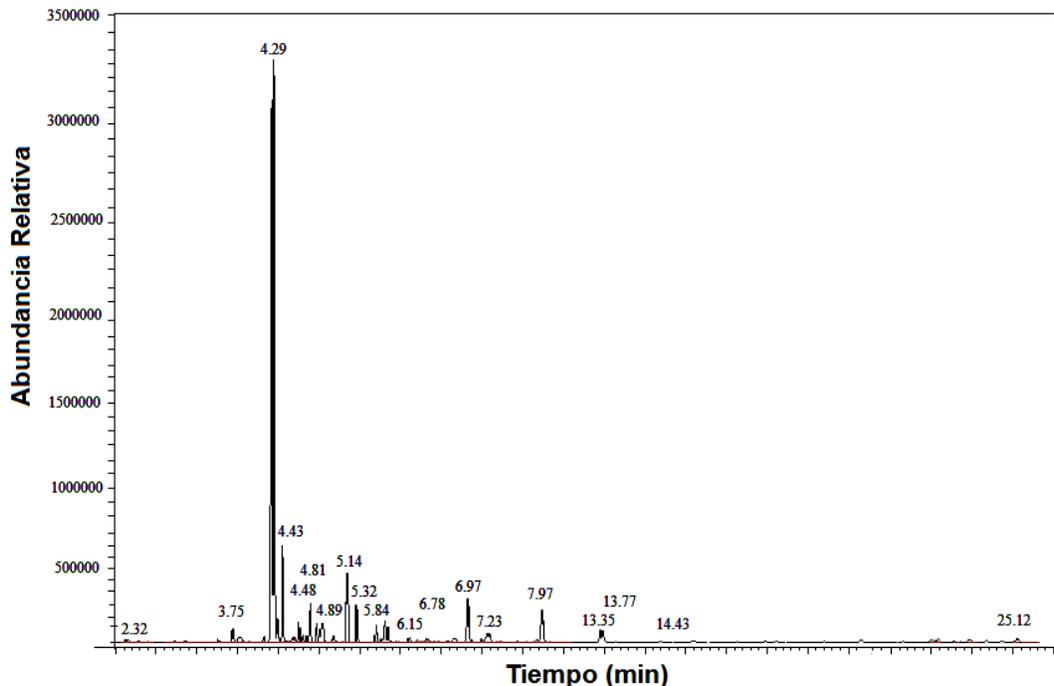


Figura 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd.

Sin embargo, no se observó actividad cuando se utilizó aceite de *S. graveolens*, en concentraciones de 70% y 60% y no hubo formación de halos de inhibición alrededor del pocillo. Las concentraciones de aceite esencial de *S. graveolens* difirieron en la inhibición de los microorganismos ($p < 0,05$). En la Tabla 3 se aprecia que la inhibición bacteriana del aceite esencial de *S. graveolens* en concentración de 100% fue mejor en relación a 90 y 80% de concentración. Los resultados muestran que conforme disminuye la concentración de aceite también disminuye la inhibición de los microorganismos. El aceite esencial de *S. graveolens* presentó marcada actividad frente a *S. aureus* y moderada actividad frente a *E. coli* para las concentraciones de aceite de 100, 90 y 80%, y este mismo comportamiento fue observado para el control de amoxicilina. El aceite esencial de *S. graveolens* a concentración de 100% resultó ser mejor que el antibiótico en 139,24% probado en *E. coli* y 86,26% probado en *S. aureus*, evidenciando su potencialidad y posible uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas.

Tabla 3

Halos de inhibición bacteriana frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *S. graveolens*.

Concentración del aceite esencial %	Halos de inhibición (mm) *	
	Bacterias indicadoras	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	23,67 ± 0,33 ^a	29,33 ± 0,67 ^d
90	13,33 ± 0,33 ^{bf}	20,67 ± 0,67 ^e
80	7,67 ± 0,33 ^c	10,33 ± 0,33 ^{fc}
70	0	0
60	0	0
Amoxicilina (control positivo)	17 ± 0,01 ^g	34 ± 0,01 ^h

*Valores representan promedio ± desviación estándar; n = 3. Promedios de cada fila con diferente letra difiere significativamente ($p < 0,05$), de acuerdo al test de comparación de promedios de Duncan.

La literatura científica relata que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de terpenoides, seguido por terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen grupos aldehídos y por último los que contienen grupos cetónicos (Sánchez *et al.*, 2009; Lawal y Oyedeji, 2009). Algunos autores plantean que los aceites

con un alto porcentaje de compuestos monoterpénicos poseen significativas propiedades antimicrobianas (Benites *et al.*, 2011; Lawal y Oyediji, 2009; Sánchez *et al.*, 2009).

Entre los monoterpenos a los que se le atribuye propiedades antibacterianas, podemos citar a α -terpineno, α -felandreno, p-cimeno, sabineno, entre otros (Benites *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2009); algunos de los cuales están presentes en proporción considerable en el aceite de *S. graveolens* estudiado, cuyo componente principal es el sabineno, monoterpénoide que representa el 52,39% de su composición total.

Considerando las investigaciones realizadas por autores y los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede atribuir la actividad antibacteriana del aceite de *S. graveolens* a sus terpenoides, principalmente los componentes monoterpénicos, siendo que la mayor contribución a este efecto probablemente se deba al sabineno.

Teniendo en cuenta la presencia de diferentes compuestos químicos en los aceites esenciales, es probable que la actividad antibacteriana sea atribuible a la concentración química de los principales componentes, pero también a la existencia de componentes minoritarios en el aceite esencial. Químicamente, el aceite esencial es una mezcla compleja conteniendo una amplia variedad de compuestos, lo cual nos permite fundamentar que el efecto antimicrobial observado en el aceite esencial de *S. graveolens*, probablemente sea resultado de la actividad de varios compuestos, o bien del efecto sinérgico potencial que existiría entre ellos. Según Jiang *et al.* (2011) esta complejidad en la composición química es lo que dificulta explicar la actividad biológica del aceite esencial.

A pesar del mecanismo de acción de los terpenos no estar claramente definido, esto envolvería la ruptura de la membrana por compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). Algunos autores plantean que la actividad bactericida se debe, fundamentalmente, a la sobrecarga a la que es sometida la

membrana celular de los microorganismos, provocándole pérdida del control y de su integridad (Maguna *et al.*, 2006; López, 2006; Griffin, 1979). Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumento de la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, desestabilidad estructural de la membrana y desestabilidad del empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos provocaría la muerte de la célula bacteriana (Sánchez *et al.*, 2009).

La utilización de plantas pertenecientes al género *Senecio* como medicinales es debido a la presencia de diferentes clases de metabolitos secundarios, puesto que son ricos en monoterpénicos, sesquiterpenoides, flavonoides, entre otros. Por otro lado, las actividades biológicas comprobadas para estas especies son variadas, tales como, propiedades insecticidas, actividades antimicrobiana, citotóxica, antiviral y antioxidante (Francescato *et al.*, 2007) y el aceite esencial derivado de sus diferentes órganos (hojas, tallos y flores) presentan variaciones en su composición química. *S. graveolens* Wedd, conocida como "chachacoma", crece como arbusto en el sur de Brasil, y en los andes de Argentina, Chile y Perú. Bajo este contexto fue propuesto determinar la composición química del aceite esencial extraído de hojas y tallos de *S. graveolens* Wedd colectado en la región de Puquio, Perú y seguidamente explorar su actividad antimicrobial frente a bacterias patógenas humanas, gram negativo (*E. coli*) y gram positivo (*S. aureus*). Ambos microorganismos son morfológica y fisiológicamente diferentes, evidenciado en los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del aceite. La *E. coli* fue más resistente a la acción del aceite y esta resistencia ha sido relacionado con la estructura de la pared celular, arreglo de membrana y tipo de aceite esencial (Gao *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2000). Así mismo, la actividad

antibacterial del aceite de *S. graveolens* estaría relacionada con la composición química de los compuestos principales, denominados monoterpenoides, como también con la presencia de componentes menores en el aceite esencial, o la existencia de sinergismo entre ellos, influenciado por condiciones ecológicas en que se desarrolla la planta, condiciones de extracción del aceite y factores genéticos. Las infecciones alimentarias causadas por estas bacterias significan alta morbilidad y mortalidad, aumento del tiempo de internación y el consiguiente incremento del costo hospitalario, por lo cual resulta necesaria la toma de acciones para su control. Siendo requerido realizar nuevas investigaciones que permitan determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite frente a cada bacteria; entretanto los resultados obtenidos en el presente estudio servirán de punto de inicio para futuras investigaciones.

4. Conclusiones

El aceite esencial extraído de la especie *S. graveolens* Wedd, por destilación por arrastre con vapor de agua, presento un alto rendimiento. El perfil cromatográfico obtenido para el aceite esencial mostro principalmente composición de monoterpenos y monoterpenos oxigenados, siendo el sabineno el componente mayoritario. Fue demostrada la actividad antibacterial promisorio del aceite esencial de *S. graveolens* frente a las bacterias evaluadas. Nuevos plaguicidas basados en este aceite podrían constituir una alternativa eficaz y ambientalmente segura para el control de enfermedades bacterianas y ser probable alternativa económica para el agricultor de la zona.

Referencias bibliográficas

- Albado, E.; Saenz, G.; Grabiell, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana* 12(1): 16 – 19.
- Albaladejo, Q. 1999. El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. España.
- Arancibia, L.; Naspi, C.; Pucci, G.; Arce, M. 2010. Plantas aromáticas de la Patagonia: Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Senecio mustersii* y *Senecio subpanduratus*. *Boletín Latinoamericano de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(2): 123-126.
- Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.
- Benites, J.; Bravo, F.; Rojas, M.; Fuentes, R.; Moiteiro, C.; Florencia V. 2011. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil. from Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society* 56(2): 712 – 714.
- Blanco, K. M.; Agudelo, A. J. 2007. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Lippia alba* Mill N. E. Brown ex Britton & Wills cultivada con tres tipos de *compost*. Trabajo de Grado para optar el Título de Químico. Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga-Colombia.
- Calvarano, M.; Calvarano, I.; Di Giacomo, A. 1988. Caratteristiche e composizione dell' essenza di limone prodotta industrialmente in Italia da frutti "invernali". *Essenze Derivati Agrumari* 58(4): 367 – 368.
- Cano, C.A. 2007. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña". Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Lima - Perú.
- Carhuapoma, M.Y.; López, S. G.; Roque, M. A.; Billie, V.; Bell, C.C.; Whu, D. W. 2009. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "RUYAQ MUÑA". *Ciencia e Investigación* 12(2): 83-89.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cox, S.; Mann, C.; Markham, H.; Bell, H.; Gustafson, J.; Warmington, J.; Wyllie S. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- Delgado, A.W.; Cuca, S.L.E. 2007. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. *Revista Productos Naturales* 1(1): 5-8.
- Gao, Ch.; Tian, Ch.; Lu, Y.; Xu, J.; Luo, J.; Guo, X. 2011. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria. *Food Control* 22: 517-522.
- Griffin, S. 1979. Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. *Physic Bulletin* 30: 262.
- González, C.; Bada, C.; Rojas, R.; Bernaola, G.; Chávez, C. Guía Clínica: Guía de práctica sobre el diagnóstico y tratamiento de la diarrea aguda infecciosa en Pediatría Perú. 2011. *Revista Gastroenterología del Perú* 31(3): 258 – 277.
- Jiang, Y.; Wua, N.; Fua, Y-J.; Wang, M.; Luo, M.; Zhao, Ch-J.; Zu, Y-G.; Liu, X-L. 2011. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil from Chile. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 56(2): 712 – 714.
- Kahriman, N.; Tosun, G.; Terzioglu, S.; Karaoglu, S.; Yayh N. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the

- Flower, Leaf, and Stem of *Senecio pandurifolius*. Records of Natural Products 5(2): 82 – 91.
- Kordali, S.; Kotan, R.; Mavi, A.; Cakir, A.; Ala, A.; Yildirim, A. A. 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 9452 – 9458.
- Lawal, A.; Oyedeji, A. 2009. Chemical of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two *Senecio polyantheoides* Sch. Bip. Samples South Africa. Molecules 14: 2077 – 2086.
- Libertad, A.; Morales, L.; Armas, L. 2001. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina, UNMSM 62: 156 – 161.
- Lis-Balchin M.; Deans, S.G.; Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal 13: 98 – 104.
- López, L. 2006. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Fitoterapia 25(1): 74 – 77.
- Maguna, F. P.; Romero, A. M.; Garro, O. A.; Okulik, N. B. 2006. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Exactas n.62. Disponible en <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/>
- Mesa, A.C.; Montiel, J.; Martínez, C.; Zapata, B.; Pino, N.; Bueno, J.G.; et al. 2007. Actividad in vitro anticandida y anti-*Aspergillus* de aceites esenciales de plantas de la familia Piperaceae. Scientia et Technica 13: 247 – 249.
- Mishra, D.; Joshi, S.; Sah, S.; Dev A.; Bisht, G. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential of *Senecio rufinervis* DC. (Asteraceae). Indian Journal of Natural Products and Resources 2(1): 44 – 47.
- Francescato, L.; Deuschle, N.; Mallmann, A.; Alves, S. Heinzmann, B. 2007. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichus* DC (Asteraceae). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 43(2): 239 – 245.
- Niemeyer, S.; Teillier, S.; Arredondo, S. 2007. Aromas de la flora nativa de Chile. Universidad de Chile. 448p.
- Norma Técnica Peruana: NTP 319.077. 1974. Aceites esenciales. Preparación de la muestra para análisis. INDECOPI (ex ITINTEC). Perú.
- Norma Técnica Peruana: NTP 319.081. 1974. Aceites esenciales. Determinación de la densidad y la densidad relativa. INDECOPI (ex ITINTEC). Perú.
- Norma Técnica Peruana: NTP 319.075. 1974. Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción. INDECOPI (ex ITINTEC). Perú.
- Norma Técnica Peruana: NTP 319.076. Determinación del poder rotatorio específico y de la desviación polarimétrica. 1974. INDECOPI (ex ITINTEC). Perú.
- Norma Técnica Mexicana: NMX-K-081. 1976. Determinación de la solubilidad en etanol de aceites esenciales y productos aromáticos. Dirección General de Normas. México.
- Oliveira, L.H.W.; Ehringhausm, Ch.; Yoskio, P.K. 2004. Genetic diversity of *Pimenta longa* genotypes (*Piper spp.*, *Piperaceae*) of the Embrapa Acre germplasm collection. Genetics & Molecular Biology 27: 74-82.
- Pérez, C.; Agnese, A.; Cabrera, J. 1999. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity test. Journal of Ethnopharmacology 66: 91 – 96.
- Pierozan, M.K.; Pauletti, G.F.; Rota, L.; dos Santos, A.; Lerini, L.A.; Di Luccio, M.; Mossi, A.J.; Atti-Serafini, C.L.; Vladimiroliveira, J. 2009. Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de distintas espécies de salvia L. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 29(4): 764 – 770.
- Ramírez, L.S.; Isaza, J.; Veloza, L.A.; Stashenko, E.; Marín, D. 2009. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. Ciencia 17(4): 313 – 321.
- Ricciardi, G.; Ricciardi, A. 2000. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de “salvia morada” de Sáenz Peña (Chaco). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE; Exactas, n.11. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2001/cyt.htm>
- Sánchez, Y.; Pinooriella, M.; Correa. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum kunth* (caisimón de anís). Revista de Protección Vegetal 24(1): 39 – 46.
- Salvador, F.; Angeles, A.; Segundo, R. 2009. Tres nuevos registros del género *Carex* (Cyperaceae) para el Perú y adiciones a la flora andina del departamento de Huánuco. UNMSM, Perú.
- Toda M.; Okubo, S.; Mara, Y.; Shimamura, T. 1991. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Japanese Journal of Bacteriology 46(5): 845 – 849.
- Vásquez, R.; Alva, A.; Valles, J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber Officinale*). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria 1(1): 38 – 42.
- Villagrán, C.; Romo, M.; Castro, V. 2004. Etnobotánica del sur de los Andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas Altiplánicas y las de quebradas altas del Loa Superior, *Chungara*. Revista de Antropología Chilena 35: 73 – 124.
- Zekaria, D. 2006. Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos. Disponible en: http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf.