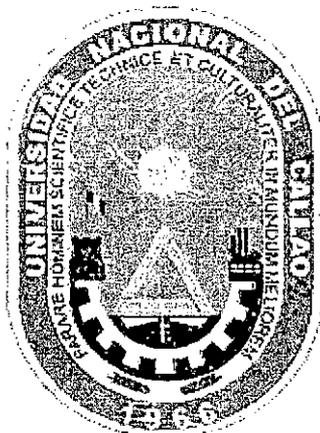


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



*“CARACTERIZACION FISICOQUÍMICA DEL ACEITE ESSENCIAL
DE LA MUÑA (MINTHOSTACHYS SETOSA) Y SU ESTUDIO
ANTIBACTERIANO”*

TESIS DIRIGIDO A LA OBTENCION DEL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUIMICO

AUTOR: BACH. HELIDA ELIZABETH CAMACHO MARTINEZ

ASESORADA POR: ING. LUIS CARRASCO VENEGAS

CALLAO - PERU

2011

PROLOGO DE LA SUSTENTACION DE LA TESIS

La presente tesis fue sustentada ante el jurado de sustentación de tesis conformado por los siguientes Docentes:

| | | |
|------------------------------------|---|------------|
| Ing. Lida Carmen Sanz Falcon | : | Presidente |
| Ing. Viorica Stanciuc Stanciuc | : | Secretaria |
| Ing. Maria Estela Toledo Palomino | : | Vocal |
| Ing. Luis Américo Carrasco Venegas | : | Asesor |

Tal como está sentado en el libro de actas de Sustentación de Tesis No 2, Folio No 40, Acta No 224 de fecha 09 de mayo del 2011 para optar el Título profesional de Ingeniero Químico .

*Esta Tesis se la dedico a mi familia,
que representa el gran motor de mi vida y
a George Onida R. S.M., por ser nuestro
Guía y el Guardián de nuestras vidas.*

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN

| | |
|-------------------------------------------------------------|---|
| 1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA | 2 |
| 1.2 ENUNCIADO DEL PROBLEMA | 3 |
| 1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN PARA LA TESIS | 3 |
| 1.3.1 OBJETIVO GENERAL | 3 |
| 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| 1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN | 4 |
| 1.5 ANTECEDENTES VINCULADOS A LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN | 5 |
| 1.6 FORMULACIÓN DE HIPOTESIS. | 8 |
| 1.6.1 HIPOTESIS GENERAL | 8 |

II. MARCO TEÓRICO

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Descripción de la Genero <i>Minthostachys</i> | 9 |
| 2.1.1 Taxonomía | 9 |
| 2.1.2 Distribución geográfica. | 10 |
| 2.1.3 Descripción botánica. | 11 |
| 2.1.4 Disponibilidad del genero <i>Minthostachys</i> en el mercado | 13 |
| 2.2 Principales Usos del Genero <i>Minthostachys</i> | 16 |
| 2.2.1 Uso alimenticio | 16 |
| 2.2.2 Uso medicinal | 16 |
| 2.2.3 Uso agrícola | 16 |
| 2.2.4 Uso veterinario | 17 |
| 2.3 Aceites Esenciales | 17 |
| 2.3.1 Definición | 17 |
| 2.3.2 Distribución y estado natural | 18 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.3 | Función de los Aceites esenciales | 20 |
| 2.3.4 | Clasificación de los aceites esenciales | 21 |
| 2.3.4.1 | Por su origen | 21 |
| 2.3.4.2 | Por su composición química | 22 |
| 2.3.4.3 | Por su punto de ebullición | 24 |
| 2.3.4.4 | Según su empleo | 25 |
| 2.3.5 | Procesos de obtención de aceites esenciales | 26 |
| 2.3.5.1 | Recolección | 26 |
| 2.3.5.2 | Secado | 27 |
| 2.3.5.3 | Extracción del aceite esencial | 28 |
| 2.3.6 | Toxicidad de los aceites esenciales | 32 |
| 2.3.7 | Uso industrial de los aceites esenciales | 35 |
| 2.3.7.1 | Industria de los alimentos | 35 |
| 2.3.7.2 | Industria farmacéutica | 36 |
| 2.3.7.3 | Industria de cosméticos | 36 |
| 2.3.7.4 | Industria de productos de uso veterinario | 37 |
| 2.3.7.5 | Desodorantes industriales | 37 |
| 2.3.7.6 | Aromaterapia | 37 |
| 2.3.8 | Uso del aceite esencial de muña | 38 |
| 2.3.9 | Influencia de los factores externos en la producción de aceites esenciales | 39 |
| 2.3.10 | Métodos de análisis de aceites esenciales | 40 |
| 2.3.11 | Actividad antibacteriana de los aceites esenciales | 43 |
| 2.3.11.1 | Determinación del crecimiento de poblaciones bacterianas | 46 |
| 2.3.11.2 | Pruebas de sensibilidad | 48 |
| 2.3.11.3 | Medida del número de individuos | 50 |
| 2.3.11.4 | Cultivo en sistemas cerrados | 53 |

III. PARTE EXPERIMENTAL

| | | |
|------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. | Materiales, Equipos y reactivos. | 57 |
| 3.2. | Preparación del material para la extracción del aceite esencial | 60 |
| 3.3. | Extracción del aceite esencial. | 60 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.Preparación del aceite esencial para análisis. | 60 |
| 3.5. Determinaciones físicas. | 61 |
| 3.5.1. Determinación de la Densidad Relativa. | 61 |
| 3.5.2. Determinación de la Desviación Polarimétrica. | 61 |
| 3.5.3. Determinación del Índice de Refracción. | 61 |
| 3.5.4. Determinación de la solubilidad en etanol. | 61 |
| 3.5.5. Determinación del residuo por evaporación. | 62 |
| 3.6. Determinaciones químicas. | 62 |
| 3.6.1. Determinación del Índice de Ester. | 62 |
| 3.6.2. Determinación del Índice de Acidez. | 62 |
| 3.6.3. Determinación del contenido de fenoles. | 63 |
| 3.6.4. Identificación y Cuantificación de los componentes del Aceite Esencial de <i>Minthostachys setosa</i> (Muña) por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas | 63 |
| 3.7.Determinación del Efecto Antibacteriano. | 64 |
| 3.7.1. Preparación del Inóculo. | 64 |
| 3.7.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. | 65 |
| 3.7.3. Prueba de sensibilidad. | 65 |

IV. RESULTADOS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.Preparación del material para la extracción del aceite esencial. | 67 |
| 4.2. Extracción del aceite esencial. | 67 |
| 4.3. Determinaciones físicas. | 73 |
| 4.3.1 Determinación de la Densidad Relativa, Desviación Polarimétrica Índice de Refracción | 73 |
| 4.3.3 Determinación de la solubilidad en etanol. | 74 |
| 4.3.4 Determinación del residuo por evaporación. | 74 |
| 4.4 Determinaciones químicas. | 75 |
| 4.4.1 Determinación del Índice de Ester. | 75 |
| 4.4.2 Determinación del Índice de Acidez. | 75 |
| 4.4.3 Determinación del contenido de fenoles. | 75 |

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.4 | Identificación y Cuantificación de los componentes del Aceite Esencial de <i>Minthostachys setosa</i> (Muña) por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas. | 76 |
| 4.5 | Determinación del Efecto Antibacteriano. | 78 |
| 4.5.1 | Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. | |
| A. | <i>Enterococos faecalis</i> | 78 |
| B. | <i>Escherichia coli</i> | 82 |
| C. | <i>Pseudomona aureuginosa</i> | 86 |
| D. | <i>Staphylococos aureus</i> | 90 |
| E. | <i>Streptococos mutans</i> | 94 |
| 4.5.2. | Prueba de sensibilidad | |
| A. | <i>Enterococos faecalis</i> | 98 |
| B. | <i>Escherichia coli</i> | 99 |
| C. | <i>Pseudomona aureuginosa</i> | 100 |
| D. | <i>Staphylococos aureus</i> | 101 |
| E. | <i>Streptococos mutans</i> | 102 |
| V. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 103 |
| VI. | CONCLUSIONES | 109 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 110 |
| VIII. | FUENTES DE INFORMACION CONSULTADAS. | 111 |
| IX. | APENDICE. | 121 |
| X. | ANEXOS. | 128 |

Un agradecimiento muy especial a:

*Ing. Msc. Ana Siccha M.
Blgo. Msc. Edgar Zarate S.*

*Por su colaboración desinteresada en la
realización de esta Tesis, que sin el valioso
aporte de sus conocimientos no se hubiera realizado.*

Prologo

Las plantas medicinales y/o aromáticas han sido y son usadas no solo en las comunidades campesinas desde tiempos pre-incaicos, sino también están presentes en la alimentación diaria a nivel nacional y mundial, en especial por personas que buscan encontrar en ellas una calidad de vida superior a la que hasta hace poco se conocía, pero cabe resaltar que muchas plantas medicinales son empleadas en su forma tradicional, dado que son pocas de las que se han realizado investigaciones y por ende dado a conocer sus principios activos.

Una de estas plantas medicinales es la muña (*Minthostachys setosa*), la que es empleada como remedio para las afecciones estomacales, respiratorias, antiinflamatorio, antiséptico, etc.

Es de vital importancia que el consumo se realice de forma responsable y orientado a la industrialización de nuestros recursos naturales y debido a esto se realizó esta investigación caracterizando física y químicamente el aceite esencial de muña, así como también establecer las concentraciones mínimas inhibitorias en las que el aceite esencial es activo frente a bacterias de importancia médico y alimentario.

I. INTRODUCCIÓN

Muchas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de principios activos, con actividad biológica que puedan ser extraídos de fuentes naturales. En este caso la búsqueda de agentes antimicrobianos que puedan ser empleados para combatir la propagación de microorganismos ya sea como medicamentos, agentes de limpieza, aseo personal, etc; nos ha llevado a realizar diversas investigaciones en plantas que forman parte no solo de nuestra flora, que ofrece inagotables posibilidades, sino también de nuestra cultura ancestral la que durante muchos años a empleado plantas medicinales para el alivio de males, y que en la actualidad se continua con esta tradición, así como también se emplea en la elaboración de nuestros alimentos, en la limpieza del hogar, etc., de una manera muy domestica.

Así mismo con el afán de llevar al campo productivo e industrializado, este conocimiento, con el valor agregado de un aval científico y comprobado con evaluaciones que permitan el manejo controlado de lo que nos ofrece la naturaleza y la seguridad de estar empleando las cantidades necesarias sin representar un riesgo para la salud humana y que por el contrario aporte seguridad y calidad de vida, se realizo la investigación titulada "Caracterización Fisicoquímica del aceite esencial de la Muña (*Mínthostachys setosa*) y su estudio antibacteriano" mediante 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 y la consiguiente presencia de caries, con muestras recolectadas en la zona de Yauyos.

1.1 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

La diversidad de plantas medicinales constituye una fuente inagotable de investigación, siendo nuestra obligación comprometernos en esta tarea y por ende desarrollar nuevas tecnologías para las múltiples aplicaciones que se le pueden dar a los recursos naturales que posee nuestro país, promoviendo de esta manera el desarrollo agrícola, ya que es sabido que la agricultura es una de las actividades económicas más importantes en el Perú y es una necesidad imperiosa promover nuevas alternativas de cultivo, fomentando el desarrollo de las comunidades campesinas.

Las plantas medicinales y/o aromáticas han sido y son usadas no solo en las comunidades campesinas desde tiempos pre-incaicos, sino también están presentes en la alimentación diaria a nivel nacional y mundial, en especial por personas que buscan encontrar en ellas una calidad de vida superior a la que hasta hace poco se conocía, pero cabe resaltar que muchas plantas medicinales son empleadas en su forma tradicional, sin conocer que algunas de ellas en cantidades inadecuadas pueden conducir a intoxicaciones o incluso la muerte, dado que son pocas de las que se han realizado investigaciones y por ende dado a conocer sus principios activos.

Es de vital importancia que el producto de las investigaciones vaya más allá de una simple información, sino que se continúe con la exportación de plantas medicinales en su forma industrializada, asegurando de esta manera el mejoramiento de nuestra calidad de vida social y económica.

1.2 ENUNCIADO DEL PROBLEMA

- ✓ ¿ Cuáles son las características físicas, químicas y antibacterianas que se presentan en el aceite esencial de Muña (especie *Minthostachys Setosa*)?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN PARA LA TESIS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL:

- ✓ Establecer las características físicas, químicas y antibacterianas que se presentan en el aceite esencial de Muña (especie *Minthostachys Setosa*).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar las características físicas del aceite esencial de Muña (*Minthostachys Setosa*).
- ✓ Determinar las características químicas del aceite esencial de Muña (*Minthostachys Setosa*).
- ✓ Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de Muña (*Minthostachys Setosa*).
- ✓ Determinar la concentración mínima inhibitoria de agentes entero patógenos del aceite esencial de Muña (*Minthostachys Setosa*).

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las razones por las cuales se propone el desarrollo de la siguiente tesis, son las siguientes:

- ✓ El clima y la geomorfología hacen del Perú, como es sabido, un país poseedor de una gran diversidad de recursos. Es por esta razón que un determinado genero posee diversas especies como en el caso de la *Minthostachys*, de la cual existen cerca de 12 especies diferentes (que se encuentran almacenadas en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigación Agraria), y asimismo no existe información suficiente que permita conocer exactamente sus cualidades, siendo solo la *Minthostachys Mollis* de la cual se han hecho detalladas investigaciones.
- ✓ Existen programas a nivel nacional que buscan impulsar la exportación de productos naturales, y asimismo tratan de reincorporar el uso de la plantas medicinales en las comunidades campesinas a fin de que se generen nuevas fuentes de trabajo; pero de proporcionar nuevos conocimientos acerca de todos los recursos con los que ellos cuentan, se puede lograr un alto nivel de calidad para llegar a ser más competitivos en el mercado.
- ✓ Con la finalidad de plantear nuevas aplicaciones en diversos campos, como en la industria química, alimentaria, cosmetológica, farmacológica, etc, hasta la fecha se han realizado y se siguen realizando muchas investigaciones en el campo de plantas aromáticas y/o medicinales, a pesar de ello no es suficiente ya que a

diario surgen nuevas incógnitas en cuanto a sus propiedades tanto físicas como químicas, así como también que componentes posee, la proporción en la que se encuentran y sus posibles efectos frente a enfermedades, las cuales podrían variar si se habla de especies diferentes dentro de un mismo género.

- ✓ La búsqueda constante de una mejor calidad de vida nos lleva a la necesidad de emplear nuevos insumos o desarrollar productos obtenidos de fuentes naturales que replacen a los químicamente sintetizados, no solo para beneficiar directamente al ser humano sino que también el empleo de nuestros recursos naturales nos ayuden a preservar el medio ambiente.

1.5 ANTECEDENTES VINCULADOS A LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

En la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao se reportan algunos estudios referentes a plantas medicinales, algunos de ellos son la tesis *“Extracción de aceite esencial de Huacatay”*, realizada por la Bachiller Lorena Campodonico, haciendo algunas determinaciones físicas y químicas; también se registra la tesis *“Estudio fisicoquímico del Algarrobo Peruano”*, realizado por el Bachiller José Queirolo Godo. También se realizó: *“Estudio preliminar para la instalación de una planta industrial de fabricación de aceite esencial de menta”* realizado por la Bachiller Guida Salyrosas Melgarejo, además está la tesis: *“Estudio tecnológico de la extracción de aceite de semilla de Yurac-Sara”*, realizado por el Bachiller Jorge Rojas Vásquez. Cabe. En lo que respecta al

genero *Minthostachys* se registra la tesis “*Estudio tecnológico para la obtención de aceite esencial de Muña (Minthostachys Mollis)*” presentado por la Bachiller Yesenia Romani Quiliche.

Por otro lado en la Universidad Nacional de Ingeniería en la facultad de Ingeniería Química se reporta la tesis: “*Estudio técnico y diseño de una planta industrial para la extracción del aceite esencial de Minthostachys Mollis (Muña)*”, realizada por: los tesisistas Eduardo Ayala y Elmer Quiroz..

Asimismo en la Universidad Nacional Agraria La Molina, se vienen realizando un sin numero de estudios referentes a las aplicaciones de plantas medicinales y/o aromáticas tanto en el área de Industrias Alimentarias como en el área Agrónoma, pero cabe resaltar el apoyo de esta universidad a la tesista María Campiño Carrera de la Universidad Politécnica de Valencia para la realización de la tesis: “*Minthostachys Spp: Estudio básico de la planta y su cultivo*”, en donde resalta la necesidad e importancia de realizar estudios detallados sobre todas las especies que pertenecen al genero *Minthostachys*. Además se han realizado trabajos sobre la aplicación del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* como son: “*Fraccionamiento del aceite esencial de Minthostachys Mollis (Muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de la papa - Cultivar Mariva*” presentado por Walter Augusto Ruiz; “*Actividad Antimicrobiana del aceite esencial de Minthostachys Mollis (Muña) frente a bacterias enteropatógenas*”, presentado por Graciela Contreras (obteniendo buenos resultados); además se ha realizado el estudio de “*Conservación de Yuca (Manihot Esculenta Grantz) con*

aceite esencial de Muña (Menthostachys Mollis) y con Germicida Bacoxin” presentado por Silvia Escobedo.

En la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos también de han realizado muchas investigaciones en plantas medicinales y/o aromáticas, pero cabe resaltar el trabajo presentado por la Bromatólogo Yolanda Munguia Chipana denominado *“Estudio comparativo del aceite esencial de Mentostachys Mollis (KUNTH) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por GC-MS”*, en donde se establecen importantes diferencias en cuanto a la composición y características del aceite esencial de muña obtenido para cada región.

Por otro lado se reporta en el Boletín de la Sociedad Química del Perú de marzo de 1998 una investigación denominada *“Estudio del aceite esencial de Muña (Menthostachys Tomentosa)”*, realizada por Fabiola Ubillus de la Universidad de Piura con apoyo de Elena Muñoz y Ramon Mestres de la Universidad de Valencia (España).

Por lo tanto a pesar de los estudios realizados estos resultan insuficientes dada las múltiples aplicaciones del género *Menthostachys* y la variedad de especies que presenta, y por lo tanto esta propuesta de investigación aportará nuevos conocimientos no solo aplicables a la industria química, sino también a la industria farmacéutica, alimentaria y al campo agrícola interesados en la especie *Menthostachys Setosa* (Muña).

1.6 FORMULACIÓN DE HIPOTESIS.

1.6.1 HIPOTESIS GENERAL:

- ✓ En la especie en estudio, se encontrarán interesantes resultados en cuanto a las propiedades químicas y físicas, y se espera obtener un buen efecto antibacteriano comparable a la acción de antibióticos que se pueden encontrar en el mercado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción de la Genero *Minthostachys*.

2.1.1 Taxonomía

| | |
|---------------------|----------------------|
| División: | Fanerógama |
| Subdivisión: | Angiosperma |
| Clase: | Dicotiledónea |
| Subclase: | Gamopétala |
| Orden: | Tubiflorales |
| Familia: | Lamiaceae |
| Género: | <i>Minthostachys</i> |

*Bajo el nombre genérico de muña se reconocen especies de por lo menos tres géneros diferentes, los cuales pertenecen a la familia de las laminaceas: *Minthostachys*, *Satureja* y *Hedeona*.¹*

*A lo largo de la Cordillera Andina crecen en forma silvestre alrededor de 12 especies del genero *Minthostachys*. De estas especies, hasta la fecha 6 de estas especies han sido reconocidas en el Perú, donde reciben diferentes nombres locales, como el de muña como el más generalizado.²*

Otros nombres comunes que se le dan a las diversas especies del genero *Minthostachys* son: poleo silvestre (los españoles le atribuyeron este

¹ Tapia, 1999

² Ubillus, Fabiola; Muñoz, Elena; Mestres Ramón. "Estudio del aceite esencial de muña (*Minthostachys tomentosa* (Benth) Epling". Pg. 69.

nombre debido a su similitud con el orégano y al poleo), huaycha (en lengua Aimara), coa (en lengua Quechua), muña-muña, arash muña, kon, orcco- muña, ismush, pachamuña y hayamuña o inkamuña.

2.1.2 Distribución geográfica.

Las diversas especies que conforman el genero Minthostachys, son arbustos perennes que crecen en pendientes poco secas y pedregosas, al lado de carreteras y caminos de herradura. Según estudios realizados el clima optimo para el crecimiento de este género es de abundantes lluvias y elevada luminosidad, no debiendo ser esta ultima menor a 14 horas de luz diarias.³

Estudios del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, establecen 8 especies de Minthostachys que crecen en el Perú, que van desde los 500 a los 4000 msnm.

³ Morales; Rodolfo. "Estudio de la Extracción y Caracterización de los aceites esenciales de Minthostachys mollis (muña) y de la Salvia sagittata (hierba buena)". pg

Cuadro N° 2.1.2.1

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DEL GENERO

MINTHOSTACHYS

| ESPECIE | DEPARTAMENTO | ALTITUD (msnm) |
|-------------|--------------------------------------------------|-------------------|
| Andina | Cusco | 2000-2500 |
| Glabrescens | Cajamarca, Junín, Apurímac y Cusco | 2500-4000 |
| Mandoniana | Ayacucho | 1000-1500 |
| Mollis | Cajamarca, Piura y Cusco | 500-3500 |
| Salicifolia | Ayacucho | 2500-3000 |
| Setosa | Puno | 1000-3500 |
| Spicata | Lima, Huancavelica, Ayacucho y Cusco | 2500-4000 |
| Tomentosa | Amazonas, Cajamarca, La Libertad, Huanuco y Lima | 2000-3500 |

Fuente: Vilcapoma, 2000

2.1.3 Descripción botánica.

*La muña es una planta arbustiva, erecta y rastrera generalmente de 0.03 cm. A 1.250 m; de raíz pibotante y de fuerte consistencia, que a partir de la corona emerge un gran número de tallos con abundante población foliar entre anchas y angostas alternas y simples, es decir sin bracteadas de tallo cuadrangular con ritidomas de color marrón, inflorescencia racimosa dicotómica de 10 a 30 flores ya sean de formas solitarias o asociadas formando glomérulos.*⁴

⁴ Salamanca Oviedo; Félix. "Taller Feria desarrollo de la pequeña y mediana industria alimentaria en Latinoamérica. Estudio de la muña y su extracto". pg. 3.

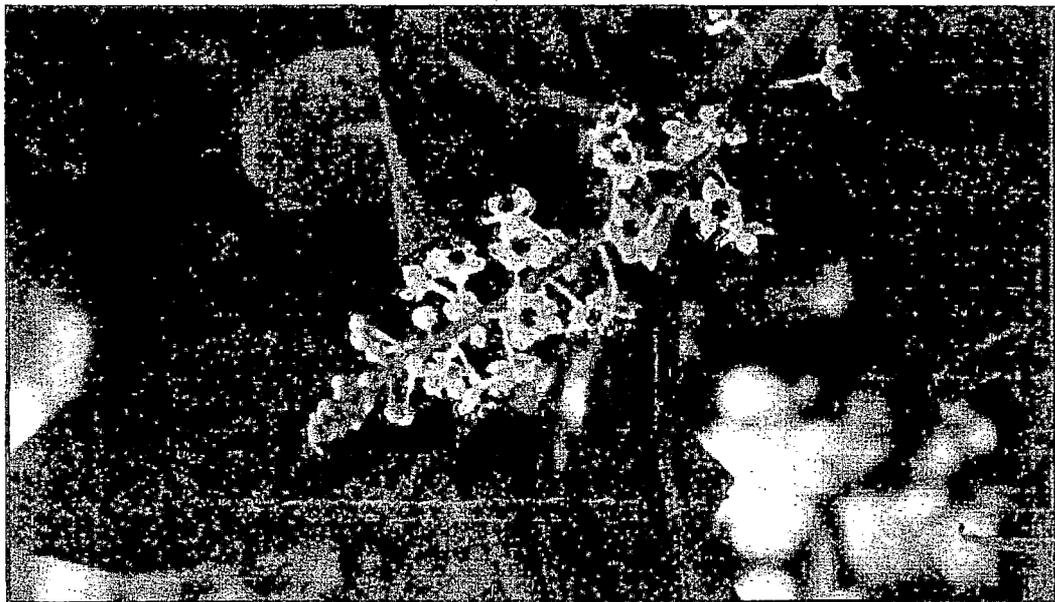
Figura N° 2.1.2.1

ESPECIES: *MINTHOSTACHYS SETOSA*



Figura N° 2.1.2.2

ESPECIES: *MINTHOSTACHYS MOLLIS*



Una información menos técnica de la muña la presenta como un arbusto leñoso, de tallo tetragonal, bastante tupida en las hojas, las cuales son pequeñas, ovales, presentando pilosidad en los pecíolos y cara inferior, en los que se deposita la mayor cantidad de esencia. Raíz de aspecto leñoso, su crecimiento se da en grupos o matas.

Esta planta presenta como carácter diferencial de las labiadas, el poseer la sustancia del aceite esencial en las glándulas odoríferas de la hoja.⁵

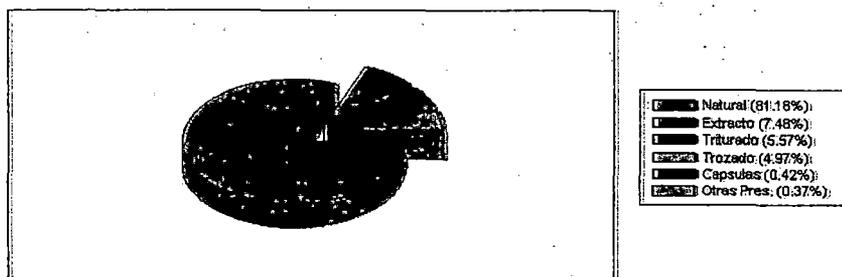
2.1.4 Disponibilidad del genero *Minthostachys* en el mercado

Es de conocimiento que el comercio de plantas medicinales al interior del país se viene realizando de manera informal y artesanal, motivo por el cual las entidades públicas no cuentan con una base de datos adecuada, en el caso de las especies del genero *Minthostachys*, en la que se especifique con detalle la magnitud de lo oferta y la demanda de este comercio. Sin embargo se tiene conocimiento de empresas privadas que vienen trabajando con plantas medicinales y que en los últimos años han evolucionado favorablemente sus exportaciones (en el caso de la muña y sus derivados), en sus diversas presentaciones siendo su forma natural la predominante en el mercado (81.2%). Asimismo dentro de los países que más importan muña y derivados s encuentran Alemania, República Checa como importadores mayoritarios y Estados Unidos, Reino Unido y Países Bajos, con una participación mucho menor, como se muestra en el cuadro 2.1.4.3.

⁵ Idem pg 3.

Cuadro N° 2.1.4.1

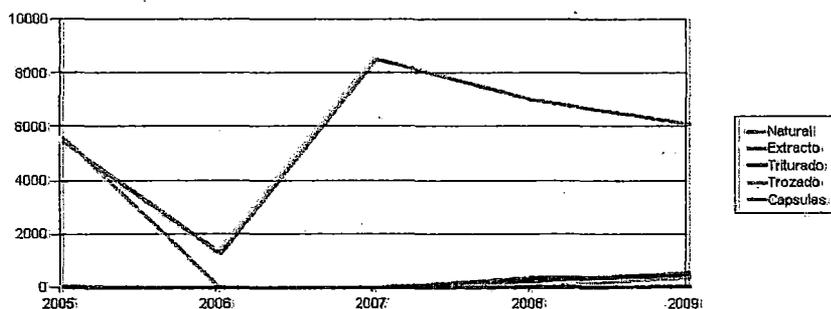
EXPORTACIONES DEL PRODUCTO MUÑA SEGÚN SUS PRINCIPALES PRESENTACIONES EN EL 2009



Fuente: SUNAT. Elaboración: Promperu.

Cuadro 2.1.4.2

EVOLUCIÓN DE LAS EXPORTACIONES DEL PRODUCTO MUÑA SEGÚN SUS PRINCIPALES PRESENTACIONES 2005-2009

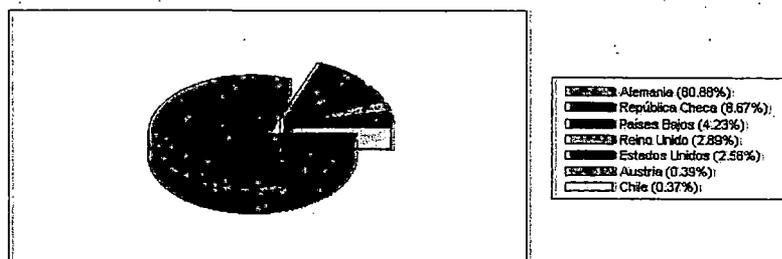


| | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|-----------------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| Natural | 5,432.24 | 1,290.24 | 8,527.05 | 7,000.00 | 6,120.00 | 2,220.00 |
| Extracto | 30.00 | 0.00 | 0.00 | 260.36 | 564.00 | 0.00 |
| Triturado | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 365.00 | 420.00 | 0.00 |
| Trozado | 5,600.00 | 0.00 | 0.00 | 40.00 | 375.00 | 237.00 |
| Capsulas | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 32.00 | 0.00 |
| Aceite | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 6,000.00 | 0.00 | 0.00 |
| Deshidratado | 0.00 | 13.50 | 40.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Filtrante | 24.00 | 0.00 | 70.14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Orgánico | 0.00 | 0.00 | 120.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Polvo | 7,624.64 | 198.95 | 940.05 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Madera | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 2,944.00 | 0.00 | 0.00 |
| Otras Presentaciones | 347.00 | 53.55 | 6.71 | 442.00 | 27.90 | 0.00 |
| Total | 19,057.88 | 1,556.24 | 9,703.95 | 17,051.36 | 7,538.90 | 2,457.00 |

Fuente: SUNAT. Elaboración: Promperu. * Nota: Febrero del 2010. La información que se muestra es una versión preliminar aproximada al mes de Febrero, sin embargo se encuentra sujeta a actualizaciones.

Cuadro 2.1.4.3

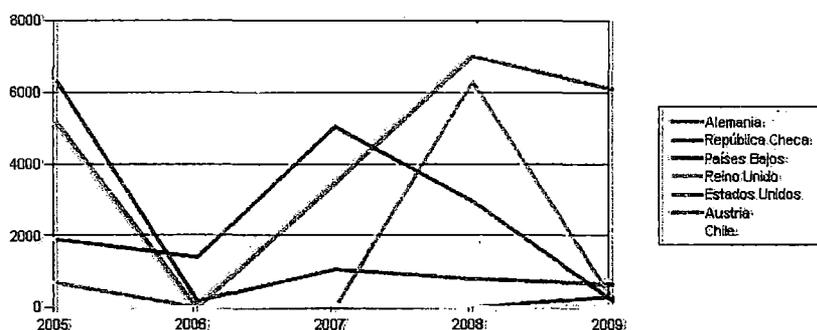
EXPORTACIONES DEL PRODUCTO MUÑA SEGÚN SUS PRINCIPALES MERCADOS EN EL 2009



Fuente: SUNAT. Elaboración: Promperu.

Cuadro 2.1.4.4

EVOLUCIÓN DE LAS EXPORTACIONES DEL PRODUCTO MUÑA SEGÚN SUS PRINCIPALES MERCADOS 2005 – 2009



| | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|----------------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| Alemania | 5,157.24 | 0.00 | 3,470.01 | 7,000.00 | 6,121.00 | 2,220.00 |
| República Checa | 6,310.40 | 198.95 | 1,066.96 | 815.36 | 656.00 | 167.00 |
| Países Bajos | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 320.00 | 0.00 |
| Reino Unido | 670.00 | 0.00 | 0.00 | 6,292.00 | 219.00 | 0.00 |
| Estados Unidos | 1,894.24 | 1,403.74 | 5,054.55 | 2,944.00 | 195.00 | 70.00 |
| Austria | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 29.20 | 0.00 |
| Chile | 0.00 | 0.00 | 70.14 | 0.00 | 27.90 | 0.00 |
| Dinamarca | 0.00 | 53.55 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Bélgica | 0.00 | 0.00 | 41.99 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Antillas Holandesas | 0.00 | 0.00 | 0.30 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Franca | 5,600.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Japón | 96.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Hong Kong | 354.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Total | 20,081.88 | 1,656.24 | 9,703.95 | 17,051.36 | 7,568.10 | 2,457.00 |

Fuente: SUNAT. Elaboración: Promperu. * Nota: Febrero del 2010. La información que se muestra es una versión preliminar aproximada al mes de Febrero, sin embargo se encuentra sujeta a actualizaciones.

2.2 Principales Usos del Genero Minthostachys

2.2.1 Uso alimenticio.- la muña se usa en comidas típicas de la zona andina, como condimento. Se usa en diversas sopas y segundos, como en el chupe verde, la sopa de calabaza y el locro de zapallo.

2.2.2 Uso medicinal.- las diversas especies del genero Minthostachys poseen en la composición de su aceite esencial principios activos que actúan sobre el organismo. Los tratamientos a base de plantas son muy variados, en el caso de la muña, el tratamiento principal es el mate o infusión que consiste en separar o extraer de la planta los principios activos vertiendo agua hirviendo sobre la planta (partes blandas como hojas y tallos tiernos). Es así que la muña se utiliza de forma tradicional como antiséptico, analgésico, en afecciones renales y respiratorias (en todos estos casos se toma el cocimiento de la planta), antiinflamatorio, carminativo (bebiendo la infusión de hojas y tallos), antihemorrágico con la aplicación de hojas sobre heridas sangrantes y como purgante junto con otras hierbas aromáticas.

2.2.3 Uso agrícola.- los campesinos andinos utilizan la muña para conservar la papa, según ellos, esta tiene un efecto repelente sobre los gusanos de tierra (lo que aún no se ha comprobado), pero se sabe por estudios que si tiene propiedades repelentes contra los gorgojos de los andes.

2.2.4 Uso veterinario.- al igual que en los humanos, se emplea la muña junto a otras hierbas aromáticas como purgante para desparasitar al ganado.

2.3 Aceites Esenciales

Los componentes volátiles provenientes de plantas y la importancia biológica de sus aceites esenciales han atraído la atención del hombre desde la antigüedad como principios aromáticos o especies de gran complejidad en su composición, los cuales fueron considerados como material de desecho del metabolismo de las plantas. El estudio de los aceites esenciales como materias primas básicas para la industria de fragancias y sabores, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes para muchos países.

2.3.1 Definición.- El termino aceite, probablemente, se origina del hecho de que el aroma de una planta existe en forma líquida, los cuales son parcialmente inmiscibles en agua. Tal es así que son llamados los constituyentes odoríferos de las plantas.

La palabra esencial fue derivada del latín "quinta essentia" que significaba el quinto elemento, asignado a estos aceites, ya que la tierra,

*el fuego, el viento y el agua, fueron considerados los cuatro primeros elementos.*⁶

*Los aceites esenciales o simplemente esencias, son mezclas líquidas volátiles (no dejan a diferencia de los aceites grasos, mancha sobre el papel), de propiedades aromáticas, extraídos de las plantas. Se encuentran casi exclusivamente en las fanerógamas y en especial en algunas familias como las rosáceas, labiadas, umbelíferas, lauráceas, etc.*⁷

Es decir, los aceites esenciales son sustancias líquidas, aromáticas y volátiles que consisten básicamente en mezclas de principios químicos que a menudo son muy complejos, y varían ampliamente en su composición química.

Otra definición dada por la fisiología vegetal los considera metabolitos secundarios, no imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de la planta.

2.3.2 Distribución y estado natural.- los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbilíferas, Piperáceas, etc. Se les puede encontrar en

⁶ Lock de Ugaz; Olga. "Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales". Pg. 24.

⁷ Font Quer, P. "Diccionario de Botánica". Pg 6.

diferentes partes de la planta, como estructuras secretorias especializadas (cavidades, células, pelos o canales secretores), por ejemplo: en las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, geranio, hierbabuena, mejorana, menta, pachulí, romero, salvia, etc), en las raíces (angélica, cúrcuma, jengibre, sándalo, safrán, valeriana, vetiver, orozuz, etc), en el pericarpio del fruto (cítricos como el limón, mandarina, naranja, bergamota, fresas, uvas, etc), en las semillas (anís, cardamomo, hinojo, comino, etc), en el tallo (canela, trementina, etc), en las flores (lavanda, jazmín, manzanilla, piretro, aceite de azahar, tomillo, rosa, etc), y en los frutos (nuez, moscada, perejil, pimienta, etc).

Resulta de interés notar que, cuando un vegetal tiene aceites esenciales en varias partes del mismo, siempre difieren en su constitución; por ejemplo, un naranjo tiene aceites esenciales en sus flores (aceite de azahar), en sus vástagos y hojas nuevas (aceite de petitgrain), en la cáscara amarilla (flavedo), en sus frutos (aceite de naranja), y finalmente, un olor propio en el jugo de naranja, todos ellos muy diferentes en su olor y su composición química.⁸

Las esencias pueden ser producidas por tejidos secretorios, mientras que en otros casos se encuentran como enlace glucosídico en el interior de la planta como ocurre con la valeriana, en la que solo aparece el aroma al secarse la raíz y no en estado fresco.

⁸ Braverman; J.B.S. "Introducción a la bioquímica de los alimentos". Pg 219.

2.3.3 Función de los Aceites esenciales.- existen diversas teorías acerca de la función fisiológica de los aceites esenciales en el metabolismo de los vegetales. De las cuales se pueden citar:

- ✓ **Atracción** .- los aceites esenciales al ubicarse en las flores de las plantas actúan atrayendo a los insectos responsables de la polinización.
- ✓ **Repulsión**.- repelen la acción de los insectos, parásitos o animales herbívoros, nocivos de las plantas, cumpliendo esta función en forma más destacada cuando se ubican en los frutos.
- ✓ **Cicatrizante**.- actúan como constituyentes de los compuestos que cicatrizan lesiones en la formación de una capa que evita evaporaciones intensas de agua.
- ✓ **Hormonales**.- les atribuye funciones hormonales en la polinización y que en la época de la floración se trasladan a la flor donde las realizan.
- ✓ **Físicas**.- actúan como regulador de la conductividad calórica del agua y la presión osmótica.
- ✓ **Metabólicas**.- los aceites esenciales participan en el metabolismo al disminuir su concentración en las plantas que crecen a la sombra e incrementa, cuando lo hacen a plena luz y cuando aumenta la temperatura, lo que a su vez tiene que ver con la función física.
- ✓ **Sustancias de reserva**.- como dador de hidrogeniones en los procesos de oxido – reducción.

Cuadro N° 2.3.3.1

FAMILIAS CON UN ELEVADO CONTENIDO DE ACEITES ESENCIALES

| FAMILIAS | ESPECIES QUE PERTENECEN A ESTA FAMILIA (NOMBRE COMÚN) |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| Umbelíferas | Hinojo, Anís, Alcaravea |
| Zingiberáceas | Jengibre, Cardamomo |
| Pináceas | Abeto, Picea, Pino |
| Compuestas | Manzanilla, Arnica |
| Labiadas | Espliego, Menta, Tomillo, Pachulí |
| Lauráceas | Canela, Alcanfor |
| Mirtáceas | Clavo, Eucalipto |
| Rutáceas | Naranja amargo, Limonero |
| Rosáceas | Rosas |

Fuente: Brunhilde Bross, 1994

2.3.4 Clasificación de los aceites esenciales.- los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios: de acuerdo a su origen, composición química, empleo, punto de ebullición, etc.

2.3.4.1 Por su origen

A. Naturales.- dentro de las cuales se encuentran los aceites esenciales vegetales (aproximadamente en un 99%) y los de origen animal, en donde se puede citar al Almizcle, que es la secreción de una glándula de la cabra almizclera (*Moschus moschiferus*); el Abeto, segregado por una

glándula del gato de algalia (*Viverra zibella*) y el Ámbar que procede del cachalote (*Physeter macrocephalus*), estas especies generalmente se emplean como fijadores en la elaboración de perfumes.

B. Sintéticos.- son productos de síntesis orgánica y pueden obtenerse a partir de los compuestos obtenidos de los diversos aceites esenciales como de compuestos ajenos a estos. Pertenecen a este grupo las Yanonas, con olor a violeta, que son muy empleadas en perfumería.

2.3.4.2 Por su composición química.- se pueden dividir en:

A. Compuestos terpénicos: Están formados por unidades de isopreno, pudiendo ser monocíclicos, cíclicos y acíclicos. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos de tipo monoterpénicos o sesquiterpénicos. De acuerdo con la naturaleza de los componentes principales se pueden dividir en:

- ✓ Monoterpenos: α y β -pineno, canfeno, limoneno, mirceno, p-cimeno, etc.
- ✓ Sesquiterpenos: β -cariofileno, α -farneseno, germacraneno, camazuleno, etc.
- ✓ Monoterpenoles: α -terpineol, borneol, citronelol, geraniol, linalol, nerol, etc.
- ✓ Sesquiterpenoles: espatulenol, fenchol, nerolidol, etc.

- ✓ Ésteres terpénicos: acetatos de nerilo, geranilo y bornilo, 1,8-cineol (eucaliptol), etc.
- ✓ Óxidos terpénicos: óxido de cariofileno.
- ✓ Cetonas terpénicas: pulegona, tuyona, etc.
- ✓ Aldehídos: citrales, fotocitrales, etc.
- ✓ Lactonas sesquiterpénicas: crispolida, etc.
- ✓ Monoterpenonas: alcanfor, etc.
- ✓ Hidrocarburos sesquiterpénicos: santanelos, curcumenos, etc.

B. Compuestos con núcleo bencénico (fenilpropánicos):

Son muy importantes como elementos predominantes de algunos aceites como el de anís, badiana, canela, clavo de olor, hinojo, etc. De acuerdo con la naturaleza de los componentes principales tenemos:

- ✓ Hidrocarburos: tolueno.
- ✓ Fenoles y derivados: anetol, apiol, eugenol, timol, etc.
- ✓ Alcoholes: bencílico, salicílico, etc.
- ✓ Aldehídos: benzoico, cinámico, etc.
- ✓ Ácidos: ésteres de ácido benzoico y cinámico, etc.

C. Compuestos alifáticos de cadena recta: Se trata de componentes menores entre los que figuran el ácido acético, ácido fórmico, ácido isovaleriánico, ácido

isobutílico, aldehído decílico, metilheptona, estearopteno, etc.

D. Compuestos sulfurados y nitrogenados heterocíclicos:

En el grupo de los sulfurados tenemos el isotiocianato de alilo (presente en el aceite de mostaza) y el sulfuro de dialilo (presente en el ajo). Entre los nitrogenados figuran el indol, furfural, escatol, etc.

2.3.4.3 Por su punto de ebullición.- se pueden dividir en:

A. Aceites esenciales fijos.- son los comúnmente llamados fijadores, su frecuencia ondulatoria es muy amplia y su peso molecular, generalmente muy elevado. Además de los fijadores podemos incluir en este grupo a los productos balsámicos y a las esencias resinosas. Algunos ejemplos son: clavel, sándalo, Ylang Ylang, benjuí (resina), ámbar gris (resina), almizcle (resina), civeta, etc.

B. Aceites esenciales persistentes o medianos.- son más volátiles que los anteriores. Son cetonas y esterés de peso molecular poco elevado, como las de lavanda, clavo, pimienta, rosa, etc.

C. Aceites esenciales fugaces o volátiles.- son muy volátiles, su acción solo dura unas pocas horas, son de

peso molecular relativamente bajo, como los del anís, bergamota, menta, pimienta, ruda, espliego, etc.

2.3.4.4 Según su empleo.- se pueden dividir en:

- A. Alimenticias.-** como el ajo, perejil, anís verde, ajenojo, apio, canela, comino, pimienta, hinojo, laurel, limón, menta, cidra, nuez moscada, zanahoria, cebolla, naranja, etc.
- B. Alimenticias Aromáticas.-** como la canela, apio, comino, vainilla, laurel, limón, mandarina, mejorana, menta, naranja, pimienta, nuez moscada, etc.
- C. Aromáticas.-** como la albahaca, almendras, cedro, ciprés, clavel, eucalipto, geranio, iris, jazmín, lavanda, magnolia, narciso, nuez moscada, orégano, palma, rosa, pino, romero, ruda, salvia, toronjil, violeta, etc.
- D. Medicinales.-** como el alcanfor, anís verde, boldo, canela, ciprés, comino, clavo, eucalipto hinojo, menta, perejil, pino, rábano, romero, rosa, sabina, salvia, sasafrás, tomillo, vainilla, valeriana, etc.

2.3.5 Procesos de obtención de aceites esenciales

2.3.5.1Recolección.- la recolección se debe realizar preferentemente durante clima seco, nunca cuando llueve o mientras la humedad ambiental sea elevada.

Todo material vegetal debe recogerse libre de desechos, tierra, enfermedades, pesticidas, contaminantes microbiológicos y ambientales. En términos generales, tomando en cuenta la parte de la planta que se va a recoger, deberán cosecharse en la siguientes épocas y momentos de su crecimiento:

- ✓ *Las hojas: al inicio de la floración.*
- ✓ *Las flores: al momento de su floración máxima.*
- ✓ *Las semillas: cuando se encuentren bien secas y comiencen a caerse por si mismas.*
- ✓ *Las raíces: antes de la floración.*

En relación a la composición de los principios activos, el horario más adecuado para la cosecha es el siguiente:

- ✓ *Plantas con alcaloides, glucósidos y principios amargos: al atardecer.*
- ✓ *Plantas con aceites esenciales y flavonoides: durante la mañana. Después de la evaporación de la humedad, antes de que la radiación solar sea fuerte.⁹*

Se recomienda no lavar las hojas después de cosechadas, y en el caso de raíces y tubérculos se debe de lavar con agua limpia, con la ayuda de un cepillo para retirar toda la tierra.

⁹ Campillo Carrera; M^a Sales. "Minthostachys Spp: Estudio básico de la planta y su cultivo". Pg 20.

2.3.5.2 Secado. - Previo al proceso de extracción de aceites esenciales, hay ciertas condiciones que las plantas medicinales y/o aromáticas deben cumplir; vale decir en cuanto a su contenido de humedad.

Las plantas contienen un elevado porcentaje de agua y éste es un medio propicio para la manifestación de actividad enzimática y del mismo modo favorecer el crecimiento de bacterias, hongos, etc.¹⁰

El secado por lo tanto constituye una etapa importante en el proceso de extracción de aceites esenciales, ya que contribuye a la desactivación de las enzimas. Durante el secado, mientras que la eliminación de agua no ha sido total, es necesario considerar algunos factores que impidan la actividad enzimática, como temperaturas entre 20 y 45°C a las cuales las enzimas son activas. A su vez, sabemos que temperaturas mayores favorecen la eliminación de humedad a mayor velocidad pero cabe resaltar que temperaturas elevadas promueven la modificación y/o alteración de las propiedades químicas de las plantas. En conclusión, las condiciones favorables de secado son bajo sombra, en ambientes limpios, en lugares donde la temperatura sea menor a 20°C y con abundante ventilación; vale decir en ambientes acondicionados artificialmente o medios

¹⁰ Campillo Carrera; M^a Sales. "Minthostachys Spp: Estudio básico de la planta y su cultivo". Pg 21.

geográficos donde se cumplan estas condiciones (la sierra por ejemplo).

2.3.5.3 Extracción del aceite esencial.- Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales se pueden resumir en el **Cuadro 2.3.5.1**.

En la **extrusión** el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos.

En la **destilación por arrastre con vapor de agua**, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, que es generado por un hervidor, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada. Es importante que el vapor encuentre una salida a través de la carga; a menudo se usan varias rejillas para sostener la carga sin que el material se comprima.

En el **método de extracción con solventes volátiles**, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. (que a su vez solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura). Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles.

En el método de enflorado o **enfleurage**, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa, la cual es separada posteriormente por otros medios físico – químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

El **método de extracción con fluidos supercríticos**, el material vegetal es cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable, y se

hace circular a través de la muestra en fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura del ambiente, y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que requiere bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a altas presiones.

Cuadro 2.3.5.1
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

| Método | Procedimiento | | Productos Obtenidos |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Métodos directos | Extrusión | Compresión de cáscaras | Aceites esenciales cítrico |
| | | Raspado de cáscaras | |
| | Exudado | Lesiones mecánicas en cortezas | Gomas, resinas, bálsamos |
| Destilación | Directa | | Aceites esenciales y aguas aromáticas |
| | Por arrastre de vapor (directo, indirecto, a presión o a vacío) | | |
| | Destilación-maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente) | | |
| Extracción con solventes | Solventes volátiles | En caliente | Infusiones y resinoides alcohólicos en caliente, oleorresinas |
| | | En frío | Mezclas aromáticas, resinoides en frío, oleorresinas. |
| Procesos de extracción con fluidos en condiciones supercríticas y subcríticas | Solventes fijos (grasas y aceites) <i>"Enfleurage"</i> | En caliente | Pomadas en caliente, lavados y mezclas aromáticas. |
| | | En frío | Pomadas en frío, mezclas aromáticas de enflorados. |

Fuente: <http://bilbo.edu.uy/planta/pdf/farmacognosiaPE80/bolilla4.pdf>

2.3.6 Toxicidad de los aceites esenciales:

Se cree que las plantas medicinales son seguras porque se han empleado desde siglos atrás, y al ser naturales se les confiere cierta seguridad a su empleo. Sin embargo el uso continuado durante años (o siglos) no es una garantía de seguridad y lo "natural" no tiene porque ser más seguro que los productos sintéticos. A si mismo se puede decir que el uso en cantidades inadecuadas de plantas medicinales ya sea como aceites esenciales o extractos de estas, tienden a ser toxicos para el organismo o incluso pueden llegar a producir la muerte.

Tal es el caso que existen aceites que en cantidades excesivas producen convulsiones como la alcaravea, anís, badiana, eneldo, hinojo, hisopo, menta, perejil, etc., otros con efectos narcóticos o estupefacientes como la albahaca, angélica, anís, badiana, comino, coriandro, enebro, eucalipto, hinojo, lavanda, melisa, nuez moscada, etc., o peor aun propiedades abortivas como la ruda, el ajenjo, etc.

Cuadro N° 2.3.6.1

TOXICIDAD DE ALGUNAS ESPECIES CONOCIDAS

| Nombre Científico | Nombre Popular | Componentes Principales | Aplicación - Actividad Farmacológica | Toxicidad Sobredosis |
|-----------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Allium sativum | Ajo | Alíina, sulfuro de dialilo | Hipotensor, diurético, antiséptico, fungicida | Irritante de mucosas |
| Angelica archangelica | Angélica | Felandreno, derivados cumarínicos | Diurético vulnerario | Narcótico* Fototóxico |
| Artemisia absinthium | Ajenjo | Tuyona, tuyol | Antiparasitario Emenagogo | Convulsivante Abortivo |
| Barosma betulina | Buchu | Diosfenol, limoneno, pulegona | Antiséptico urinario | Irritativo en mucosas* |
| Carum carvi | Alcaravea | Carvona, limoneno, α - y β -pineno, herniarina | Antiespasmódico, carminativo, aperitivo | Convulsivante* |
| Cuminum cyminum | Comino | Aldehído cumínico, terpenos | Carminativo, aperitivo, espasmolítico | Narcótico* Fototóxico* |
| Cinnamomum canphora | Alcanfor | Safrol, alcanfor | Rubefaciente, Antiséptico respiratorio, | Convulsivante* |
| Cinnamomum verum | Canela | Aldehído cinámico, alcoholes aromáticos | Antiséptico, sedante, Antiespasmódico, etc | Depresor del SNC * |
| Coriandrum sativum | Coriandro | d-linanol (coriandrol) 60-85% | Carminativo, eupéptico, antiespasmódico, etc | Narcótico * |
| Eucalyptus globulus | Eucalipto | Eucaliptol (70-80%) α - β - pineno, p-cimeno, d-limoneno, felandreno, etc | Antiséptico, expectorante | Depresor SNC* Broncoespasmo* Carcinogenético* Fototóxico * |
| Foeniculum vulgare | Hinojo | Metilchavicol anetol, anisaldehído, fenchona | Carminativo, expectorante | Convulsivante* Estupefaciente* |
| Hyssopus officinalis | Hisopo | Hidrocarb. terpénicos, pinocanfona | Antiséptico, expectorante | Convulsivante* |
| Illicium verum | Anís estrellado | Anetol, estragol, safrol | Carminativo, eupéptico, antiespasmódico | Estupefaciente* Convulsivante* |

| | | | | |
|-------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| | | limoneno, ác. Anísico | | |
| <i>Juniperus communis</i> | Enebro | α y β pineno, limoneno, terpineno | Diurético, antiséptico, expectorante | Narcótico* Abortivo |
| <i>Laurus nobilis</i> | Laurel | Cineol, eugenol, linalol, terpineol | perfumería | Fototóxico* |
| <i>Lavandula angustifolia</i> | Lavanda | Linalol, geraniol, borneol, ésteres | Perfumería, cosmética | Narcótico* Irrit. mucosas* |
| <i>Lavandula latifolia</i> | Espliego | Alcanfor, cineol | Perfumería, cosmética | Irrit. mucosas * |
| <i>Lippia citriodora</i> | Hierba luisa | Citral, cineol | eupéptico, espasmolítico, aperitivo | Neurotóxico* Irrit. mucosas* |
| <i>Matricaria recutita</i> | Manzanilla | Camazuleno, bisabolol hidrocarb. Terpénicos | Antiinflam., carminativo, antiespasmódico | Alergias * |
| <i>Melaleuca viridiflora</i> | Niaulí | Eucaliptol (55-65 %), terpineol (35-45 %) | Antiséptico, antifúngico | Iritante en piel y mucosas* |
| <i>Melissa officinalis</i> | Melisa | Geraniol, geraniol, neral, citronelal, etc | Carminativo, antiespasmódico | Hipotiroidismo* Narcótico* Fototóxico* |
| <i>Mentha pulegium</i> | Menta poleo | Pulegona | estomáquico | Convulsivante* |
| <i>Mentha x piperita</i> | Menta | Mentol, mentona, acetato de mentilo, etc | Carminativo, estomacal, antiespasmódico | Edema de glotis** |
| <i>Myristica fragrans</i> | Nuez moscada | Hidrocarburos terpénicos, miristicina | Eupéptico, carminativo, estimulante, nematicida | Estupefaciente Depresor SNC |
| <i>Ocimum basilicum</i> | Albahaca | Linalol (hasta 75 %) Estragol (85 %) | Antimicrobiano, antiespasmódico | Narcótico * |
| <i>Origanum vulgare</i> | Orégano | α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, borneol | Antiespasmódico, antibacteriano, fungicida | Somnolencia* |
| <i>Petroselinum sativum</i> | Perejil | Apiol, miristicina | Emenágogo | Convulsivante* |
| <i>Peumus boldus</i> | Boldo | Paracimeno, cineol, ascaridol | Colerético, colagogo, diurético, eupéptico | Irritación renal, vómitos, diarrea* |
| <i>Pimpinella anisum</i> | Anís verde | Anetol, anisaldehido, α -pineno, | Carminativo, eupéptico, antiespasmódico | Narcótico* Convulsivante* |

| | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| | | cariofileno | | |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | Romero | Alcanfor, borneol, cineol | Colerético, carminativo, antiséptico, estimulante | Convulsivante* |
| <i>Ruta graveolens</i> | Ruda | Metilnonilcetona | Emenagogo | Abortivo Convulsivante* Fototóxico |
| <i>Salvia officinalis</i> | Salvia | Tuyona | Emenagogo | Convulsivante* |
| <i>Santonila chamaecyparissus</i> | Abrotano hembra | α -pineno, β -pineno, canfeno, alcoholes terpénicos | Antiinflamatorio, antimicótico, analgésico, antiespasmódico | Neurotóxico* Abortivo* |
| <i>Sassafras officinalis</i> | Sasafrás | Safrol (80-90%), alcanfor, anetol, apiol, etc | Carminativo, diurético, pediculicida (vía externa) | Convulsivante Carcinogénico* Fototóxico* |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Clavo de olor | Eugenol, cariofileno | Bactericida, fungicida, analgésico local | Depresor SNC* |
| <i>Tanacetum vulgare</i> | Tanaceto | Tuyona (70-95%) | Antiinflamatorio | Convulsivante Abortivo* |
| <i>Thuja occidentalis</i> | Tuya | Tuyona | | Convulsivante Abortivo |
| <i>Thymus vulgaris</i> | Tomillo | geraniol, carvacrol, borneol, linalol, timol | Antiséptico, béquico, vermífugo, expectorante | Narcótico * Fototóxico* |
| <i>Tilia spp.</i> | Tilo | Farnesol, geraniol, eugenol | Sedante, colerético, antitusivo, antiinflamat. | |
| <i>Valeriana officinalis</i> | Valeriana | Borneol y ésteres, kesano, valeranona | hipnosedante | Pasa a leche materna* |

Nota: la toxicidad indicada con asterisco (*) se presenta generalmente en dosis altas.

Fuente: Alonso, 1998.

2.3.7 Uso industrial de los aceites esenciales.- los aceites esenciales son a menudo empleados en:

2.3.7.1 Industria de los alimentos, además de sus propiedades organolépticas, son empleados como aditivos para producir ciertas modificaciones que impliquen conservación, color, reforzamiento del sabor (agentes soporíferos) y

estabilización, a sí mismo se emplean para aprovechar su poder gelificante en la elaboración de néctares, mermeladas y confituras. Del mismo modo se emplea en la industria de las bebidas ya que se emplean para dar sabor y aroma (café, te y bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos). También se emplea como condimento de carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc y en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas. Algunos aceites esenciales empleados por esta industrias son: coliandro, naranja, menta, hinojo, limón, entre otros.

2.3.7.2 Industria farmacéutica.- se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), como agente terapéutico, es decir como analgésicos, inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto), entre muchas otras propiedades que se detallaran más adelante. Son utilizados como neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos, como suplemento o potenciador de una droga, como ingrediente en una preparación o como suplemento alimenticio con un valor terapéutico definido.

2.3.7.3 Industria de cosméticos.- en la semisíntesis de lociones, jabones, perfumes (pinenos, citral, safrol, etc) y maquillaje. En este rubro se pueden citar los aceites de geranio, lavanda, rosas y pachulí.

2.3.7.4 Industria de productos de uso veterinario.- esta industria

emplea el aceite esencial de paico muy apetecido por su contenido de ascaridol, peróxido orgánico y su propiedad vermífuga.

2.3.7.5 Desodorantes industriales.- actualmente se ha desarrollado

el uso de esencias para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. En otros sectores industriales se emplean como estabilizadores de emulsiones. También son ampliamente usados en la elaboración de productos de limpieza (como los desinfectantes), etc.

2.3.7.6 Aromaterapia.- otro uso muy frecuente de los aceites esenciales es a través de la aromaterapia.

Esta técnica es muy empleada en Europa (Francia especialmente), habiendo dado muy buenos resultados en procesos infecciosos la aromaterapia se realiza junto con un aromagrama (algo así como un antibiograma) que en vez de emplear un antibiótico, prueba aceites esenciales.¹¹

¹¹ Alonso; Jorge. "Tratado de Fitomedicina, bases clínicas y farmacológicas". Pg 60.

2.3.8 Uso del aceite esencial de muña

La muña como tal es empleada como infusión de hojas y tallos como carminativa, antiséptica, analgésica, contra afecciones renales y respiratorias. Asimismo el aceite esencial de la muña, contenido en las glándulas odoríferas de esta planta, es muy empleado por los campesinos andinos (según ellos la muña tiene un efecto repelente sobre los gusanos de tierra) y por la comunidad agrícola debido a sus propiedades biocidas, como por ejemplo en la conservación de la papa (*Solanum tuberosum*) como insecticida para prevenir el ataque de insectos de follaje (pulgones), evita el brotamiento, controla las plagas en almacenamiento (la polilla *Phthorimaea operculella* e insectos de almacén como el gorgojo de los Andes), como plaguicida, como controlador de fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, hongo que debilita el sistema vascular, causando enfermedades en las plantas debido a su capacidad de bloquear los vasos conductores de agua), también es empleado contra los parásitos externos del ganado (sobre todo piojos y pulgas), en camélidos para curar la sarna y en animales domésticos para controlar los ectoparásitos y endoparásitos.

2.3.9 Influencia de los factores externos en la producción de aceites esenciales

Un aceite suele poseer de diez a quince componentes principales y otros tantos muy escasos o en trazas. El número y tipo de componentes, así como sus proporciones, pueden experimentar importantes cambios dentro de una misma especie botánica, sea por razones ecológicas (luz, temperatura, altitud, etc), agronómicas (época de siega, abonado, etc) o puramente genéticas (quimiotipos o variedades químicas). Estas últimas ser las más drásticas e implican que una planta indiferenciable (bajo la lupa de un botánico) de otra de su misma especie puede tener una composición completamente diferente de su aceite esencial. La investigación química es de gran importancia económica ligada a estos productos.¹²

Tal es así, según estudios realizados, la luz interviene modificando la forma y tamaño de los canales secretores y estimula la función clorofílica, alterando el porcentaje de rendimiento de la esencia y su composición química. Otro factor es la velocidad del viento, donde se reporta que especies expuestas a una mayor velocidad, aumentaron en un buen porcentaje su contenido en aceites esenciales. También se debe tener en cuenta el momento de su crecimiento, por ejemplo, estudios realizados en la *Mentha longifolia* L. reportaron una variación del contenido de esencia (este decrece al final de la floración) así como también en la

¹² García Vallejo; M.C. "Importancia sobre la investigación química en la explotación de los aceites esenciales"

composición de esta (durante la inflorescencia). Muy importante resulta mencionar la influencia del clima, ya que las células secretoras o glándulas oleíferas disminuyen en cantidad a medida que el clima se hace cálido y aumentan en climas fríos o templados, esto obviamente debido a la volatilización de componentes muy volátiles a medida que aumenta la temperatura del ambiente. Los cambios de suelo así como también el ataque de insectos o parásitos, llegan a determinar alteraciones de las esencias.

2.3.10 Métodos de análisis de aceites esenciales

Luego de obtener un aceite esencial se debe hacer un tratamiento previo a este, ya sea con sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio anhidro, para eliminar todo rastro de agua que se haya emulsionado con el aceite luego de la extracción. Luego se deben hacer determinaciones físicas tales como: aroma, desviación óptica, solubilidad en mezclas de alcohol – agua (la solubilidad de una esencia en soluciones etanólicas, depende de su contenido de compuestos oxigenados, y esto se averigua con determinaciones a diferentes concentraciones).

La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua, salvo los de canela, clavo de olor y safrán, con una densidad superior a la unidad. Los contenidos en aceite esencial no suelen superar el 1% en la mayoría de los casos. Una excepción la constituye el clavo de olor

(botón floral de Eugenia caryophyllus) cuyo contenido puede superar al 15%.¹³

Con la densidad e índice de refracción se pueden hacer deducciones importantes sobre componentes. Por ejemplo: densidades menores de 0.9 e índices de refracción menores de 1.47 sugieren un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es mayor de 0.9 y el índice de refracción menor de 1.47 es posible que haya compuestos oxigenados alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen densidades menores de 0.9 pero sus índices de refracción son mayores de 1.47. los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos tienen densidades e índices de refracción superiores a los límites señalados.¹⁴

Se pueden realizar también determinaciones químicas tales como determinación de aldehídos y cetonas, índice de acetilo, índice de acidez (numero de mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1gr de aceite esenciales), índice de ester (numero de mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos liberados por la hidrólisis de los esteres contenidos en 1 gr. de aceite esencial), contenido de fenoles (basado en la transformación de los fenoles contenidos en un volumen conocidos de aceite esencial en fenolatos alcalinos y la posterior medición de la fracción de aceite esencial no transformado) y mas específicamente, cuando se conoce, en base a el (los) componente(s) principal(es).

¹³ Alonso; Jorge. "Tratado de Fitomedicina, bases clinicas y farmacologicas". Pg 56.

¹⁴ Domínguez; Xorge. "Métodos de investigación fotoquímica". Pg 232.

También se pueden emplear técnicas cromatográficas tales como la cromatografía en columna, en capa fina y estacionaria o las mas eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y la cromatografía de gases (GC).

El análisis por métodos espectrométricos de un aceite esencial constituido por una mezcla de compuestos puede ser utilizado para obtener una información sobre su posible composición, y asumir la ausencia o presencia de determinado grupo funcional.¹⁵

Como también se pueden emplear métodos espectroscópicos, como la técnica acoplada Cromatografía de gases – Espectrometría de Masas (GC- MS), que permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Así mismo existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo cual el índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas son criterios para la asignación química de muchos componentes de aceites esenciales, no solo monoterpenos sino también otros tipos de sustancias características de dichos aceites.

¹⁵ Lock de Ugaz; Olga. “Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales”. Pg. 35.

2.3.11 Actividad antibacteriana de los aceites esenciales

Tanto en los alimentos de origen vegetal como en los de origen animal existen sustancias antimicrobianas. En los primeros, se trata principalmente de los aceites esenciales, aunque también otros compuestos no volátiles como taninos, glucósidos y glicoproteínas ejercen una actividad antimicrobiana.

Entre los compuestos fitoquímicos responsables de esta actividad destacan los derivados fenólicos: timol y carvacrol, los cuales se unen a los grupos amino e hidroxilamino de las proteínas de la membrana bacteriana, alterando su permeabilidad. Con algo menos de actividad se presentan los derivados alcohólicos y cetónicos: alcanfor, citral y linalol, entre otros.¹⁶

Los fenoles son compuestos fitoquímicos simples y consisten en un anillo fenólico sustituido, además de ser el responsable del olor agradable en algunas plantas.

Por tal motivo para comparar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o cualquier otro agente, se emplea como patrón al fenol. El coeficiente fenólico de los aceites esenciales indica el grado de actividad de las distintas sustancias, con referencia a este compuesto. En el cuadro 2.3.11.2 se dan como referencia el coeficiente fenólico de algunos aceites esenciales.

¹⁶ Alonso; Jorge. "Tratado de Fitomedicina, bases clínicas y farmacológicas". Pg 60.

Cuadro N° 2.3.11.1

**GRUPOS QUÍMICOS MÁS IMPORTANTES CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS**

| Grupo químico | Compuesto | Planta | Actividad |
|-----------------|----------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| Fenoles Simples | Timol | <i>Thymus officinalis</i> (tomillo) | General |
| | Ácido Antémico | <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) | <i>S. Aureus.</i> <i>S. Thyphimurium</i> |
| | Terpenoide | <i>Ocimum bacilicum</i> | <i>Salmonella</i> |
| Quinonas | Hipericina | <i>Hypericum perforatum</i> (hipérico) | VIH |
| Taninos | | <i>Quercus rubra</i> (roble) | Bacteria y virus |
| | | <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) | Virus |
| | | <i>Melissa officinalis</i> (melisa) | |
| Cumarinas | | <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla) | Virus |
| Flaonas | Catequina | <i>Camellia sinensis</i> | <i>Shigella, Vibrio, S. Mutans</i> |
| | Isoflavona | <i>Millettia thonningii</i> | <i>Schistosoma</i> |
| | Quercitina | <i>Quercus rubra</i> (roble) | |
| Alcaloides | Coca | <i>Erythroxylum coca</i> (coca) | Cocos grampositivos |
| | Piperina | <i>Piper nigrum</i> | Hongos, <i>Lactobacillus</i> |
| | Mescalina | <i>Laphophora williamsii</i> (peyote) | General |

Fuente: D Domingo y López Brea, 2003.

Los mecanismos implicados en la acción de los agentes antimicrobianos son muy diversos. Entre los cuales pueden citarse:

- ✓ La inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular.
- ✓ Daño a la integridad de las membranas.
- ✓ Interferencia con una gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Consecuentemente, el efecto antimicrobiano es específico, no afectan a todos los microorganismos con la misma intensidad. Algunos son inhibidos con dosis muy reducidas otros en cambio resisten perfectamente dosis altas. Del mismo modo, algunos compuestos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos.

Cuadro N° 2.3.11.2

COEFICIENTE FENOLICO DE ALGUNOS ACEITES ESENCIALES

| Aceite esencial de : | Coefficiente fenólico |
|----------------------|-----------------------|
| Anís | 0.4 |
| Hinojo | 14 |
| Cardamomo | 10 |
| Coriandro | 5.4 |
| Tomillo | 13.4 |
| Baya de enebro | 0.1 |
| Canela | 7.1 |
| Limón | 0.4 |

Fuente: Muller, 1981.

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales encontrándose resultados bastante alentadores, ya que su actividad en algunos casos es comparable a la de algunos antibióticos que existen en el mercado. Por ejemplo, en 1960, investigadores comprobaron la potente actividad del *Pinus excelsa* contra la de otros aceites esenciales probados, inhibiendo así bacterias entero patógenas como: *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*,

Shigella flexeneri, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*.

Asimismo se ha demostrado que los aceites esenciales cítricos producen inhibición sobre levaduras como *S. Cereviceae*, *Z. Mellis* y *T. Utilis*, siendo estas más sensibles en comparación con las bacterias ya que su inhibición fue a concentraciones menores. Debido a estos resultados, el aceite esencial se indica como posible preservante de alimentos.

Del mismo modo se comprueba el efecto antifúngico de los aceites esenciales de las especies *Ocimum gratissimum* L. *Ocimum tenuiflorum* L. *Pimenta dioica* L. y *Piper auritum* H.B.K donde ponen de manifiesto su actividad frente a las especies *M. canis*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, actividad que en todos los casos fue debida a un daño letal que ocasionó el aceite sobre la célula fúngica.

Todas estas investigaciones no solo se realizan desde el punto de vista cualitativo sino también cuantitativo, ya que en todos los casos se tiene que hallar una concentración mínima inhibitoria en la cual el aceite esencial sea efectivo.

2.3.11.1 Determinación del crecimiento de poblaciones bacterianas

El crecimiento de una población o cultivo bacterianos se puede expresar en función de:

✓ Aumento de masa del cultivo

✓ Aumento del número de células

Ambos tipos de expresiones son equivalentes entre sí en cultivos que estén en crecimiento balanceado.

A. Medida de masa bacteriana.

1. Métodos directos:

Determinación del peso húmedo: Se obtiene a partir de una muestra en suspensión que es pesada luego de la separación de las células por filtración o centrifugación.

Determinación del peso seco: Contenido de sólidos, que se obtienen por el secado de un volumen en un horno a 105°C hasta peso constante.

Determinación del nitrógeno.- Técnica que permite determinar indirectamente la masa de una población bacteriana en base a la determinación de nitrógeno.

Determinación de un componente característico.- Se determina la cantidad existente de un determinado ácido nucleico (generalmente DNA) y a partir de este dato se estima la masa de la población.

2. Métodos indirectos

Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo.-

Ejemplos: consumo de oxígeno (QO₂) y consumo de

carbónico (QCO₂), determinados por el respirómetro de Warburg. Producción de ácidos.

Métodos turbidimétricos (ópticos). La base común de estos métodos consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano. Recordemos aquí que las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua. La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

- **Escala de MacFarland:** Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados.
- **Espectrofotómetro:** Este aparato es de uso habitual en cualquier laboratorio de Microbiología o Bioquímica. Mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia.
- **Nefelómetro:** Es un aparato similar al anterior pero de mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.

2.3.11.2 Pruebas de sensibilidad

A. Método base de dilución en caldo.- Este método consiste en hacer diluciones dobles y progresivas del antibacteriano a emplear. Cuando se siembra una cantidad

fija de bacterias, en tubos con medio líquido y con diluciones progresivas de antibacteriano, se observa que en aquellos donde se desarrolla la bacteria aparece turbidez, cuando el antibacteriano inhibe el crecimiento, aparece un aclaración de toda la masa líquida del medio de cultivo, y se puede determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), realizando resiembras en medio sólido, con intervalos pequeños de tiempo, se puede construir la curva de crecimiento bacteriano para cada concentración. A medida que la concentración del antibacteriano aumenta se observa una lentitud cada vez más marcada de la multiplicación bacteriana, hasta llegar a una concentración de antibacteriano, en la que no existe modificación del número de bacterias (Efecto bacteriostático). En los tubos siguientes en los que la concentración de antibacteriano es cada vez mayor, va disminuyendo el número de bacterias y puede alcanzarse una esterilización total (Efecto bactericida).

B. Método de Difusión en Agar.- se prueba la eficacia de los antibacterianos a partir de una siembra en superficie sobre un medio sólido de una suspensión bacteriana, y a continuación se pueden depositar sobre ella discos de papel de filtro (5 o 6 mm de diámetro) impregnado de antibacteriano o se pueden realizar

sacabocados de aproximadamente 5 o 6 mm de diámetro, y en estos orificios agregar una cantidad de aceite esencial de concentración conocida. El antibacteriano se difunde en el agar húmedo y se crea así concentraciones progresivamente decrecientes a partir del disco. En aquella zona donde la concentración del antibacteriano es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria, aparece un halo de inhibición.

2.3.11.3 Medida del número de individuos

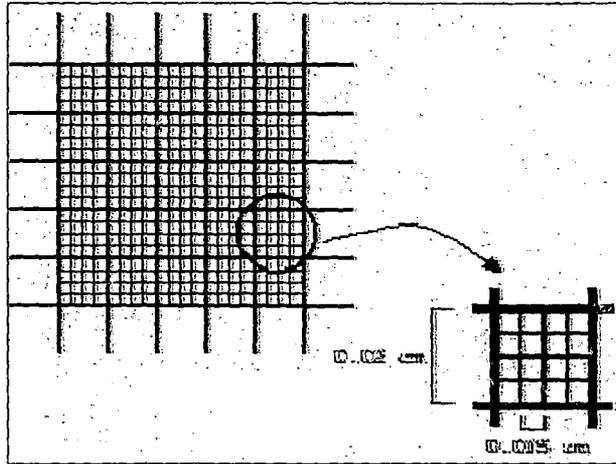
A. Métodos directos

1. Cámara de recuento de Petroff-Hauser:

portaobjetos especial con una graduación en superficie y unas medidas muy concretas. Tiene como ventaja el ser un método muy rápido, pero sólo sirve para suspensiones relativamente concentradas ($>10 \times 10^6$ céls./ml). Por debajo de este valor el número de células vistas en el campo del microscopio es muy pequeño y poco significativo estadísticamente.

Figura N° 2.3.11.3

Cámara de recuento de Petroff-Hausser



2. Recuento en preparaciones teñidas:

Se dispone de un portaobjetos con una excavación circular (de área A_t) con un volumen conocido (v).

Sobre esta excavación se extiende la muestra con asa de siembra o con micropipeta, y se fija y tiñe por algún colorante. Se observa con un microscopio dotado de un juego de ocular y objetivo que delimitan un área de campo (A_c). Si en dicho campo se cuentan n bacterias, la concentración de bacterias por mililitro será:

$$n \cdot A_t / A_c \cdot 1/v$$

3. Recuento proporcional de Wright: Se mezcla la suspensión bacteriana problema con una cantidad conocida de bolitas de látex o de hematíes. La

concentración bacteriana se deduce de la proporción de bacterias y partículas observadas en el mismo campo microscópico.

4. **Contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter):** Se hace pasar una suspensión bacteriana por un tubo capilar, entre los dos polos de una corriente eléctrica. Cada vez que por un orificio pasa una partícula (p. ej., bacteria) se interrumpe la corriente, lo cual es recogido por un dispositivo de registro electrónico, que detecta el número y el tamaño de las partículas que van pasando.

B. Métodos indirectos.- son métodos que miden el número de bacterias viables (que no equivale al de totales).

1. **Método del número más probable:** su fundamento estriba en la distribución de Poisson.
2. **Recuento de viables en placa:** , basadas en colocar en un medio de cultivo adecuado un volumen determinado de muestra. Cada una de las células aisladas dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia de forma que el número de estas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra plaqueada (sembrada).

3. **Determinación de la proporción células viables/células totales:** se recurre a la técnica de microcultivos en cubreobjetos.
4. **Recuento sobre filtros de nitrocelulosa:** Se usa para suspensiones diluidas de bacterias. Se hace pasar un gran volumen de suspensión a través de una membrana de nitrocelulosa estéril, que retiene las bacterias. Posteriormente, el filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias se forman sobre el filtro y se cuentan, deduciéndose la concentración original en función del volumen de suspensión que se hizo pasar por el filtro.

2.3.11.4 Cultivo en sistemas cerrados

En los sistemas cerrados (que pueden ser líquidos o sólidos), no existe aporte continuo de nutrientes, ni drenaje de células ni de sustancias de desecho.

En estos sistemas la fase exponencial de crecimiento balanceado no restringido dura sólo unas cuantas generaciones, debido al agotamiento de nutrientes y/o a la acumulación de desechos.

A. Curva de crecimiento en un sistema cerrado en medio líquido

1. Fase de retardo (fase "lag").- Se trata de un período de ajuste metabólico (adaptación) y su duración depende de varios factores:

- ✓ Tamaño del inóculo.
- ✓ Estado metabólico previo del inóculo.
- ✓ Medio del que procede el inóculo.

2. Fase de transición, de crecimiento acelerado.- en esta fase se da un incremento de la síntesis de ribosomas y de las actividades oxido reductoras. Asimismo se da mayor velocidad de síntesis de enzimas.

3. Fase de crecimiento exponencial (fase logarítmica). Las células del inóculo no están todas en las mismas condiciones fisiológicas. Se da un crecimiento balanceado no restringido durante unas pocas generaciones (normalmente menos de 10). El tiempo de generación (g) es característico para cada especie o cepa, en cada medio concreto. El valor del tiempo de generación (g) depende de:

- ✓ Composición del medio
- ✓ Temperatura
- ✓ pH
- ✓ Osmolaridad (tonicidad), etc.

4. **Fase de aceleración negativa.**- en esta fase disminuyen de los factores de crecimiento e incrementan el nivel de metabolitos tóxicos a nivel intracelular, asimismo existe una disminución de síntesis de Proteínas y enzimas y del crecimiento celular.

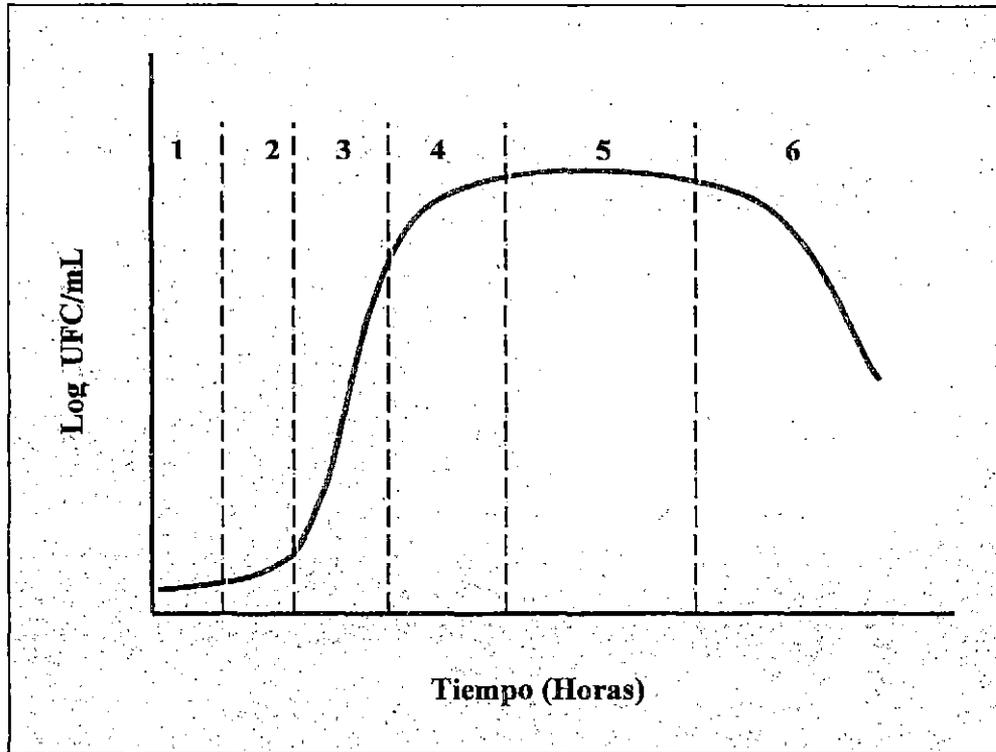
5. **Fase estacionaria.**- en esta fase el coeficiente neto de crecimiento se hace nulo, pero aún existe crecimiento. El crecimiento bruto se equilibra con las muertes celulares, y se empiezan a observar condiciones desfavorables como el agotamiento de nutrientes especiales, acumulación sustancias de desecho, el pH del medio empieza a hacerse inadecuado.

6. **Fase de muerte exponencial.**- finalmente se presenta la muerte y lisis masiva, exponencial, del cultivo. Esto se debe principalmente al agotamiento de reservas de energía. Algunas veces

las células aparecen grandes, hinchadas, distorsionadas (formas "fantasmas", "ghost").

Figura N° 2.3.11.2

Curva de crecimiento en un sistema cerrado en medio líquido



III. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. Materiales, Equipos y reactivos.

- ✓ Agitador capilar.
- ✓ Ansa de siembra.
- ✓ Balón de 200 mL con cuello esmerilado.
- ✓ Bureta de 25 mL con llave graduada al 0.1.
- ✓ Cápsula para desecar
- ✓ Cápsula con tapa (fondo redondo de 86 mm de diámetro con reborde especial para evitar pérdidas).
- ✓ Discos de antibióticos.
- ✓ Embudos y sifones para picnómetros.
- ✓ Fragmento de piedra pómez.
- ✓ Frasco seco con tapa.
- ✓ Matraces aforados de precisión con tapa.
- ✓ Matraz erlenmeyer de 100 mL.
- ✓ Matraz volumétrico para aldehídos.
- ✓ Mortero.
- ✓ Picnómetro de 5, 10 ó 25 mL de capacidad.
- ✓ Pipetas volumétricas de 25, 10, 5, 2, 1, y 0.1 mL.
- ✓ Placas petri de aproximadamente 10 cm de diámetro.
- ✓ Probetas de 250, 100, 50 y 10 mL.
- ✓ Suero fisiológico.
- ✓ Tubo de vidrio que sirva de refrigerante no mayor de 1 m de longitud y de 1 cm de diámetro interno.
- ✓ Tubos de ensayo.

- ✓ Enterococos faecalis ATCC 29212.
- ✓ Escherichia Coli .
- ✓ Pseudomona aureuginosa ATCC 27853.
- ✓ Staphylococcus Aureus ATCC 25923.
- ✓ Streptococos mutans.
- ✓ Agar Nutritivo.
- ✓ Agar BHI.
- ✓ Agar Mc Conkey.
- ✓ Agar verde brillante (KAUFFMANN).
- ✓ Agar Baird Parker.
- ✓ Agar Azida sangre.
- ✓ Agar Agar.
- ✓ Agua peptonada.
- ✓ Caldo nutritivo.
- ✓ Caldo infusión cerebro corazón (BHI).
- ✓ Autoclave. (0-30 psi / 20-300°C)
- ✓ Balanza Analítica.
- ✓ Baño maría (provisto de una plancha perforada con huecos de 70 mm de diámetro).
- ✓ Centrífuga.
- ✓ Contador mecánico de colonias. Marca KARL KOLB.
- ✓ Cromatógrafo de Gases con detector de masas.
- ✓ Desecador.
- ✓ Dispositivo de saponificación.
- ✓ Estufa eléctrica (20-240°C).

- ✓ Filtro a vacío.
- ✓ Fuente luminosa (longitud de onda de 589.3 nm +/- 0.3 nm).
- ✓ Incubadora de laboratorio (20-60°C).
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Mufla.
- ✓ Polarímetro (precisión de +/- 2 minutos ó 0.03°).
- ✓ Refractómetro clásico.
- ✓ Termómetro de precisión.
- ✓ Tubo de observación: L = 200 nm +/- 0.05 nm (aceites esenciales de coloración débil).
- ✓ Vernier.
- ✓ Ácido tartarico en polvo.
- ✓ Etanol de concentración conocida.
- ✓ Etanol 95% (v/v) neutralizado con la solución de KOH en fenolftaleina o rojo de fenol (cuando el aceite esencial contiene componentes o grupos fenólicos).
- ✓ Fenolftaleina 2 gr./L en etanol 95% (v/v).
- ✓ HCL ó H2SO4 (ác. clorhídrico o ácido sulfúrico) sln titulada 0,5 N.
- ✓ Hidróxido de potasio KOH 0.1 N en etanol.
- ✓ Hidróxido de sodio 0.4 N.
- ✓ Rojo de fenol 0.4 gr./L en etanol al 20% (v/v).
- ✓ Solución de NaOH acuosa al 3% exenta de sílice y alumina.
- ✓ Solución de NaOH acuosa al 5% exenta de sílice y alumina.
- ✓ Sulfato de Magnesio.
- ✓ Xileno exento de impurezas solubles en la solución de NaOH.

3.2.Preparación del material para la extracción del aceite esencial.

La recolección se realizó en el Norte de Yauyos, que se ubica en la región central y occidental del Perú, en la parte superior de la cuenca del río Cañete, en el Departamento de Lima. Es una zona montañosa que esta comprendida entre los 2500 y 4800 msnm. La recolección se llevo a cabo entre los meses de mayo y junio del año 2006. Seguidamente se procedió al secado de la planta en la zona de recolección. Asimismo se realizó la clasificación botánica de la planta por el Biólogo Jeni Barboza.

3.3.Extracción del aceite esencial.

La extracción del aceite esencial se llevo a cabo empleando el método por arrastre con vapor de agua. Procedimiento por el cual la muestra vegetal seca es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa.

3.4.Preparación del aceite esencial para análisis.

La preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo a las Norma Técnica Peruana: NTP 319.077:1974; Aceites Esenciales. Preparación de la muestra para el análisis.

3.5. Determinaciones físicas.

3.5.1. Determinación de la Densidad Relativa.

Esta determinación se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319.081:1974. La densidad relativa es la relación de la densidad del aceite esencial y la del agua destilada.

3.5.2. Determinación de la Desviación Polarimétrica.

Esta determinación se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319.076:1974. La desviación polarimétrica de un aceite esencial es el ángulo, sobre el cual gira el plano de polarización, de la luz cuando esta atraviesa cierto espesor del aceite esencial en condiciones determinadas.

3.5.3. Determinación del Índice de Refracción.

Esta determinación se realizó empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319.075:1974. El Índice de Refracción de un aceite esencial es la relación del seno del ángulo de incidencia al del ángulo de refracción, de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa del aire al aceite esencial, manteniendo una temperatura constante.

3.5.4. Determinación de la solubilidad en etanol.

La determinación de la Solubilidad en etanol se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319.084:1974.

Es aquella cuya solución que aclara volúmenes de alcohol de graduación t , y permanece constante después de la adición posterior de alcohol de la misma concentración, hasta completar un total de 20 volúmenes del alcohol empleado

3.5.5. Determinación del residuo por evaporación.

La determinación del Residuo por Evaporación se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319.089:1974. Se basa en pesar el residuo de la fracción volátil del aceite esencial después de la evaporación a baño maría.

3.6. Determinaciones químicas.

3.6.1. Determinación del Índice de Ester.

La determinación del Índice de Ester se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319 088:1974. Es el número de miligramos de hidróxido de potasio necesario para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los esteres contenidos en una muestra de aceite esencial.

3.6.2. Determinación del Índice de Acidez.

La determinación del Índice de Acidez se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319 085:1974. Es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio necesario para neutralizar los ácidos libres contenidos en un gramo de aceite esencial.

3.6.3. Determinación del contenido de fenoles.

La determinación del contenido de fenoles se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana: NTP 319 091:1974, que se basa en la transformación de los fenoles contenidos en un volumen de aceite esencial, en fenatos alcalinos y la posterior medición de la fracción de aceite no transformado. El coeficiente fenólico de los aceites esenciales indica el grado de actividad de las diferentes sustancias con referencia al fenol. Este se emplea como patrón con el que se compara el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o cualquier agente bactericida.

3.6.4. Identificación y Cuantificación de los componentes del Aceite Esencial de *Minthostachys setosa* (Muña) por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

Esta técnica acoplada, permite obtener el espectro de masas de cada componente del aceite esencial con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Esta se llevó a cabo en un Cromatógrafo de gases con detector de masas marca Perkin Elmer, modelo Clarus, a las siguientes condiciones cromatográficas:

- ❖ Temperatura del horno: 80°C por 2 min. 10°C hasta 300°C x 30 min.
- ❖ Temperatura del inyector: 200°C.
- ❖ Temperatura del detector: 200°C
- ❖ Flujo: 20 PSI.

- ❖ Columna empleada: SPB-1.
- ❖ Volumen de inyección: 0.2µL.

3.7.Determinación del Efecto Antibacteriano.

3.7.1. Preparación del Inóculo.

Las cepas *Enterococos faecalis* ATCC 29212, *Pseudomona aureuginosa* ATCC 27853 *Scherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococos aureus* ATCC 25923 fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud, en el caso de *Streptococos mutans* fue aislada de muestras bucales de los alumnos de de la Universidad Nacional del Callao. Previamente a la preparación del inóculo se procedió inocular una colonia de cada cepario en caldo nutritivo, se incubaron por un periodo de 18 a 24 horas a 37°C y posteriormente se hace una siembra en estría en el agar correspondiente a cada una de las cepas. Se seleccionaron 1 ó 2 colonias bien aisladas de siembra en estría. Se preparó una suspensión en caldo nutritivo. Se dejó incubar a 37 °C por un periodo de 18 a 24 horas. Luego se ajustó la turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland (esta turbidez equivale a 1.5×10^8 UFC/mL), por comparación visual con el estándar. Para ello, se miran los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

3.7.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se empleo el método de diluciones dobles en caldo (según la figura 3.7.2.1), para lo cual se inoculó tubos que contenían 1 mL de una concentración determinada de aceite esencial con 0.1 mL del inoculo detallado anteriormente. Paralelamente se tomaron alícuotas de tal manera que se efectuaron resiembras en medio sólido, con intervalos de tiempo determinados, esto con la finalidad de elaborar las curvas de inhibición del aceite esencial, a diferentes concentraciones, frente a cada una de las bacterias estudiadas.

Con la finalidad de explicar el efecto antibacteriano del aceite esencial de muña se analizaron los parámetros de crecimiento para las curvas obtenidas a diferentes concentraciones, tales como: Tiempo generacional, Numero de generaciones, Velocidad de Crecimiento y Letalidad.

3.7.3. Prueba de sensibilidad.

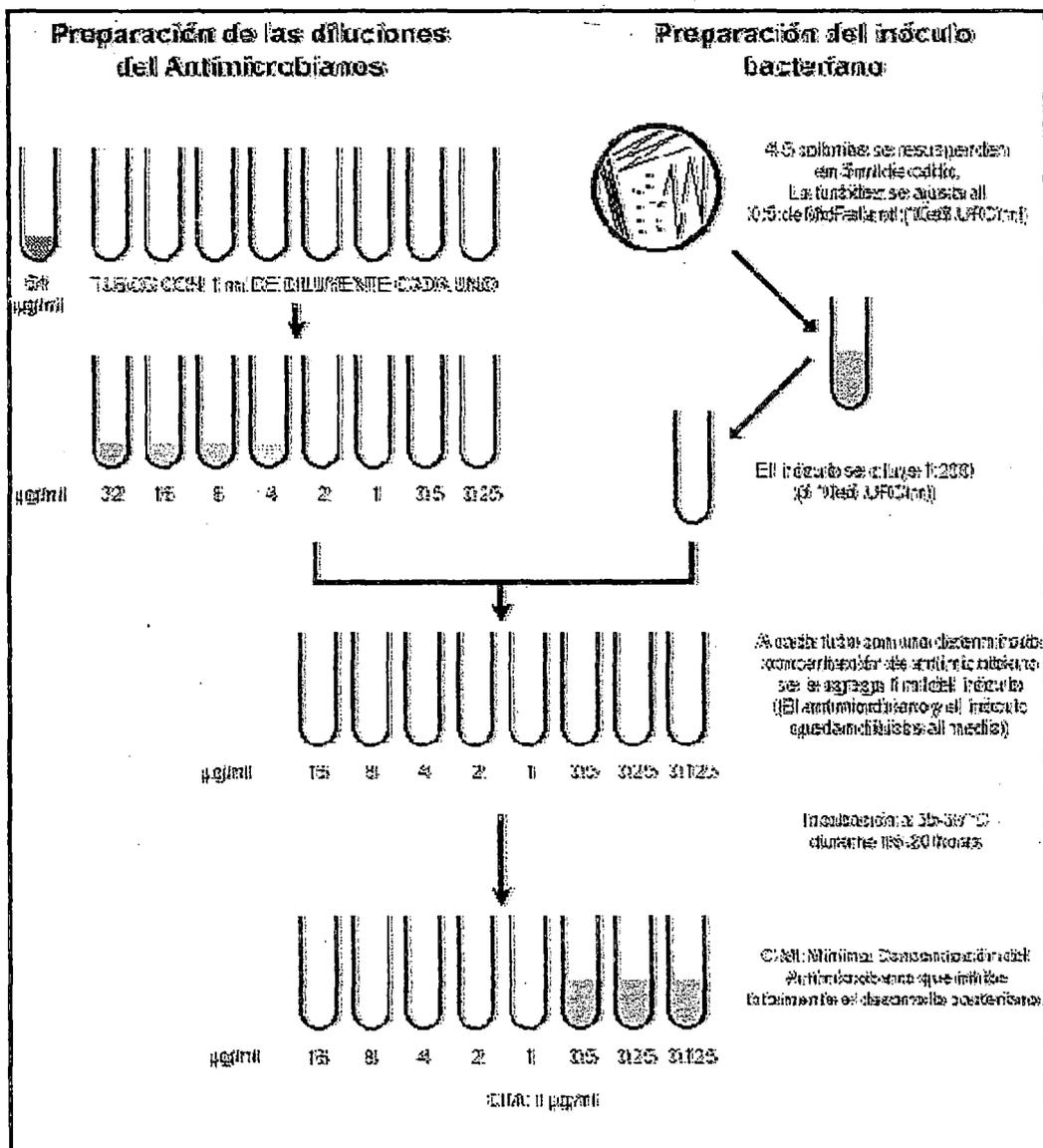
El principio del método involucra el uso de una cantidad constante de antimicrobiano en un reservorio (discos de papel) aplicado sobre la superficie del agar en el cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión (esta suspensión bacteriana se prepara de igual forma a la detallada en la sección 3.7.1). Se forma así un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo está indicada por el tamaño de la

zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. En el caso del aceite esencial se elaboraron los discos con papel de filtro empapados de 0.1 mL de la concentración correspondiente al CMI de cada bacteria.

Este método se empleó para poder comparar el resultado de la concentración mínima inhibitoria para cada una de las bacterias estudiadas con su correspondiente antibiótico de uso comercial.

Figura N° 3.7.2.1

Metodología Para La Determinacion De La Concentracion Minima Inhibitoria



IV.RESULTADOS

4.1.Preparación del material para la extracción del aceite esencial.

La preparación del material a emplear se llevo a cabo de acuerdo a lo explicado en la sección 3.2, al término del cual se determino la humedad relativa y el contenido de cenizas por triplicado y los resultados fueron:

Tabla N° 4.1.1 Contenido de cenizas totales y % de Humedad Relativa del material a emplear

| Numero de Muestra | % Humedad | Cenizas Totales (%) |
|-------------------|-----------|---------------------|
| Muestra 1 | 9.8 | 7.96 |
| Muestra 2 | 10.01 | 8.20 |
| Muestra 3 | 10.13 | 8.30 |

4.2. Extracción del aceite esencial.

Se llevaron a cabo 5 extracciones sucesivas, cuyos datos experimentales son:

Tabla N° 4.2.1: Primera Extracción del Aceite esencial de muña

| T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) |
|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| 0 | 0 | 9 | 11 | 18 | 14 |
| 1 | 2 | 10 | 12 | 19 | 15 |
| 2 | 3 | 11 | 12 | 20 | 15 |
| 3 | 5 | 12 | 12 | 21 | 15 |
| 4 | 5 | 13 | 13 | 22 | 15 |
| 5 | 7 | 14 | 13 | 23 | 15 |
| 6 | 8 | 15 | 14 | 24 | 15 |
| 7 | 8 | 16 | 14 | | |
| 8 | 9 | 17 | 14 | | |

Grafica N° 4.2.1 Curva de la primera extracción del aceite esencial de muña

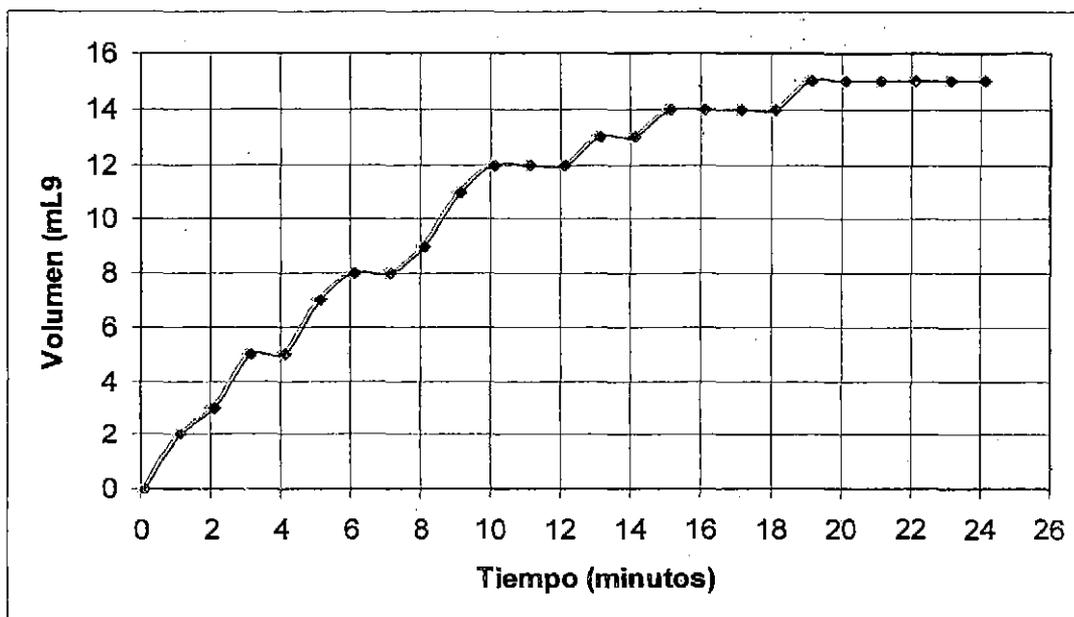


Tabla N° 4.2.2: Segunda Extracción del Aceite esencial de muña

| T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) |
|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| 0 | 0 | 11 | 15 | 22 | 20 |
| 1 | 4 | 12 | 15 | 23 | 20 |
| 2 | 6 | 13 | 16 | 24 | 20 |
| 3 | 7 | 14 | 17 | 25 | 20 |
| 4 | 9 | 15 | 18 | 26 | 20 |
| 5 | 10 | 16 | 18 | 27 | 20 |
| 6 | 11 | 17 | 18 | 28 | 20 |
| 7 | 12 | 18 | 18 | 29 | 20 |
| 8 | 12 | 19 | 18 | 30 | 20 |
| 9 | 13 | 20 | 19 | | |
| 10 | 14 | 21 | 19 | | |

Grafica N°4.2.2 Curva de la segunda extracción del aceite esencial de muña

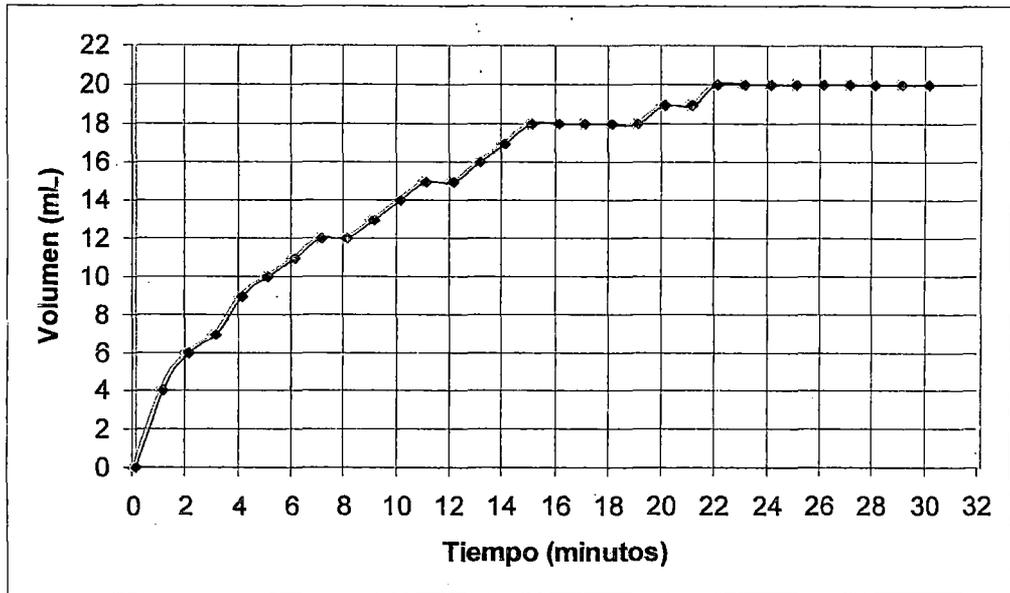


Tabla N° 4.2.3: Tercera Extracción del aceite esencial de muña

| T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) |
|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| 0 | 0 | 11 | 17 | 22 | 20 |
| 1 | 4 | 12 | 18 | 23 | 20 |
| 2 | 5 | 13 | 18 | 24 | 20 |
| 3 | 8 | 14 | 18 | 25 | 20 |
| 4 | 10 | 15 | 18 | 26 | 20 |
| 5 | 11 | 16 | 19 | 27 | 20 |
| 6 | 12 | 17 | 19 | 28 | 20 |
| 7 | 13 | 18 | 19 | 29 | 20 |
| 8 | 14 | 19 | 19 | 30 | 20 |
| 9 | 15 | 20 | 19 | | |
| 10 | 16 | 21 | 19 | | |

Grafica N°4.2.3 Curva de la tercera extracción del aceite esencial de muña

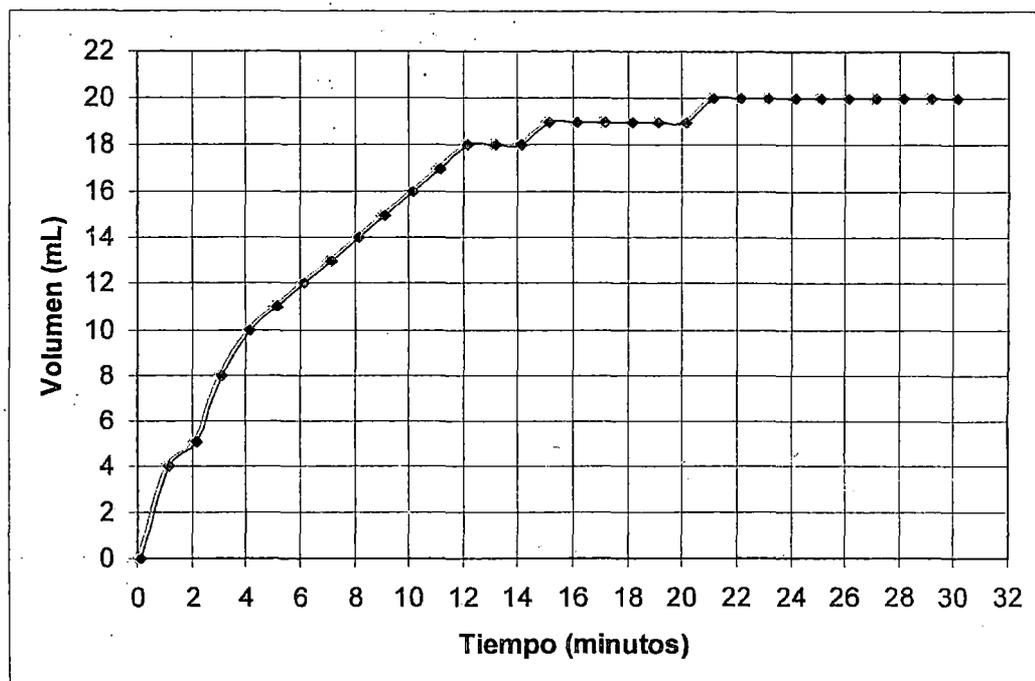


Tabla N° 4.2.4: Cuarta Extracción del aceite esencial de muña

| T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) |
|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| 0 | 0 | 11 | 15 | 22 | 19 |
| 1 | 3 | 12 | 16 | 23 | 19 |
| 2 | 5 | 13 | 17 | 24 | 20 |
| 3 | 6 | 14 | 17 | 25 | 20 |
| 4 | 7 | 15 | 17 | 26 | 20 |
| 5 | 9 | 16 | 18 | 27 | 20 |
| 6 | 10 | 17 | 19 | 28 | 20 |
| 7 | 11 | 18 | 19 | 29 | 20 |
| 8 | 12 | 19 | 19 | 30 | 20 |
| 9 | 13 | 20 | 19 | | |
| 10 | 14 | 21 | 19 | | |

Grafica N°4.2.4 Curva de la cuarta extracción del aceite esencial de muña

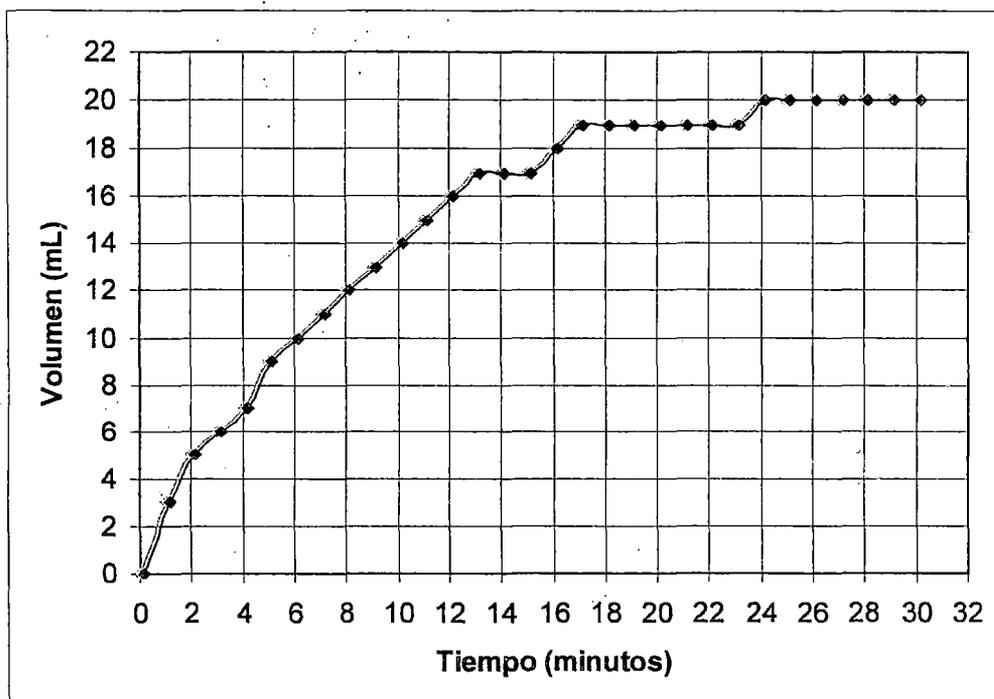
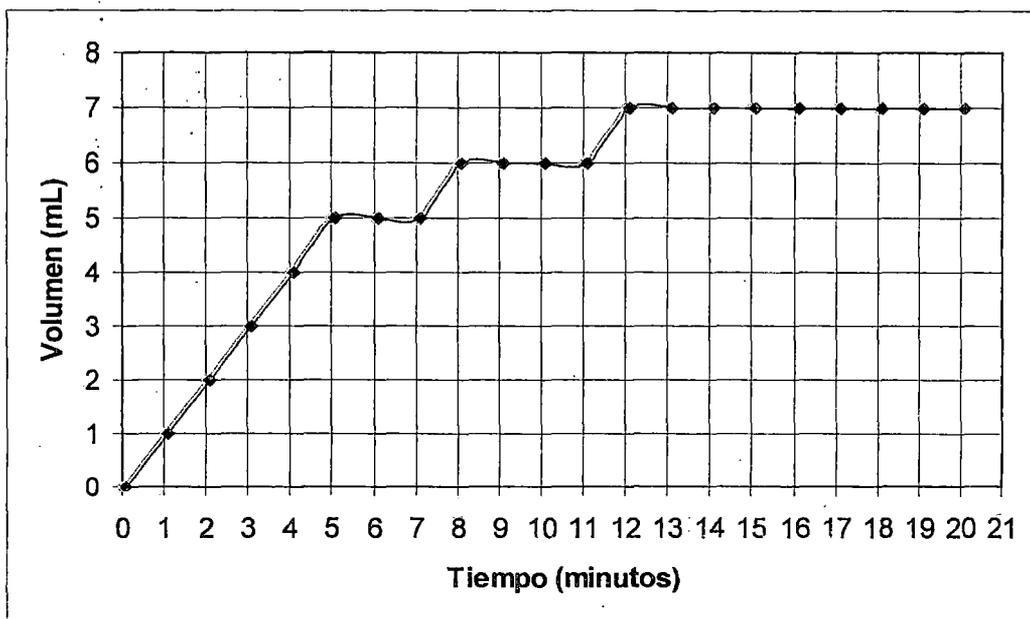


Tabla N° 4.2.5: Quinta Extracción del aceite esencial de muña

| T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) | T (minutos) | V (mL) |
|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| 0 | 0 | 7 | 6 | 14 | 7 |
| 1 | 1 | 8 | 6 | 15 | 7 |
| 2 | 2 | 9 | 6 | 16 | 7 |
| 3 | 3 | 10 | 6 | 17 | 7 |
| 4 | 4 | 11 | 6 | 18 | 7 |
| 5 | 5 | 12 | 7 | 19 | 7 |
| 6 | 5 | 13 | 7 | 20 | 7 |

Grafica N°4.2.5 Curva de la quinta extracción del aceite esencial de muña



Grafica N°4.2.6 Superposición de Graficas de Extracción de aceite esencial de muña

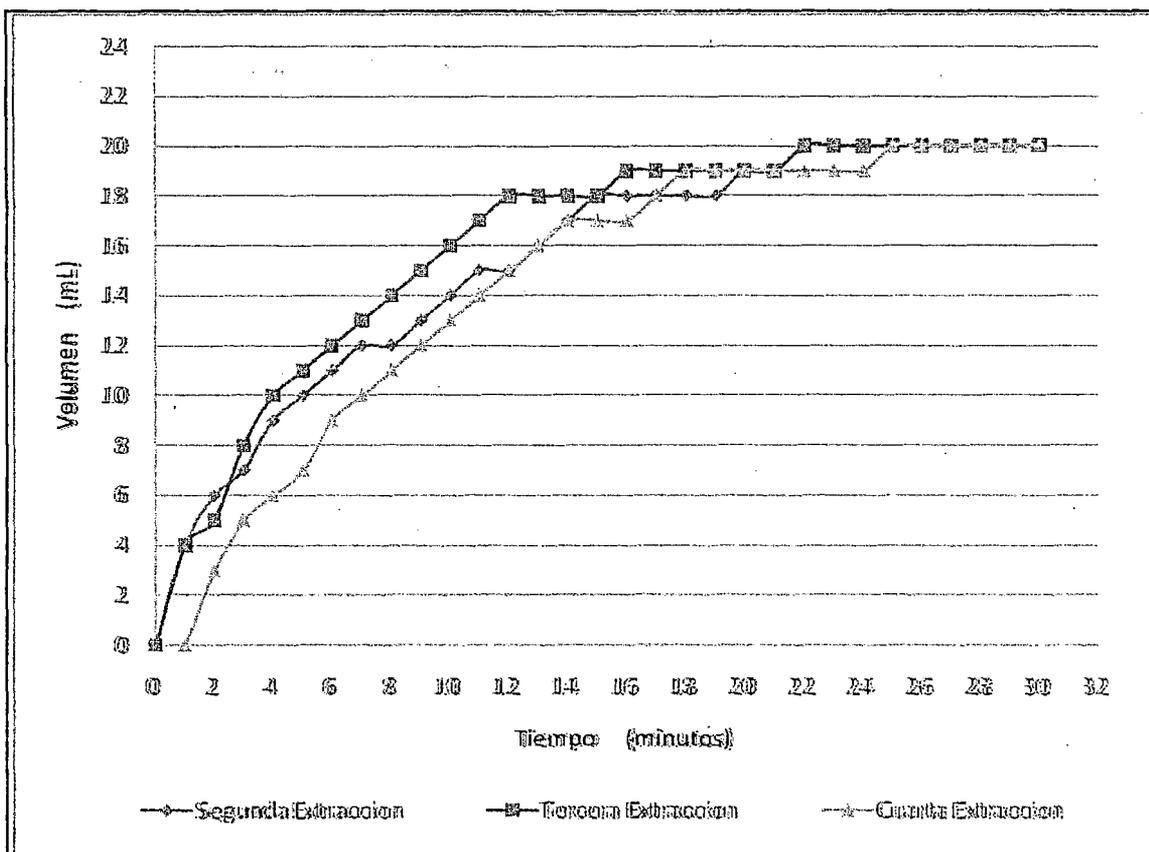


Tabla N°4.2.6: Rendimiento promedio de la extracción del aceite esencial de muña

| N° de Extracción | Tiempo (minutos) | Peso de muestra (gramos) | Volumen Final (mL) | Rendimiento (%) |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1 | 24 | 1330 | 15 | 1.059924812 |
| 2 | 30 | 1770 | 20 | 1.061920904 |
| 3 | 30 | 1780 | 20 | 1.055955056 |
| 4 | 30 | 1750 | 20 | 1.074057143 |
| 5 | 20 | 620 | 7 | 1.061064516 |
| Rendimiento promedio = 1.062 | | | | |

4.3. Determinaciones físicas.

4.3.1 Determinación de la Densidad Relativa (NTP 319.081:1974), Desviación Polarimétrica (NTP 319.076:1974) e Índice de Refracción (NTP 319.075:1974)

La densidad relativa, la Desviación Polarimétrica y El índice de Refracción obtenidos se muestran en la tabla 4.3.1.1.

Tabla N° 4.3.1.1 Densidad relativa, Desviación Polarimétrica e Índice de Refracción del aceite esencial de muña

| | Densidad Relativa | Desviación Polarimétrica | Índice de Refracción |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Medida 1 | 0.940 | 2°45' | 1.476 |
| Medida 2 | 0.9397 | 2°46' | 1.4755 |
| Medida 3 | 0.9398 | 2°45' | 1.4755 |
| Promedio | 0.9398 | 2°45' | 1.4757 |

4.3.3 Determinación de la solubilidad en etanol (NTP 319.084:1974)

Tabla N° 4.3.4.1 Solubilidad del aceite esencial de muña en etanol

| Concentración de alcohol | Volumen De alcohol añadido | | |
|--------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| | Primera adición de alcohol. Solución clara | Segunda adición de alcohol. Punto de opalescencia | Tercera adición de alcohol. Desaparición de la opalescencia |
| 70 % | 2.6 mL | 3 mL | No desaparece |
| 75% | 1.1 mL | 4.5 mL | No desaparece |
| 80% | 0.8 mL | 2 mL | 13 mL |
| 85% | 0.6 mL | No hubo opalescencia | |
| 90% | 0.2 mL | No hubo opalescencia | |
| 95% | Se solubiliza instantáneamente. | | |

4.3.4 Determinación del residuo por evaporación (NTP 319.089:1974)

Tabla N° 4.3.5.1 Residuo por evaporación promedio del aceite esencial de muña

| | Medida 1 | Medida 2 | Medida 3 |
|------------------------------|----------|----------|----------|
| P | 1.010 | 1.012 | 1.021 |
| PI | 0.8442 | 0.8445 | 0.8526 |
| Rev (%) | 83.58 | 83.45 | 83.51 |
| Rev promedio = 83.5 % | | | |

4.4 Determinaciones químicas.

4.4.1 Determinación del Índice de Ester (NTP 319 088:1974)

Tabla N° 4.4.1.1 Determinación del índice de ester promedio aceite esencial de muña

| | Medida 1 | Medida 2 | Medida 3 |
|------------------------------------|----------|----------|----------|
| P (gr) | 2.0099 | 2.0144 | 2.0112 |
| V (mL) | 1.5 | 1.6 | 1.5 |
| V ₁ (mL) | 3.6 | 3.6 | 3.6 |
| Índice de Ester | 27.1074 | 25.6495 | 27.0885 |
| Índice de Ester promedio = 26.6151 | | | |

4.4.2 Determinación del Índice de Acidez (NTP 319 085:1974)

Tabla N° 4.4.2.1 Determinación del índice de acidez promedio aceite esencial de muña

| | Medida 1 | Medida 2 | Medida 3 |
|---------------------------------|----------|----------|----------|
| P (gr) | 1.0368 | 1.0102 | 1.0388 |
| V _{KOH} (mL) | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Índice de Acidez | 2.164 | 2.22 | 2.16 |
| Índice de Acidez promedio = 2.2 | | | |

4.4.3 Determinación del contenido de fenoles (NTP 319 091:1974)

Tabla N° 4.4.3.1 Determinación del contenido de fenoles promedio aceite esencial de muña

| | Medida 1 | Medida 2 | Medida 3 |
|------------------------------------|----------|----------|----------|
| V | 3.6 | 3.6 | 3.6 |
| Contenido de fenoles | 64 | 64 | 64 |
| Contenido de fenoles promedio = 64 | | | |

4.4.4 Identificación y Cuantificación de los componentes del Aceite Esencial de *Minthostachys setosa* (Muña) por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

Tabla N° 4.4.4.1 Composición química del aceite esencial de muña

| N° | TR | COMPUESTOS | PM | FORMULA | % |
|----|-------|---------------------------------------|-----|------------------------------------------------|---------|
| 1 | 2.65 | Butanal, 3-Methyl | 86 | C ₅ H ₁₀ O | 0.0078 |
| 2 | 5.45 | Butanoic Acid,2-Methyl-,Ethyl Ester | 130 | C ₇ H ₁₄ O ₂ | 0.0068 |
| 3 | 9.15 | Alpha.-Pinene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.6495 |
| 4 | 11.33 | Beta.-Pinene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.7038 |
| 5 | 11.63 | Beta.-Myrcene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.2149 |
| 6 | 13.76 | DL-Limonene | 136 | C ₅ H ₁₂ O | 1.0416 |
| 7 | 13.90 | 1.8-Cineole | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 0.1227 |
| 8 | 15.64 | Linalool Oxide | 170 | C ₁₀ H ₁₈ O ₂ | 0.0467 |
| 9 | 16.98 | Linalool | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 2.1259 |
| 10 | 19.64 | P-Menthone | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 24.1305 |
| 11 | 20.52 | Isopulegone | 152 | C ₁₀ H ₁₆ O | 1.4643 |
| 12 | 22.97 | Pulegone | 152 | C ₁₀ H ₁₈ O | 29.2150 |
| 13 | 24.88 | 8-Hidroxy-delta.-4(5)-P-Menthen-3-one | 168 | C ₁₀ H ₁₆ O ₂ | 0.1750 |
| 14 | 25.14 | Phenol,5-Methyl-2-(1-methylethyl) | 150 | C ₁₀ H ₁₄ O | 0.1658 |
| 15 | 27.64 | Piperitonone Oxide | 166 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ | 11.9734 |
| 16 | 29.62 | Trans-Caryophyllene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.8810 |
| 17 | 30.09 | Carane,4,5-Epoxy-,trans | 152 | C ₁₀ H ₁₆ O | 0.2668 |
| 18 | 30.76 | Alpha.-Humelene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.1166 |
| 19 | 30.91 | Alloaromadendrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.0381 |
| 20 | 31.55 | Germacrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.3335 |
| 21 | 31.87 | Ledene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.0191 |
| 22 | 32.07 | Bicyclogermacrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 1.3888 |

| | | | | | |
|----|-------|--------------------------|-----|------------------------------------------------|---------|
| 23 | 32.73 | IS,Cis-Calamenene | 202 | C ₁₅ H ₂₂ | 0.0102 |
| 24 | 34.64 | (+)Spathulenol | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 1.2705 |
| 25 | 34.79 | (-)-Caryophyllene Oxide | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.1705 |
| 26 | 36.23 | Isospathulenol | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.6084 |
| 27 | 37.22 | Longipinocarveol, Trans- | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.0205 |
| 28 | 42.63 | Platambin | 238 | C ₁₅ H ₂₆ O ₂ | 0.0426 |
| 29 | 45.95 | Manoyl Oxide | 290 | C ₂₀ H ₃₄ O | 0.0889 |
| | | Otros | | | 22.7008 |

4.5 Determinación del Efecto Antibacteriano.

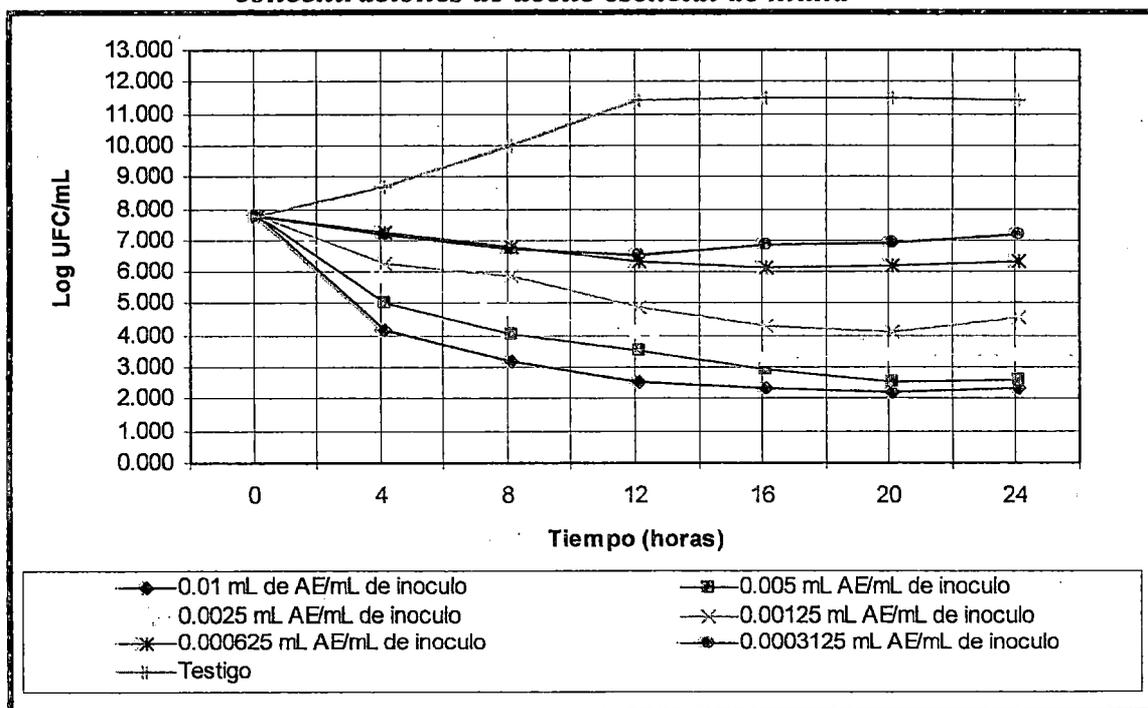
4.5.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

A. **Enterococos faecalis.**- para este microorganismo se empleo una batería de 6 concentraciones, dentro de las cuales se observo efecto antibacteriano.

Tabla N° 4.5.1.1 Efecto del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Enterococos faecalis*

| Tiempo (horas) | Log UFC/mL | | | | | | |
|----------------|------------|-------------------------------------------------------------------------|-------|--------|---------|---------|-----------|
| | Testigo | Concentraciones experimentales en mL de aceite esencial / ml de inoculo | | | | | |
| | | 0.01 | 0.005 | 0.0025 | 0.00125 | 0.00063 | 0.0003125 |
| 0 | 7.778 | 7.778 | 7.778 | 7.778 | 7.778 | 7.778 | 7.778 |
| 4 | 8.663 | 4.203 | 5.000 | 5.903 | 6.301 | 7.250 | 7.185 |
| 8 | 9.987 | 3.202 | 4.033 | 4.845 | 5.863 | 6.769 | 6.737 |
| 12 | 11.430 | 2.536 | 3.533 | 4.119 | 4.903 | 6.312 | 6.532 |
| 16 | 11.525 | 2.381 | 2.943 | 3.279 | 4.287 | 6.124 | 6.878 |
| 20 | 11.486 | 2.236 | 2.568 | 3.367 | 4.112 | 6.213 | 6.932 |
| 24 | 11.422 | 2.368 | 2.634 | 3.399 | 4.556 | 6.320 | 7.164 |

Grafica N° 4.5.1.1 Curva de crecimiento de *Enterococos faecalis* a diferentes concentraciones de aceite esencial de muña



Cuadro N° 4.5.1.1 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre el Tiempo Generacional de Enterococos faecalis

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 22.88689284 | 1.515559206 | 22.88689284 | 1.515559206 |
| Grados de libertad | 5 | 12 | 5 | 12 |
| Promedio de los cuadrados | 4.577378569 | 0.1262966 | 4.577378569 | 0.1262966 |
| F | 36.24308613 | | 36.24308613 | |
| Valor crítico para F | 3.105875239 | | 5.064343111 | |
| Probabilidad | 7.7524E-07 | | 7.7524E-07 | |

Cuadro N° 4.5.1.2 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre la Velocidad de Crecimiento de Enterococos faecalis

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 2.698725617 | 0.043170666 | 2.698725617 | 0.043170666 |
| Grados de libertad | 5 | 12 | 5 | 12 |
| Promedio de los cuadrados | 0.539745123 | 0.003597555 | 0.539745123 | 0.003597555 |
| F | 150.0310773 | | 150.0310773 | |
| Valor crítico para F | 3.105875239 | | 5.064343111 | |
| Probabilidad | 2.18877E-10 | | 2.18877E-10 | |

Tabla N° 4.5.1.2 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de *Enterococos faecalis*

| Concentración de Aceite Esencial | Tiempo Generacional (Tg) | Numero de Generaciones (n) |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0.0003125 | -3.745092196 | -3.33604629 |
| 0.000625 | -3.025577425 | -5.29293876 |
| 0.00125 | -1.458639215 | -11.0055478 |
| 0.0025 | -1.193708753 | -13.4615599 |
| 0.005 | -0.951181474 | -16.847712 |
| 0.01 | -0.72578856 | -16.5697773 |
| Testigo | 0.989145659 | 12.1316814 |

Grafica N° 4.5.1.2 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de *Enterococos faecalis*

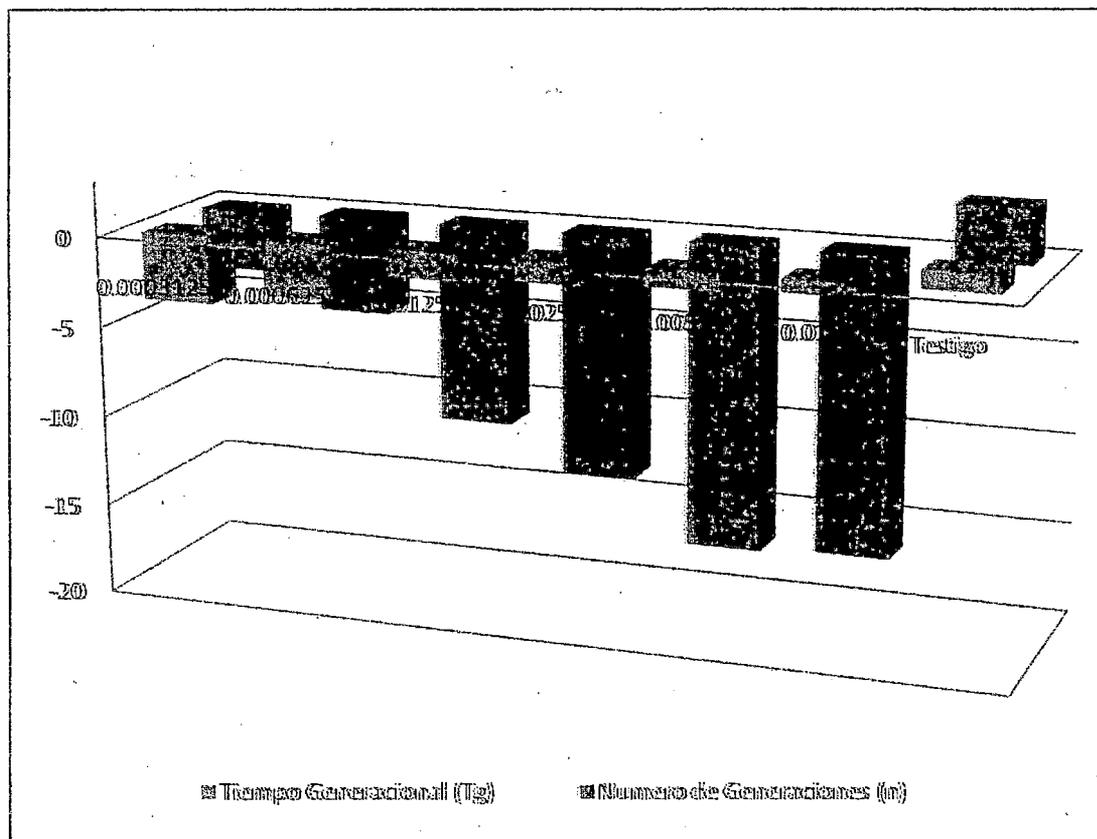
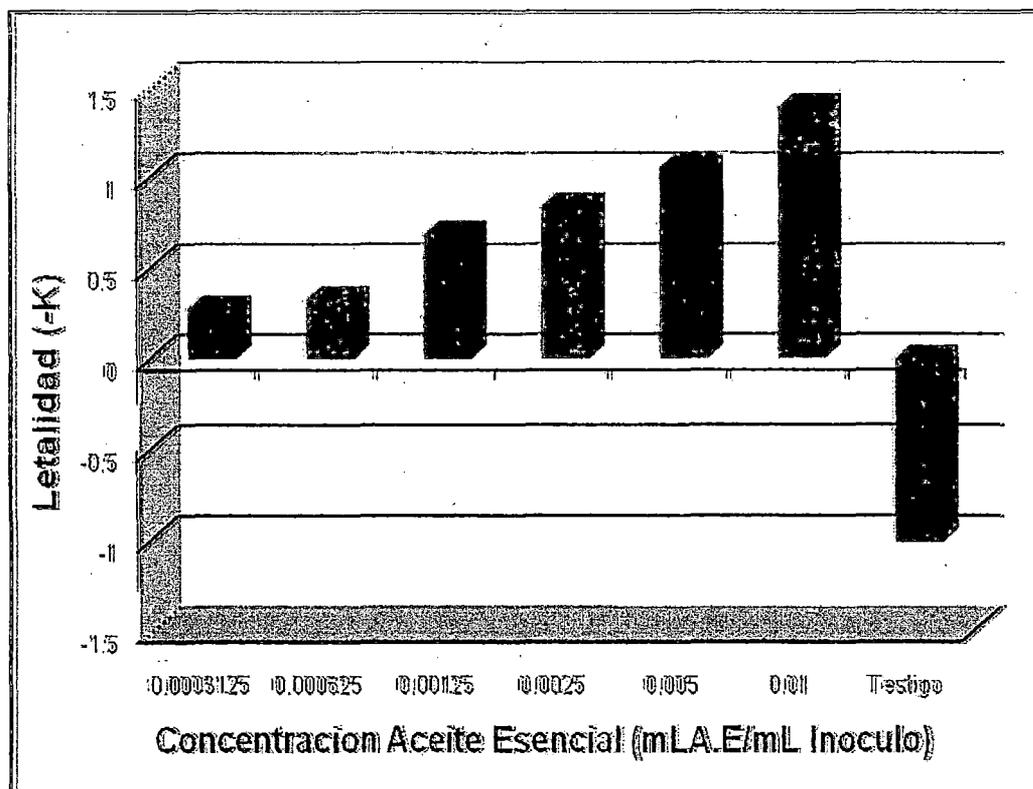


Tabla N° 4.5.1.3 Fase de Muerte o Declive: Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Enterococos faecalis*

| Concentracion de Aceite Esencial | Letalidad (-K) (Generaciones/Hora) |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 0.0003125 | 0.278003857 |
| 0.000625 | 0.330808673 |
| 0.00125 | 0.687846736 |
| 0.0025 | 0.841347497 |
| 0.005 | 1.052981999 |
| 0.01 | 1.380814778 |
| Testigo | -1.01097345 |

Grafica N° 4.5.1.3 Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre de *Enterococos faecalis*

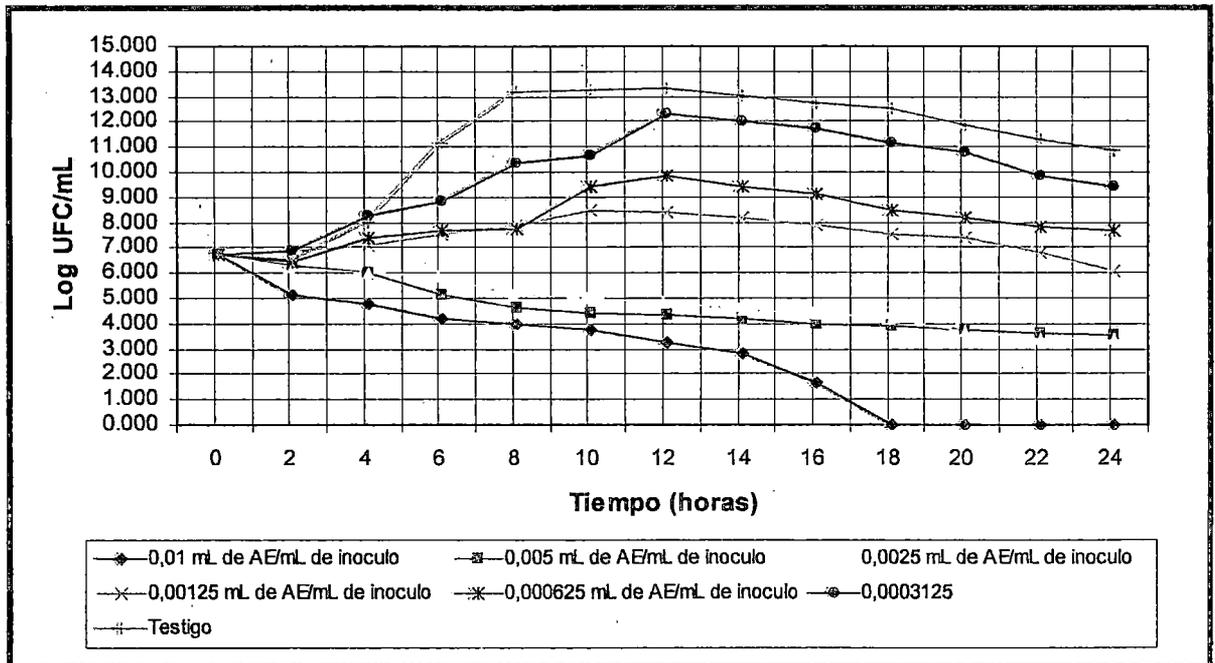


B. *Escherichia coli*

Tabla N° 4.5.1.4 Efecto del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

| Tiempo (Horas) | Log UFC/mL | | | | | | |
|----------------|------------|------------------------------------------------------------------------|-------|--------|---------|----------|-----------|
| | Testigo | Concentraciones experimentales en mL de aceite esencial / ml de inculo | | | | | |
| | | 0.01 | 0.005 | 0.0025 | 0.00125 | 0.000625 | 0.0003125 |
| 0 | 6.770 | 6.770 | 6.770 | 6.770 | 6.770 | 6.770 | 6.770 |
| 2 | 6.490 | 5.120 | 6.340 | 6.230 | 6.920 | 6.460 | 6.910 |
| 4 | 8.060 | 4.780 | 6.020 | 6.050 | 7.120 | 7.380 | 8.290 |
| 6 | 11.190 | 4.230 | 5.180 | 5.860 | 7.540 | 7.650 | 8.820 |
| 8 | 13.210 | 4.000 | 4.660 | 5.170 | 7.880 | 7.750 | 10.330 |
| 10 | 13.250 | 3.780 | 4.430 | 5.010 | 8.450 | 9.420 | 10.670 |
| 12 | 13.340 | 3.260 | 4.360 | 4.870 | 8.380 | 9.880 | 12.330 |
| 14 | 13.030 | 2.860 | 4.190 | 4.560 | 8.220 | 9.430 | 12.020 |
| 16 | 12.780 | 1.670 | 4.020 | 4.440 | 7.890 | 9.120 | 11.760 |
| 18 | 12.560 | 0.000 | 3.930 | 4.230 | 7.550 | 8.450 | 11.140 |
| 20 | 11.890 | 0.000 | 3.750 | 3.670 | 7.420 | 8.220 | 10.780 |
| 22 | 11.340 | 0.000 | 3.610 | 3.410 | 6.820 | 7.810 | 9.830 |
| 24 | 10.890 | 0.000 | 3.560 | 3.390 | 6.060 | 7.690 | 9.440 |

Grafica N° 4.5.1.4 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de aceite esencial de muña



Cuadro N° 4.5.1.3 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre la Velocidad de Crecimiento de Scherichia coli

| Analisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Suma de cuadrados | 14.7373693 | 0.0343136 | 14.7373693 | 0.0343136 |
| Grados de libertad | 5 | 12 | 5 | 12 |
| Promedio de los cuadrados | 2.94747386 | 0.00285947 | 2.94747386 | 0.00285947 |
| F | 1030.777467 | | 1030.777467 | |
| Valor crítico para F | 3.105875239 | | 5.064343111 | |
| Probabilidad | 2.29691E-15 | | 2.29691E-15 | |

Cuadro N° 4.5.1.4 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre el Tiempo Generacional de Scherichia coli

| Analisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Suma de cuadrados | 41.7429217 | 0.31313313 | 41.7429217 | 0.31313313 |
| Grados de libertad | 5 | 12 | 5 | 12 |
| Promedio de los cuadrados | 8.34858433 | 0.02609443 | 8.34858433 | 0.02609443 |
| F | 319.9374406 | | 319.9374406 | |
| Valor crítico para F | 3.105875239 | | 5.064343111 | |
| Probabilidad | 2.47433E-12 | | 2.47433E-12 | |

Tabla N° 4.5.1.5 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Escherichia coli

| Concentración Ac. Esencial | Tiempo Generacional (Tg) | Numero Generaciones (n) |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 0.01 | -0.946318238 | -16.94183328 |
| 0.005 | -2.207116568 | -11.02175476 |
| 0.0025 | -1.860824572 | -10.83049223 |
| 0.00125 | 1.797990455 | 5.580839199 |
| 0.000625 | 1.164883167 | 10.33119638 |
| 0.0003125 | 0.649914316 | 18.46992021 |
| Testigo | 0.373950305 | 21.39321693 |

Grafica N° 4.5.1.5 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Escherichia coli

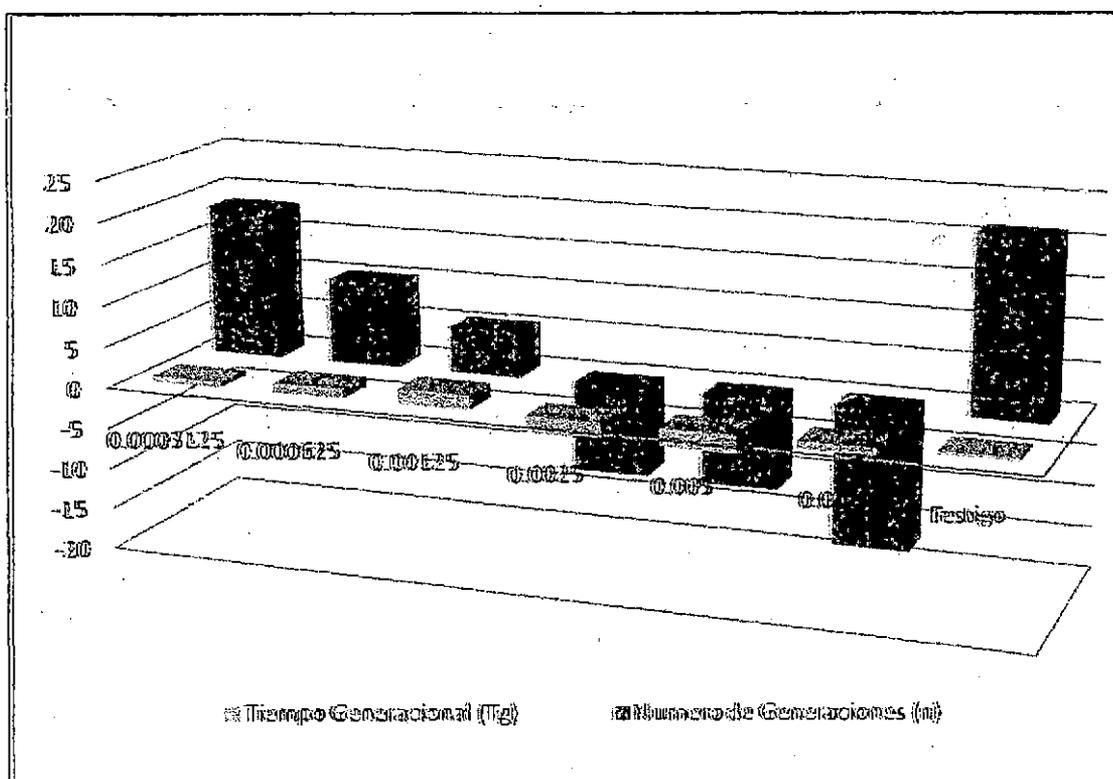
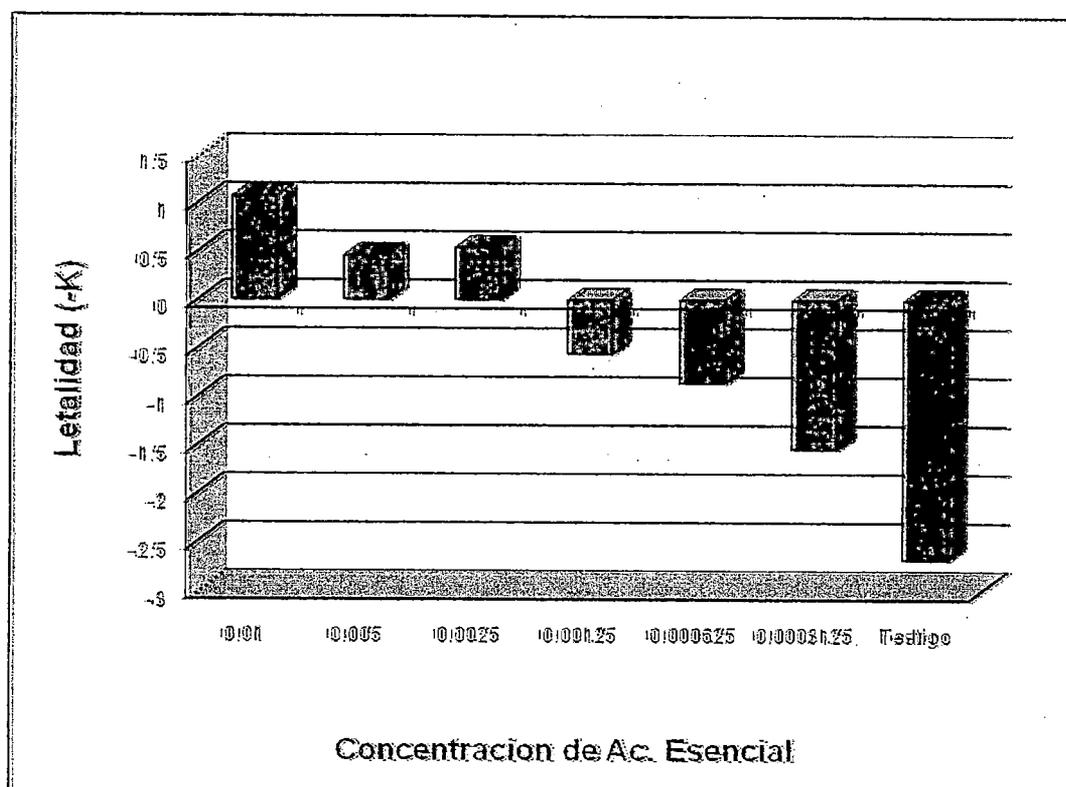


Tabla N° 4.5.1.6 Fase de Muerte o Declive: Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de Escherichia coli

| Concentración Ac. Esencial | Letalidad (-K) (Generaciones/Hora) |
|----------------------------|------------------------------------|
| 0.0003125 | -1.539160017 |
| 0.000625 | -0.860933031 |
| 0.00125 | -0.55808392 |
| 0.0025 | 0.541524612 |
| 0.005 | 0.459239782 |
| 0.01 | 1.05886458 |
| Testigo | -2.674152116 |

Grafica N° 4.5.1.6 Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre de Escherichia coli

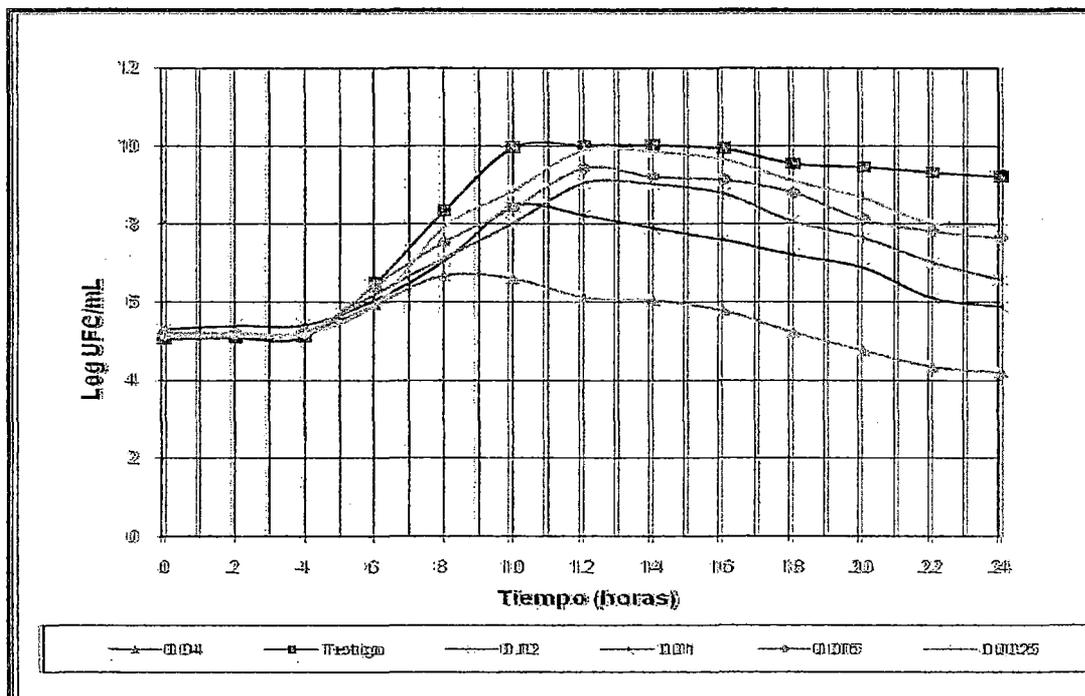


C. *Pseudomona aureuginosa*

Tabla N° 4.5.1.7 Efecto del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Pseudomona aureuginosa*

| Tiempo (horas) | Log UFC/mL | | | | | |
|----------------|------------|-------------------------------------------------------------------------|------|------|-------|--------|
| | Testigo | Concentraciones experimentales en mL de aceite esencial / ml de inoculo | | | | |
| | | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.005 | 0.0025 |
| 0 | 5.06 | 5.19 | 5.31 | 5.09 | 5.19 | 5.14 |
| 2 | 5.08 | 5.19 | 5.39 | 5.11 | 5.21 | 5.16 |
| 4 | 5.11 | 5.22 | 5.41 | 5.19 | 5.22 | 5.19 |
| 6 | 6.49 | 5.94 | 6.06 | 6.22 | 6.44 | 5.94 |
| 8 | 8.34 | 6.68 | 7.04 | 7.14 | 7.55 | 7.93 |
| 10 | 9.96 | 6.62 | 8.46 | 8.03 | 8.42 | 8.88 |
| 12 | 10.03 | 6.13 | 8.24 | 9.06 | 9.45 | 9.91 |
| 14 | 10.02 | 6.05 | 7.89 | 9.02 | 9.23 | 9.87 |
| 16 | 9.93 | 5.79 | 7.59 | 8.78 | 9.14 | 9.67 |
| 18 | 9.56 | 5.22 | 7.21 | 8.06 | 8.81 | 9.12 |
| 20 | 9.48 | 4.75 | 6.88 | 7.66 | 8.12 | 8.67 |
| 22 | 9.34 | 4.34 | 6.11 | 7.03 | 7.83 | 8.02 |
| 24 | 9.22 | 4.22 | 5.89 | 6.58 | 7.66 | 7.98 |

Grafica N° 4.5.1.7 Curva de crecimiento de *Pseudomona aureuginosa* a diferentes concentraciones de aceite esencial de muña



Cuadro N° 4.5.1.5 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre el Tiempo Generacional de Pseudomona Aureuginosa

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 1.425515587 | 0.031718201 | 1.425515587 | 0.031718201 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 0.356378897 | 0.00317182 | 0.356378897 | 0.00317182 |
| F | 112.357854 | | 112.357854 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 2.88E-08 | | 2.88E-08 | |

Cuadro N° 4.5.1.6 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre la Velocidad de Crecimiento de Pseudomona Aureuginosa

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 0.834762776 | 0.016824551 | 0.834762776 | 0.016824551 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 0.208690694 | 0.001682455 | 0.208690694 | 0.001682455 |
| F | 124.0393813 | | 124.0393813 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 1.78E-08 | | 1.78E-08 | |

Tabla N° 4.5.1.8 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Pseudomona aureuginosa

| Concentración Ac. Esencial | Numero Generaciones | Tiempo Generacional |
|----------------------------|---------------------|---------------------|
| 0.0025 | 15.84559701 | 0.757860233 |
| 0.05 | 14.15141368 | 0.84847496 |
| 0.1 | 13.18805454 | 0.911134731 |
| 0.2 | 10.4640735 | 0.956412822 |
| 0.4 | 4.949672861 | 1.62095268 |
| Testigo | 16.27744766 | 0.61434693 |

Grafica N° 4.5.1.8 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Pseudomona aureuginosa

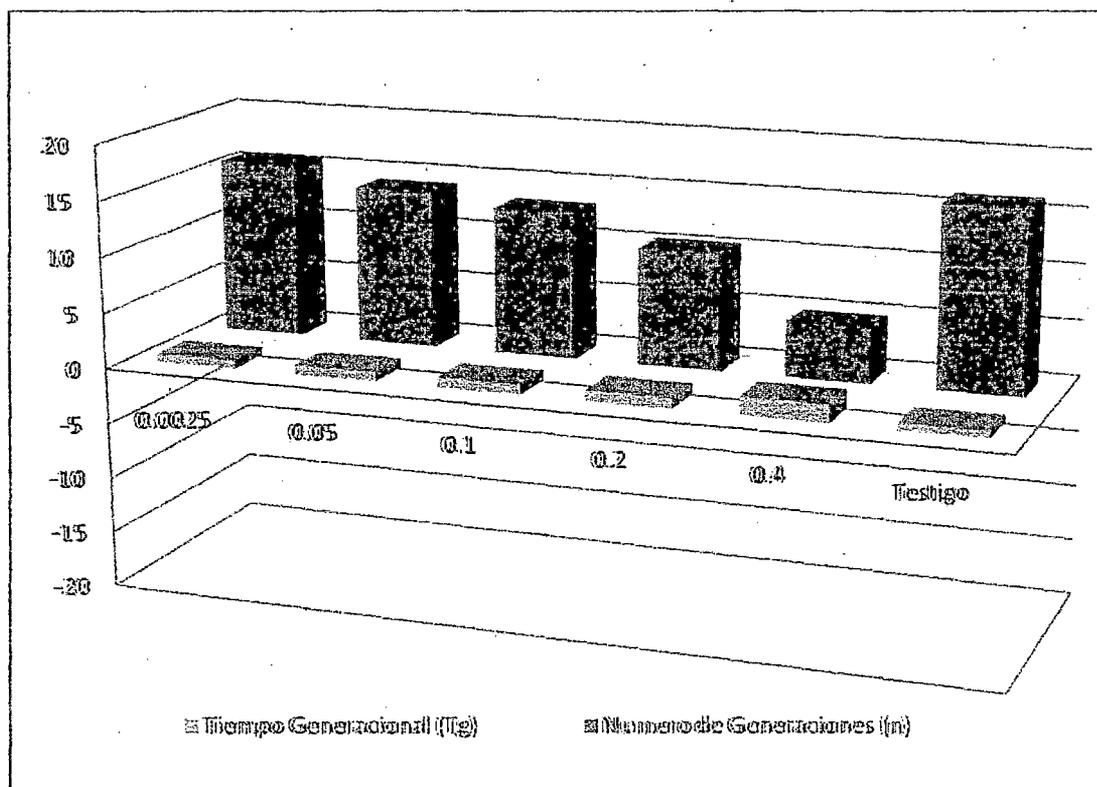
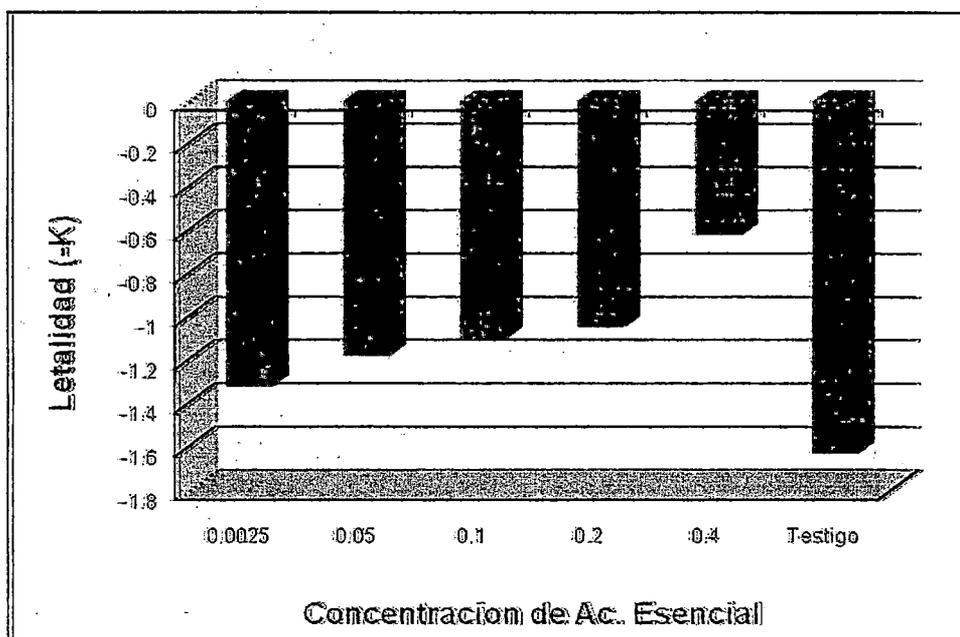


Tabla N° 4.5.1.9 Fase de Muerte o Declive: Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Pseudomona aureuginosa*

| Concentración Ac. Esencial (mL A.E / mL Inoculo) | Letalidad (-K) (Generaciones/Hora) |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 0.0025 | -1.320466418 |
| 0.005 | -1.179284474 |
| 0.01 | -1.099004545 |
| 0.02 | -1.04640735 |
| 0.04 | -0.618709108 |
| Testigo | -1.627744766 |

Grafica N° 4.5.1.9 Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre de *Pseudomona aureuginosa*

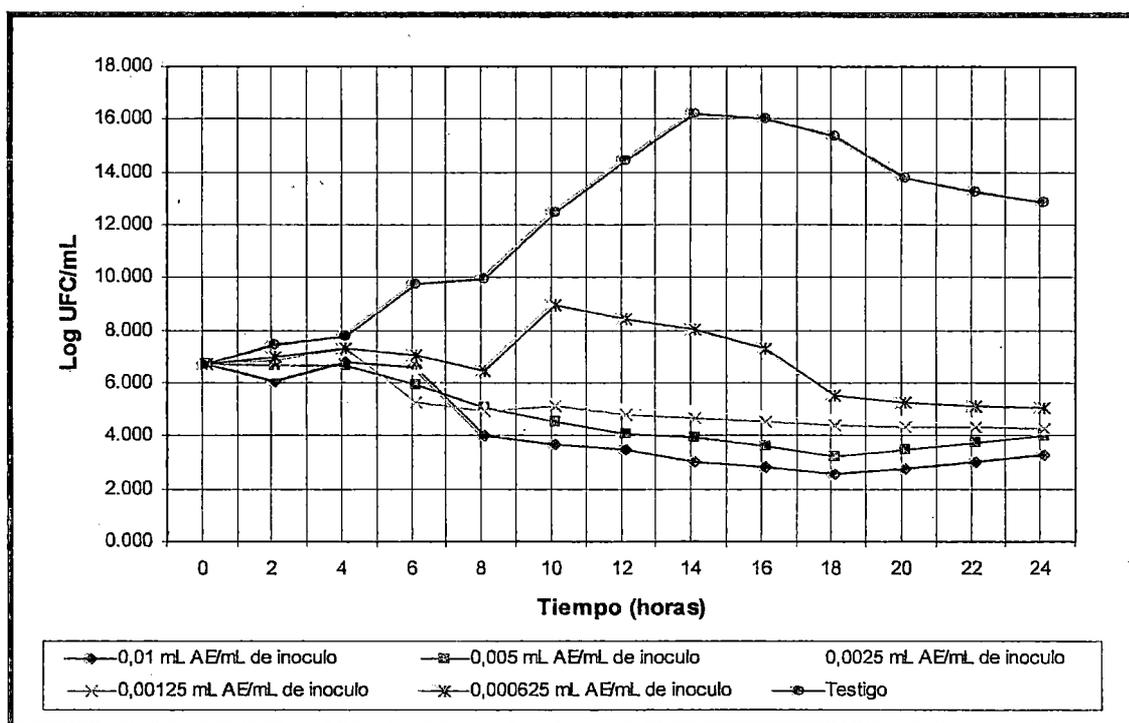


D. Staphylococcus aureus

Tabla N°4.5.1.10 Efecto del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus

| Tiempo (Horas) | Log UFC/mL | | | | | |
|----------------|------------|------------------------------------------------------------------------|-------|--------|---------|----------|
| | Testigo | Concentraciones experimentales en mL de aceite esencial / ml de inculo | | | | |
| | | 0.01 | 0.005 | 0.0025 | 0.00125 | 0.000625 |
| 0 | 6.720 | 6.720 | 6.720 | 6.720 | 6.720 | 6.720 |
| 2 | 7.460 | 6.079 | 6.633 | 6.380 | 6.826 | 7.013 |
| 4 | 7.813 | 6.819 | 6.690 | 7.719 | 7.348 | 7.350 |
| 6 | 9.782 | 6.612 | 5.903 | 6.543 | 5.301 | 7.025 |
| 8 | 9.946 | 4.000 | 5.073 | 5.161 | 4.977 | 6.457 |
| 10 | 12.478 | 3.724 | 4.549 | 5.236 | 5.121 | 8.984 |
| 12 | 14.426 | 3.511 | 4.068 | 5.016 | 4.784 | 8.426 |
| 14 | 16.234 | 3.021 | 3.964 | 4.934 | 4.658 | 8.067 |
| 16 | 16.026 | 2.848 | 3.616 | 4.745 | 4.554 | 7.350 |
| 18 | 15.343 | 2.552 | 3.211 | 4.632 | 4.402 | 5.539 |
| 20 | 13.812 | 2.782 | 3.476 | 4.572 | 4.362 | 5.256 |
| 22 | 13.268 | 3.017 | 3.728 | 4.464 | 4.338 | 5.121 |
| 24 | 12.830 | 3.278 | 4.004 | 4.318 | 4.312 | 5.076 |

Grafica N° 4.5.1.10 Curva de crecimiento de Staphylococcus aureus a diferentes concentraciones de aceite esencial de muña



Cuadro N° 4.5.1.7 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre el Tiempo Generacional de Staphylococcus aureus

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 31.90099458 | 0.728468973 | 31.90099458 | 0.728468973 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 7.975248646 | 0.072846897 | 7.975248646 | 0.072846897 |
| F | 109.4795926 | | 109.4795926 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 3.27E-08 | | 3.27E-08 | |

Cuadro N° 4.5.1.8 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre la Velocidad de Crecimiento de Staphylococcus aureus

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 7.575912322 | 0.109687438 | 7.575912322 | 0.109687438 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 1.893978081 | 0.010968744 | 1.893978081 | 0.010968744 |
| F | 172.6704647 | | 172.6704647 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 3.51E-09 | | 3.51E-09 | |

Tabla N° 4.5.1.11 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Staphylococcus aureus

| Concentracion Ac. Esencial | Numero Generaciones (n) | Tiempo Generacional (Tg) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0.000625 | 7.52084521 | 1.355071708 |
| 0.00125 | 2.08617084 | 2.004370535 |
| 0.0025 | 3.31860617 | 1.220015826 |
| 0.005 | -11.6566457 | -1.552302891 |
| 0.01 | -14.6493865 | -1.234686325 |
| Testigo | 31.6048239 | 0.44297035 |

Grafica N° 4.5.1.11 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Staphylococcus aureus

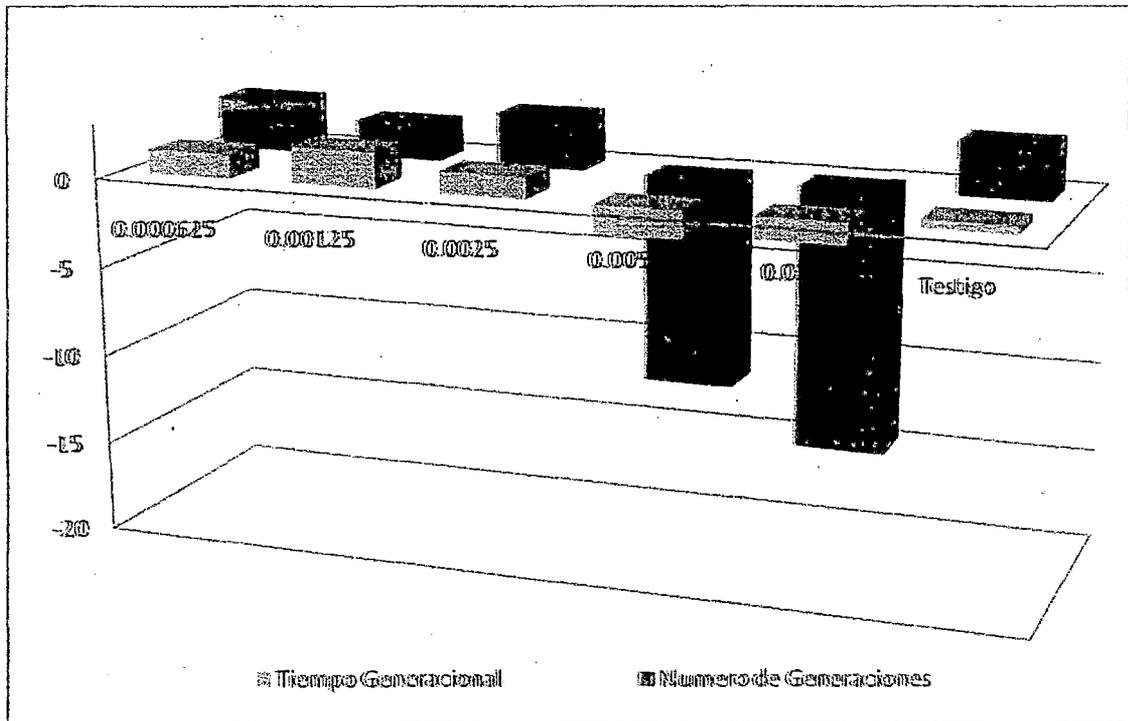
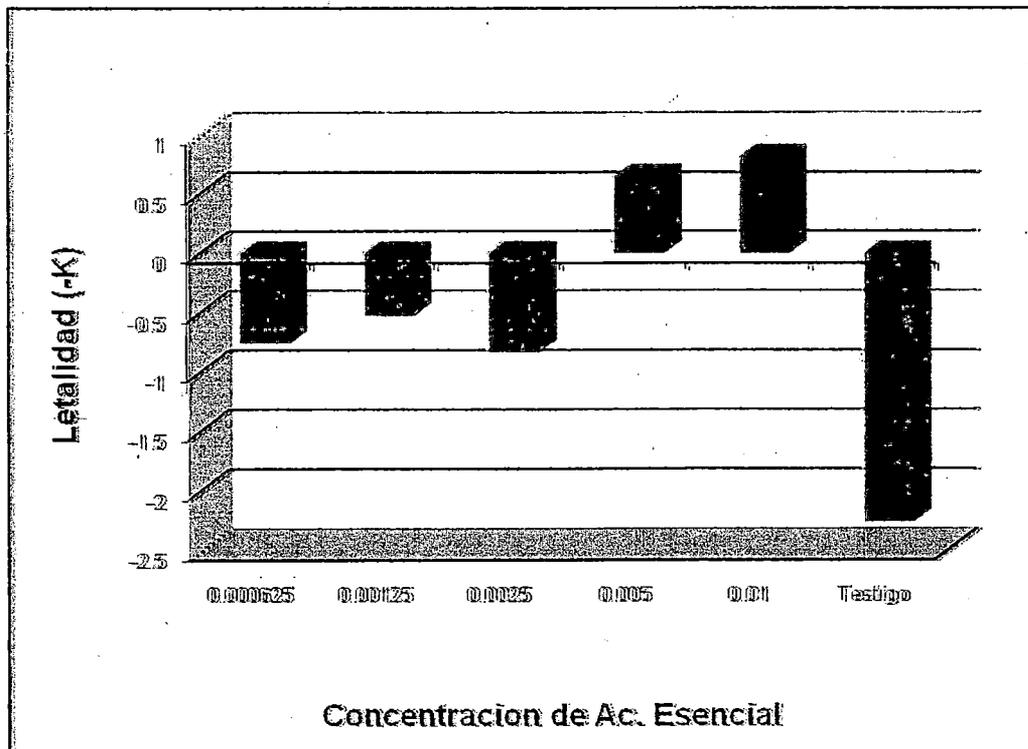


Tabla N° 4.5.1.12 Fase de Muerte o Declive: Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

| Concentración Ac. Esencial (mL A.E / mL Inoculo) | Letalidad (-K) (Generaciones/Hora) |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 0.000625 | -0.75208452 |
| 0.00125 | -0.52154271 |
| 0.0025 | -0.82965154 |
| 0.005 | 0.64759143 |
| 0.01 | 0.81385481 |
| Testigo | -2.257487421 |

Grafica N° 4.5.1.12 Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre de *Staphylococcus aureus*

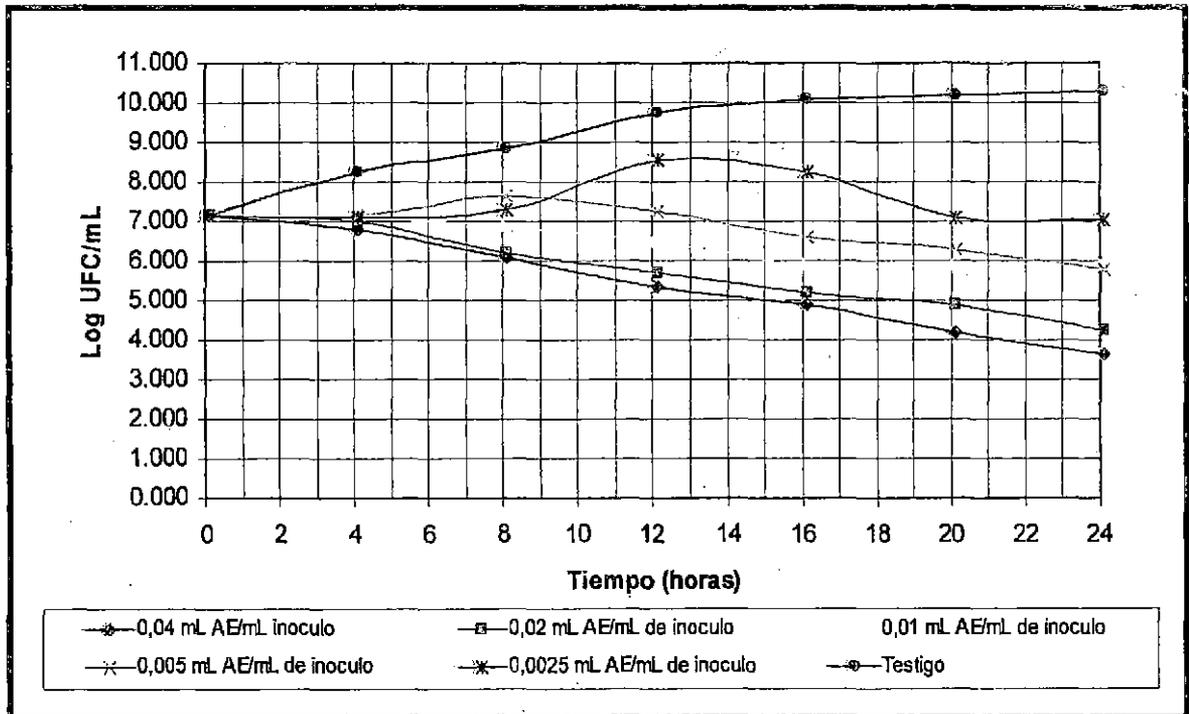


E. Streptococos mutans

Tabla N° 4.5.1.13 Efecto del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de Streptococos mutans

| Tiempo (Horas) | Log UFC/mL | | | | | |
|----------------|------------|------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | Testigo | Concentraciones experimentales en mL de aceite esencial / ml de inculo | | | | |
| | | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.005 | 0.0025 |
| 0 | 7.156 | 7.156 | 7.156 | 7.156 | 7.156 | 7.156 |
| 4 | 8.249 | 6.785 | 7.023 | 7.078 | 7.158 | 7.083 |
| 8 | 8.853 | 6.112 | 6.223 | 6.887 | 7.630 | 7.320 |
| 12 | 9.740 | 5.332 | 5.694 | 6.521 | 7.231 | 8.540 |
| 16 | 10.120 | 4.897 | 5.214 | 5.923 | 6.584 | 8.230 |
| 20 | 10.210 | 4.201 | 4.896 | 5.912 | 6.313 | 7.120 |
| 24 | 10.307 | 3.645 | 4.275 | 5.889 | 5.807 | 7.041 |

Grafica N° 4.5.1.13 Curva de crecimiento de Streptococos mutans a diferentes concentraciones de aceite esencial de muña



Cuadro N° 4.5.1.9 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre la Velocidad de Crecimiento de *Streptococcus mutans*

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 1.841 | 0.1174336 | 1.841 | 0.1174336 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 0.46026528 | 0.01174336 | 0.46026528 | 0.01174336 |
| F | 39.19366187 | | 39.19366187 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 4.42E-06 | | 4.42E-06 | |

Cuadro N° 4.5.1.10 Anova para el efecto del Aceite esencial de muña sobre el Tiempo Generacional de *Streptococcus mutans*

| Análisis de Varianza | $\alpha = 0.05$ | | $\alpha = 0.01$ | |
|----------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| | Entre grupos | Dentro de los grupos | Entre grupos | Dentro de los grupos |
| Origen de las variaciones | | | | |
| Suma de cuadrados | 332.6209815 | 106.5010019 | 332.6209815 | 106.5010019 |
| Grados de libertad | 4 | 10 | 4 | 10 |
| Promedio de los cuadrados | 83.15524536 | 10.65010019 | 83.15524536 | 10.65010019 |
| F | 7.807930809 | | 7.807930809 | |
| Valor crítico para F | 3.478049691 | | 5.994338662 | |
| Probabilidad | 4.02E-03 | | 4.02E-03 | |

Tabla N° 4.5.1.14 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Streptococcus mutans

| Concentracion Ac. Esencial | Numero Generaciones (n) | Tiempo Generacional (Tg) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0.0025 | 4.597548483 | 2.612989591 |
| 0.005 | 1.574593917 | 6.061356252 |
| 0.01 | -3.011881473 | -7.711700821 |
| 0.02 | -1.737368394 | -2.542423 |
| 0.04 | -12.39079179 | -1.974337817 |
| Testigo | 9.846194873 | 1.624993229 |

Grafica N° 4.5.1.14 Efecto del aceite esencial de muña sobre los Parámetros de Crecimiento de Streptococcus mutans

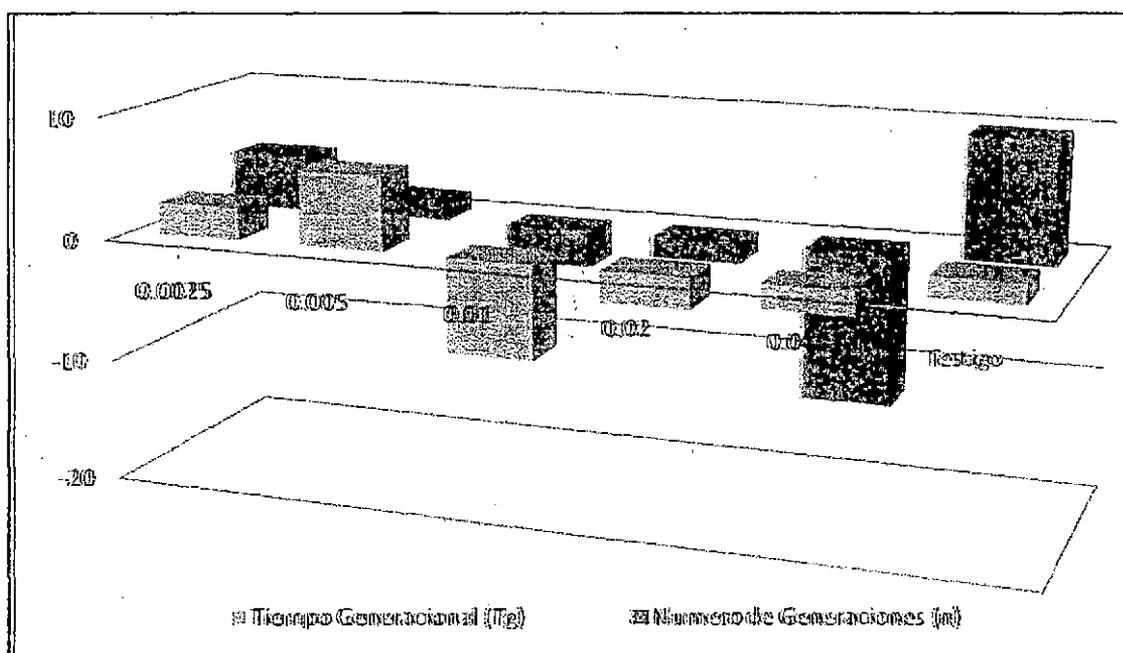
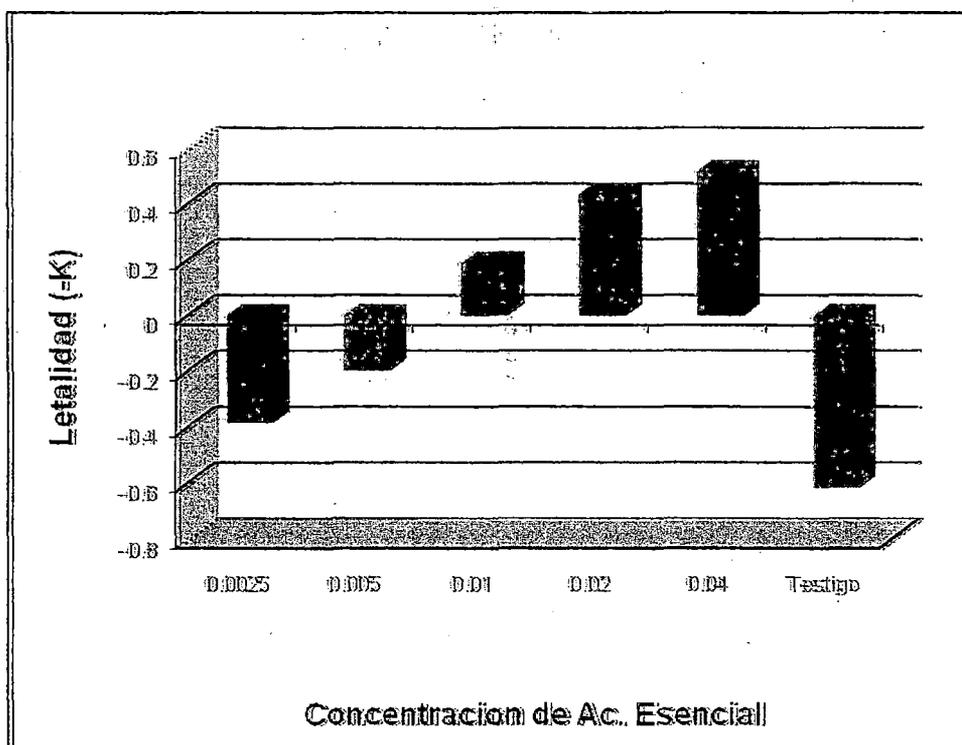


Tabla N° 4.5.1.15 Fase de Muerte o Declive: Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*

| Concentración Ac. Esencial (mL A.E / mL Inoculo) | Letalidad (-K) (Generaciones/Hora) |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 0.0025 | -0.38312904 |
| 0.005 | -0.19682424 |
| 0.01 | 0.18824259 |
| 0.02 | 0.4343421 |
| 0.04 | 0.51628299 |
| Testigo | -0.61538718 |

Grafica N° 4.5.1.15 Letalidad (-K) del aceite esencial de muña sobre de *Streptococcus mutans*



4.5.2. Prueba de sensibilidad

A. Enterococos faecalis

Tabla N° 4.5.2.1 Ensayo comparativo entre el CMI para Enterococos faecalis y un antimicrobiano de uso comercial (Gentamicina 10 µg)

| Halo de Inhibición (Lectura en mm) | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| | 0,00125 mL AE/mL solución (CMI) | Gentamicina (10 µg) | |
| Lectura 1 | 12 | 22 | 54.5 % |
| Lectura 2 | 12 | 22 | 54.5 % |
| Lectura 3 | 12 | 22 | 54.5 % |
| Lectura 4 | 12 | 19 | 63.2 % |
| Lectura 5 | 13 | 20 | 65.0 % |
| Lectura 6 | 12 | 19 | 63.2 % |

Tabla N° 4.5.2.2 Ensayo comparativo entre el CMI para Enterococos faecalis y un antimicrobiano de uso comercial (Cefotaxime 30 µg)

| Halo de Inhibición (Lectura en mm) | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| | 0,00125 mL AE/mL solución (CMI) | Cefotaxime (30 µg) | |
| Lectura 1 | 12 | 27 | 44.4 % |
| Lectura 2 | 15 | 28 | 53.6 % |
| Lectura 3 | 14 | 27 | 51.9 % |
| Lectura 4 | 14 | 27 | 51.9 % |
| Lectura 5 | 12 | 27 | 44.4 % |
| Lectura 6 | 12 | 27 | 44.4 % |

B. Escherichia coli

Tabla N° 4.5.2.3 Ensayo comparativo entre el CMI para Escherichia coli y un antimicrobiano de uso comercial (Gentamicina 10 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| | 0,0025 mL AE/mL solución (CMI) | Gentamicina (10 µg) | |
| Lectura 1 | 9 | 18 | 50.00% |
| Lectura 2 | 11 | 16 | 68.75% |
| Lectura 3 | 8 | 15 | 53.33% |
| Lectura 4 | 8 | 17 | 47.06% |
| Lectura 5 | 9 | 16 | 56.25% |

Tabla N° 4.5.2.4 Ensayo comparativo entre el CMI para E. coli y un antimicrobiano de uso comercial (Cefotaxime 30 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| | 0,0025 mL AE/mL solución (CMI) | Cefotaxime (30 µg) | |
| Lectura 1 | 14 | 29 | 48.28% |
| Lectura 2 | 13 | 30 | 43.33% |
| Lectura 3 | 13 | 30 | 43.33% |
| Lectura 4 | 14 | 30 | 46.67% |
| Lectura 5 | 13 | 30 | 43.33% |
| Lectura 6 | 15 | 30 | 50.00% |

C. *Pseudomona aureuginosa*

Tabla N° 4.5.2.5 Ensayo comparativo entre la concentración de aceite esencial mas alta empleada para *Pseudomona aureuginosa* y un antimicrobiano de uso comercial (Cefotaxime 30 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|---------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| | 0,04 mL AE/mL solucion | Cefotaxime (30 µg) | |
| Lectura 1 | 13 | 21 | 61.90% |
| Lectura 2 | 13 | 21 | 61.90% |
| Lectura 3 | 13 | 21 | 61.90% |
| Lectura 4 | 13 | 23 | 56.52% |
| Lectura 5 | 13 | 22 | 59.09% |
| Lectura 6 | 14 | 23 | 60.87% |

Tabla N° 4.5.2.6 Ensayo comparativo entre la concentración de aceite esencial mas alta empleada para *Pseudomona aureuginosa* y un antimicrobiano de uso comercial (Ciprofloxacina 5 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------------------|
| | 0,04 mL AE/mL solución | Ciprofloxacina (5 µg) | |
| Lectura 1 | 12 | 41 | 29.27% |
| Lectura 2 | 13 | 39 | 33.33% |
| Lectura 3 | 13 | 40 | 32.50% |
| Lectura 4 | 12 | 41 | 29.27% |
| Lectura 5 | 13 | 40 | 32.50% |
| Lectura 6 | 13 | 40 | 32.50% |

D. Staphylococcus aureus

Tabla N° 4.5.2.7 Ensayo comparativo entre el CMI para Staphylococcus aureus y un antimicrobiano de uso comercial (Cefotaxime 30 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| | 0,01 mL AE/mL solución (CMI) | Cefotaxime (30 µg) | |
| Lectura 1 | 21 | 28 | 75.00% |
| Lectura 2 | 21 | 28 | 75.00% |
| Lectura 3 | 21 | 29 | 72.41% |
| Lectura 4 | 23 | 30 | 76.67% |
| Lectura 5 | 23 | 30 | 76.67% |
| Lectura 6 | 21 | 31 | 67.74% |

Tabla N° 4.5.2.8 Ensayo comparativo entre el CMI para Staphylococcus aureus y un antimicrobiano de uso comercial (Gentamicina 10 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiótico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| | 0,01 mL AE/mL solución (CMI) | Gentamicina 10 µg | |
| Lectura 1 | 24 | 37 | 64.86% |
| Lectura 2 | 25 | 39 | 64.10% |
| Lectura 3 | 22 | 37 | 59.46% |
| Lectura 4 | 25 | 35 | 71.43% |
| Lectura 5 | 25 | 37 | 67.57% |
| Lectura 6 | 24 | 37 | 64.86% |

E. Streptococos mutans

Tabla N° 4.5.2.9 Ensayo comparativo entre el CMI para Streptococos mutans y un antimicrobiano de uso comercial (Estreptomina 10 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | Antibiotico | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | 0,02 mL AE/mL solución (CMI) | Estreptomina (10 µg) | |
| Lectura 1 | 22 | 30 | 73.33% |
| Lectura 2 | 19 | 28 | 67.86% |
| Lectura 3 | 21 | 29 | 72.41% |
| Lectura 4 | 22 | 33 | 66.67% |
| Lectura 5 | 22 | 32 | 68.75% |
| Lectura 6 | 20 | 31 | 64.52% |

Tabla N° 4.5.2.10 Ensayo comparativo entre el CMI para Streptococos mutans y un antimicrobiano de uso comercial (Vancomicina 30 µg)

| Lectura en mm | Antimicrobiano | | % Porcentaje de efecto inhibitorio |
|---------------|------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| | 0,02 mL AE/mL solución (CMI) | Vancomicina 30 µg | |
| Lectura 1 | 21 | 30 | 70.00% |
| Lectura 2 | 21 | 30 | 70.00% |
| Lectura 3 | 22 | 29 | 75.86% |
| Lectura 4 | 20 | 31 | 64.52% |
| Lectura 5 | 21 | 32 | 65.63% |
| Lectura 6 | 20 | 32 | 62.50% |

V.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Las características Físicas del aceite esencial de muña presenta son: color amarillento cristalino con un intenso olor similar al mentol, de sabor picante, Densidad relativa es de 0.9398, Índice de refracción de 1.4757, lo que nos hace deducir, de forma preliminar, que este aceite esencial podría contener compuestos aromáticos o alicíclicos, dado que su densidad e índice de refracción son superiores a valores de 0.9 y 1.47, respectivamente. Su rotación específica dio valores en promedio de $2^{\circ}45'$. Presento solubilidad a concentraciones de etanol al 85%, 90% y 95%, siendo medianamente soluble a concentración de 80% e insoluble a concentraciones por debajo de 80%. En el ensayo de residuo por evaporación se determino un 83.5% de residuo con respecto a la masa inicial. La extracción del aceite esencial dio un Rendimiento promedio de 1.062 %. Estas propiedades pueden ser usadas para establecer parámetros de control de calidad en la extracción a escala industrial.
2. El contenido fenólico del aceite esencial presentó valores relativos de 64. El índice de Ester promedio fue de 26.6151 y el Índice de Acidez promedio fue de 2.2 En la evaluación del aceite esencial de muna por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas arroja como elementos mayoritarios a la Pulegona con un porcentaje de 29.21%, P-Mentona con un porcentaje de 24.13%, el Oxido de Piperitona con un porcentaje de 11.97%, también se encuentran presentes compuestos como DL-Limoneno, Linalool, Isopulegona, Biciclogermacreno, Espatulenol todos estos con porcentajes entre 1 y 2,2 %, y otros compuestos en menor porcentaje. De acuerdo a estos resultados se puede afirmar la presencia de

compuestos oxigenados (cetónicos, aldehídicos, y alcoholes), siendo estos los portadores del olor característico del aceite esencial de muña. Se puede decir que estos compuestos químicos son los responsables de las propiedades que se le atribuyen a esta planta.

3. Se determino que el aceite esencial de muña tiene propiedades antibacterianas.

En la tabla 4.5.1.1 se muestran las concentraciones empleadas para *Enterococcus faecalis*, de la cual se obtiene la grafica N° 4.5.1.1 de la que se analizan las curvas de crecimiento y se puede determinar que a medida que aumenta la concentración del aceite esencial en el inóculo disminuye considerablemente la población inicial de este, inclusive sin evidenciarse las demás fases del crecimiento bacteriano, observándose solo de esta forma una sola fase definida que corresponde a la fase de declive o muerte.

Según el análisis de varianza tanto para la velocidad de muerte ($-r$) y para el tiempo generacional (T_g), para las diferentes concentraciones de aceite esencial de muña existe influencia significativa sobre el normal crecimiento de *Enterococcus faecalis*, lo que se resume en el cuadro 4.5.1.1 y 4.5.1.2, en donde se muestra que para límites de confiabilidad de 95 y 99%, se tiene que los resultados son estadísticamente significativos.

De la Tabla N° 4.5.1.2 se puede observar que el Tiempo Generacional es inversamente proporcional a la concentración del aceite esencial presente en el inóculo, ya que a medida que se incrementa la concentración de este se necesita menos tiempo para inhibir una generación de microorganismo presente en el inóculo.

De la tabla 4.5.1.3 y la Grafica 4.5.1.3 se puede observar que la letalidad del aceite esencial aumenta proporcionalmente al aumento de la concentración empleada.

En el grafico N° 4.5.1.4 se observa claramente el efecto del aceite esencial de muña sobre los parámetros de crecimiento de **Escherichia coli**. A lo cual podemos deducir tempranamente que este microorganismo debido a su naturaleza patógena tiende a resistir en cierta magnitud al inhibidor, ya que a diferencia del *Enterococcus faecalis* en las curvas de concentraciones más bajas empleadas se diferencia las 4 fases del crecimiento microbiano.

Según los cuadros 4.5.1.3 y 4.5.1.4, se determinó que los resultados de las evaluaciones son estadísticamente significativos al 95% y 99% de confiabilidad.

De la tabla N° 4.5.1.5 se muestra la relación inversamente proporcional que se mantiene entre el Tiempo Generacional y la concentración del aceite esencial presente en el inóculo, y se refleja el aumento de la pérdida del número de generaciones a medida que se incrementa la concentración de aceite esencial de muña. se necesita mucho más tiempo para inhibir una generación y de esta forma disminuye de forma considerable el efecto inhibidor del aceite esencial y el microorganismo supera las condiciones desfavorables de su medio de cultivo, esto se ilustra en la grafica 4.5.1.5.

Se determino el valor de la Letalidad (-K) del aceite esencial de Muña para la cepa de *Escherichia coli*, de la tabla 4.5.1.6 y la Grafica 4.5.1.6 se puede observar que la letalidad del aceite esencial aumenta proporcionalmente a la concentración empleada.

En este caso para la según la grafica 4.5.1.7, podemos apreciar que la **Pseudomona aeruginosa** tiende a ofrecer más resistencia que los otros microorganismos, el efecto inhibitor se manifiesta de esta manera diferenciando en las curvas las 4 fases de crecimiento, para todas las concentraciones de aceite esencial empleadas.

Por otro lado a pesar de la resistencia mostrada en la grafica, se realizo la evaluación estadística al tratamiento tanto para la velocidad de crecimiento (r) y para el tiempo generacional (T_g) según el análisis de varianza, como se muestra en los cuadros 4.5.1.5 y 4.5.1.6 de lo que se observa resultados confiables y significativos estadísticamente para un nivel de confiabilidad de 95% y 99%.

De la grafica 4.5.1.8 observamos que se hace dificultoso la eliminación de células viables para nuestro inhibidor en estudio, lo que se manifiesta para todas las concentración empleadas ya que a diferencia de las bacterias anteriores, no está eliminando células viable si no que está retrasando su crecimiento y así progresivamente va disminuyendo su actividad conforme disminuye la concentración empleada.

Al determinar la letalidad del aceite esencial de muña empleado para la cepa de **Pseudomona aureuginosa** se confirma lo anteriormente dicho con respecto a su actividad, ya que esta disminuye al disminuir la concentración.

Se observa en la grafica N° 4.5.1.10 que en la cepa **Staphylococcus aureus** para concentraciones mayores a 0.0025 mL A.E/mL Inoculo no se observan la fase logarítmica ni la fase de latencia solo se diferencia la fase de declive o muerte, a diferencia cuando se emplea concentraciones menores a 0.0025 mL

A.E/mL Inoculo, en cuyo caso se puede diferenciar las fases de crecimiento, lo que evidencia que a medida que disminuye la concentración del aceite esencial el efecto de este disminuye sobre este microorganismo.

Asimismo se realizó la evaluación estadística para los datos de velocidad de crecimiento y tiempo generacional, como se puede apreciar en los cuadros 4.5.1.7 y 4.5.1.8, determinándose que el ensayo es estadísticamente significativo para altos niveles de confiabilidad (99% y 95%), es decir que en el tratamiento las diferentes concentraciones empleadas ejercen un marcado efecto sobre los parámetros de crecimiento.

De esta forma se muestra en la grafica 4.5.1.11 que para las concentraciones evaluadas existe muerte de células viables proporcionalmente al tiempo generacional para concentraciones por encima de 0.0025 mL A.E/mL Inoculo.

De la misma forma se observa en la tabla 4.5.1.12 y grafica 4.5.1.12 que la letalidad disminuye con la disminución de la concentración del inhibidor.

De la grafica 4.5.1.13 se aprecia que para la cepa **Streptococcus mutans** se consigue un efecto inhibitor del crecimiento de esta bacteria.

En los cuadros 4.5.1.9 y 4.5.1.10 se observan, como en los casos anteriores que la evaluación a las concentraciones estudiadas son estadísticamente significativos a un alto nivel de confiabilidad.

En la grafica 4.5.1.14 se observa claramente la relación directa del número de generaciones con respecto a la concentración empleada, y la relación inversa entre el Tiempo Generacional y las concentraciones empleadas.

En el caso de la letalidad, esta disminuye a medida que disminuye la concentración empleada de aceite esencial en estudio (tabla 4.5.1.15 y grafica 4.5.1.15).

4. Se determino la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para las cepas en estudio, en el caso de **Enterococcus faecalis** fue de 0.00125 mL A.E/mL Inoculo, para **Escherichi coli** fue de 0.0025 mL A.E/mL Inoculo, para **Staphylococcus aureus** fue de 0.01 mL A.E/mL Inoculo y para **Streptococcus mutans** fue de 0.02 mL A.E/mL Inoculo. En el caso **Pseudomona aeuroginosa** no se pudo determinar CMI dado que la mayor concentración empleada no fue suficiente para eliminar el 99.9% de la población inoculada inicialmente.

5. Por otro lado al realizarse una comparación del CMI de cada bacteria evaluada con dos antibióticos de uso comercial se observó que la acción antibacteriana del aceite esencial es comparable con este hasta cierto porcentaje de acción, lo que indica que si bien es cierto la concentración del aceite no se puede alterar se puede partir de esa concentración y evaluar el numero de dosis adicionales necesarias para igualar su efectividad (Tablas 4.5.2.1 hasta 4.5.2.20).

VI. CONCLUSIONES.

1. Mediante esta investigación se ha demostrado que existe una marcada actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña (*Mintostachys setosa*) sobre bacterias comúnmente encontradas en alimentos, medio ambiente e incluso en el cuerpo del ser humano como responsables de infecciones.

Se concluye que el uso del aceite esencial de muña puede ser destinado a su empleo como antibacteriano para las bacterias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Scherichia coli* y *Streptococcus mutans* en las concentraciones encontradas (CMI). Para el caso de *Pseudomona aureuginosa* se puede partir de la concentración mas alta empleada, dado que la actividad del aceite esencial fue ligeramente inferior en comparación a las cepas anteriores, además se debe tener en cuenta que esta es una cepa que presenta una inmunidad alta.

Es decir que el tratamiento es efectivo y por ende el efecto de inhibición del crecimiento (en algunos casos el efecto letal), y la modificación del comportamiento de sus parámetros de crecimiento, se debe a los diferentes principios activos presentes en el aceite esencial de muña.

2. De acuerdo al ensayo GC-MS algunos de los componentes son comunes a algunas especies dentro del mismo género, pero no son idénticos en su totalidad y permite entender mejor la influencia de las condiciones climáticas de la zona y de diversos factores como el tiempo de recolección, el tratamiento previo a la extracción y el almacenamiento del aceite esencial en la composición química de este y su actividad.

VII.RECOMENDACIONES.

1. Dada la versatilidad de aplicaciones del aceite esencial de muña, que queda demostrado en su acción antibacteriana, se puede deducir que su empleo no solo se puede derivar al campo de la medicina alternativa como una opción al uso de antibióticos de síntesis química (como preparados especiales) si no también en la elaboración de artículos de limpieza y/o de uso personal, tales como: desinfectantes, perfumadores ambientales, aromatizadores en spray, jabones (para uso personal o líquidos para uso en plantas industriales donde la manipulación de alimentos sea parte del proceso productivo), detergentes, lociones, cremas, pastas dentales, colutorios bucales, etc.
2. Se recomienda continuar con la búsqueda de CMI para la cepa *Pseudomona aureoginosa*, ya sea evaluando diferentes concentraciones o buscando nuevas alternativas de inhibición, dado que es una cepa muy resistente y de importancia en la salud pública.
3. Se recomienda la continuidad de la investigación realizada utilizando los datos obtenidos para la inclusión del aceite esencial de muña en productos de uso comercial y darle mayor valor agregado a esta planta tan versátil.
4. Se recomienda realizar pruebas de toxicidad, para las Concentraciones Mínimas Inhibitorias encontradas, para la validación de su uso.

VIII.FUENTES DE INFORMACION CONSULTADAS.

1. ALCALDE PÉREZ, José Carlos; DÍAZ ÁLVAREZ, Lázara Mayra; GORGOY MEDINA, Caridad; ORIOLO PÉREZ, Leonardo; QUINTERO PÉREZ, William. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA "IN VITRO" DE LAS PLANTAS MEDICINALES CUBANAS: CYMBOPOGON CITRATUS Y OCIMUN BASILICUM". Boletín de Medicina General Integral. 2005; 9(3)
2. ANCHANTE GONGORA, Rosa Maria Luz. "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL AEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 1998.
3. ARNING, Ingrid; LIZARRAGA TRAVAGLINI, Alfonso. "MANEJO ECOLOGICO DE PLAGAS. UNA PROPUESTA PARA LA AGRICULTURA SOSTENIBLE". Red de Acción en Alternativa al uso de Agroquímicos. Lima Peru. 1999.
4. ARNING, Ingrid; VELASQUEZ, Héctor. "PLANTAS CON POTENCIAL BIOCIDIA. METODOLOGIA Y EXPERIENCIAS PARA SU DESARROLLO". Red de Accion en Alternativa al uso de Agroquímicos. Lima Peru. 2000.
5. BANCHIO, E.; ZYGADLO, J.; VALLADARES, G.R. "EFFECTS OF MECHANICAL WOUNDING ON ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND EMISION OF VOLATILES FROM *Minthostachys mollis*". Journal Chemical Ecology. 2005: 31(4).
6. BANCHIO, E.; ZYGADLO, J.; VALLADARES, G.R. "QUANTITATIVE VARIATIONS IN THE ESSENTIAL OIL OF *Minthostachys mollis* (KUNTH) GRISEB IN RESPONSE TO INSECTS WITH DIFFERENTS FEEDING HABITS". Journal Agricultural Food Chemical. 2005: 53(17).
7. BARREIRA CAVALCANTI, Eveline Solon; MAIA DE MORAIS, Selene; ASHLEY A LIMA, Michele; PINHO SANTANA, Eddie William. "LARVICIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM BRAZILIAN PLANTS AGAINST *Aedes Aegypti* L". Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(5): 541-544, August 2004.
8. BEUCHAT, L.R. "SENSITIVITY OF *Vibrio parahaemolyticus* TO SPICES AND ORGANIC ACIDS". Journal of Food Science. 1976; 41.

9. BONILLA RIVERA, Pablo; LOCK DE UGAZ, Olga; JURUPE CHICO, Hilda. "CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMICO BIOLOGICO DE LA *Werneria dactilophyla*". Boletín de la Sociedad Química del Perú. Vol. LVII N° 3. Septiembre 1991.
10. BRACK EGG, Antonio. "DICCIONARIO ENCICLOPEDICO DE PLANTAS UTILES DEL PERU". Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. PNUD. Junio 1999.
11. BRAVERMAN, J. "INTRODUCCION A LA BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS". Editorial El Manual Moderno. Segunda Edicion. 1990.
12. BRUNHILDE BROSS. "SUSTANCIAS AROMATICAS: SU EMPLEO EN COSMETICA NATURAL". Ediciones Omega S.A. Barcelona. 1994.
13. CAIRO ARELLANO, Melva; ATANACIO QUIROZ, Maria. "COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Senecio nivalis* (HBK) Cuatrecasas "Huila Huila". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1998.
14. CANO, Carlos; BONILLA, Pablo; ROQUE, Mirtha; RUIZ, Julio. "ACTIVIDAD ANTIMICOTICA IN VITRO Y METABOLITOS DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Minthostachys mollis* (MUÑA)". Rev. Peru Med Exp Salud Publica. 25(3) 298-301. 2008.
15. CANTON, Emilia; PEMAN, Javier. "CURVAS DE LETALIDAD EN ANTIFUNGICOS". Revista Iberoamericana de Micologia. 16: 82-85. 1999.
16. CAMPILLO VENDRELL, Ma. Sales. "MINTHOSTACHYS SPP: ESTUDIO BÁSICO DE LA PLANTA Y SU CULTIVO". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 2003.
17. CAMPODONICO REATEGUI, Lorena. "EXTRACCION DE CAEITE ESENCIAL DE HUACATAY (*Tapetes minuta*)". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO. 1996.
18. CENTURION VARGAS, Hugo Vidal. "PROMOCION DEL DESARROLLO AGRARIO EN YAUYOS (LIMA): PLANTAS MEDICINALES Y MERCADO". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 2003.

19. CICCIA, G; COUSSIO, J; MONGELLI, E. "INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST *Aedes aegypti* LARVAE OF SOME MEDICINAL SOUTH AMERICAN PLANTS". *Journal of Ethnopharmacology* 72 (2000) 185–189.

20. COLLAZOS, Carlos. "TABLA PERUANA DE COMPOSICION DE ALIMENTOS". Ministerio de Salud. Lima Perú. Sétima Edición. 1996.

21. CONTRERAS SANCHEZ, Graciela Margarita. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* FRENTE A BACTERIAS ENTEROPATOGENAS". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1983.

22. DE LA ROSA MORALES, Maria Jose; HUERTA DE L ALUZ, Ilse; LIGA, Natalia; VELAZQUEZ ORNELAS, Oscar. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO FLUIDO DE LA PLANTA *Gnaphalium SPP* (GORDOLOBO)". *Episteme* Octubre – Diciembre 2006. N° 8-9 Año 2.

23. DE M; DE AK; MUKHOPADHYAY, R; MIRÓ, M; ANERJEE, AB. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Cuminum cyminum L*". *Ars Pharmaceutica*, 44:3; 257-269, 2003.

24. DE M; DE AK; MUKHOPADHYAY, R; MIRÓ, M; ANERJEE, AB. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Illicium verum*. HOOK. F.". *Ars Pharmaceutica*, 42:3-4; 209-220, 2001.

25. DIAZ ALPAS, Pilar; TORRES DOMINGUEZ, Rosa. "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL AEITE ESENCIAL DE *Schinus molle*". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 1998.

26. DOMINGUEZ, Xorge. "METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA". Editorial Limusa. Primera Edición. 1973.

27. DOMINGO, D; LOPEZ BREA, M. "PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA". *Revista española de quimioterapia*. Diciembre 2003; Vol. 16 (N° 4): 385-393.

28. ESCOBEDO MONGUE, Silvia Cecilia. "CONSERVACION DE LA YUCA (*Manihot esculenta grantz*) CON ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) Y CON GERMICIDA QUIMICO BACOXIN". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1987.

29. FRESQUET FEBRER, José Luis. "USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINALES EN EL MEDIO URBANO: LA CIUDAD DE VALENCIA". *Medicina y Ciencias Sociales*, n° 13 (mayo, 2001).
30. FONT QUER, P. "DICCIONARIO DE BOTANICA". Editorial Labor S.A. Barcelona España. 1970.
31. FONTÚRBEL RADA, Francisco. PROPUESTA DE APROVECHAMIENTO A ESCALA INDUSTRIAL DE LA muña-muña (*Satureja parvifolia*, Lamiaceae). *Ciencia Abierta Internacional*. 2004.
32. FUERTE RUTTON, Cesar; ROQUE ALCATRAZ, Mirtha; SOSA TANTA, Cladis; TRUJILLO PANTAJA, Niza. "CONSTITUYENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum micranthum* W Y SU ESTUDIO ANTIMICROBIANO". *Ciencia e Investigación*. UNMSM. Vol. 2 N° 1. Junio 1999.
33. GILG, Ernest; SCHURHOFF, P.N. "BOTANICA APLICADA A LA FARMACIA". Editorial Nacional de México. Tercera Edición. 1960.
34. GONZÁLEZ PEREYRA, María Laura; CARIDDI, LN; YBARRA, F; ISOLA, MC; DEMO, MS; SABINI, L; MALDONADO, AM. "IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF *Minthostachys verticillata* ON HUMAN LYMPHOCYTES AND BASOPHILS". *Revista Alergia México* 2005; 52(3):105-12.
35. GRAYSON, David H. "MONOTERPENOIDS". *Natural Product Reports*, 1998. 439-475.
36. GROS, Eduardo; POMILIO, Alicia; SEIDES, Alicia; BURTON, Gerardo. "INTRODUCCION AL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES". Secretaria de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Buenos Aires Argentina. 1985.
37. GUERRA ORDOÑEZ, Marta; SÁNCHEZ GOVÍN, Esther; GÁLVEZ BLANCO, Maria De Los Angeles. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Senna alata* L". *Revista Cubana de Plantas Medicinales* v.9 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2004.
38. HAWLEY. "DICCIONARIO DE QUIMICA Y PRODUCTOS QUIMICOS". Ediciones Omega S.A. Nueva Edición. Barcelona. 1992.

39. HERNÁNDEZ DÍAZ, Lizet; RODRÍGUEZ JORGE, Mayra; GARCÍA, Dinah; PINO ALEA, Jorge. "ACTIVIDAD ANTIDERMATOFÍTICA IN VITRO DE ACEITES ESENCIALES". Revista cubana de plantas medicinales 2003; (2). Buscar demas bibliografía en Internet.
40. HERNÁNDEZ DÍAZ, Lizet; RODRÍGUEZ JORGE, Mayra. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS QUE CRECEN EN CUBA". Revista cubana de plantas medicinales v 2001 n.2; (2):44-47. Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2001.
41. INGA NALBIN, Arístides Nathan; GUERRA MALDONADO, Betty Blanca. "EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Mintostachys mollis* (Muña) CONTRA ALGUNAS BACTERIAS Y HONGOS DE INTERES EN LA SALUD". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 2001.
42. JORGE, Alonso. "TRATADO DE FITOMEDICINA, BASES CLINICAS Y FARMACOLOGICAS". Isis Ediciones. Buenos Aires Argentina. 1998.
43. KRENMAYR, Ilse; CASAS, Diana; CHAYTOR, James; SANCHEZ, Josué. "PLANTAS EN LA CULTURA ANDINA. DESCRIPCION, MEDICINA, ALIMENTACION, CULTURA". CEDEPAS. Primera Edición. Huancayo Perú. 2000.
44. LIZARRAGA, Emilio; ABDALA, Lidia. "COMPUESTOS FENOLICOS MAYORITARIOS EN *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae)". Acta Farm. Bonaerense. 23(2): 198-200. 2004.
45. LOCK UGAZ, Olga. "INVESTIGACION FITOQUIMICA, METODOS EN EL ESTUDIO DE PRODUCTOS NATURALES". Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima Perú. 1994.
46. MAGALLANES, Claudio; CÓRDOVA, César; OROZCO, Rita. "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE MACROALGAS MARINAS DE LA COSTA CENTRAL DEL PERÚ". Revista Peruana de biología. 10(2): 125- 132 (2003).
47. MARTÍNEZ, María Julia; GONZÁLEZ, Nancy Alonso; BETANCOURT BADELL, José. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA del *Schinus terebenthifolius* Raddi (COPAL)". Revista Cubana Plantas Medicinales 1(3):37-39, Septiembre-Diciembre, 1996.

48. MARTÍNEZ, María Julia; LÓPEZ BARREIRO, Marisol; MOREJÓN RODRÍGUEZ, Zulema; RUBALCABA, Yoandra. "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO FLUIDO AL 80 % DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI (COPAL)". Revista Cubana Plantas Medicinales. v.5 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2000.
49. MARTÍNEZ, María Julia; MOLINA, Nancy; BOUCOURT, Elisa. "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL *Psidium Guajava* L. (GUAYABA)". Revista Cubana de Plantas Medicinales 1997; 2(1): 12-14.
50. MATISSEK, Reinhard; STEINER, Gabriela; SHNEPEL, FRANK. "ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS, FUNDAMENTOS, MÉTODOS Y APLICACIONES". Editorial Acribia S.A. Segunda Edición. Zaragoza España. 1998.
51. MENDIOLA, Judith; HERNÁNDEZ, Hilda; ACUÑA, Deyanira; ESQUIVEL, Macario; SCULL, Ramon; ABREU, Juan. "ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE *Plasmodium falciparum* DE EXTRACTOS DE ALGAS DEL GÉNERO LAURENCIA". Revista Cubana de Medicina Tropical. 2005: 57(3).
52. MENDO RUBIO, Manuel. "LECCIONES DE MICROBIOLOGÍA Y MEDIOS DE CULTIVO / MANUAL DE LABORATORIO". Ediciones Laborales SRL. Lima Perú. 2001.
53. MENDOZA TICONA, Carlos Alberto; VELASQUEZ TALAVERA, Renato; MERCADO DÍAZ, Ludwig; BALLON ECHEGARAY, Jorge; MAGUIÑA VARGAS, Ciro. "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* SENSIBLE, CON SENSIBILIDAD "BORDERLINE" Y RESISTENTES A LA METICILINA". Revista Medica Herediana 14 (4), 2003. 181-185.
54. MINISTERIO DE SALUD SUBSECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRÁN". "MÉTODOS ESTANDARIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN BACTERIAS AISLADAS DE ANIMALES: TEST DE DIFUSIÓN POR DISCOS Y TEST DE DILUCIÓN". INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. 2001.
55. MONZOTE HIDALGO, Lianet; SARRIEGO RAMOS, Idalia; MONTALVO ÁLVAREZ, Ana M; GARRIDO LORENTE, Nidia; SCULL LIZAMA, Ramón; ABREU PAYROL, Juan. "PROPIEDADES ANTIPROTOZOARIAS DE

ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE PLANTAS CUBANAS". Revista Cubana de Medicina Tropical 2004;56(3):230-3.

56. MORALES ACAME, Rodolfo. "ESTUDIO DE LA EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Minthostachys mollis* (muña) Y DE LA *Salvia sagigatta* (hierba buena)". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1973.
57. MORALES DE SANTA GADEA, Sara; DÍAZ V, Carmen; GONZÁLES Q, Dana; HUAPAYA C, Blanca. "SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DEL *Streptococcus pneumoniae* DETERMINANDO LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA". Rev Med Exp 2001; 18 (1-2): 35-37.
58. MOSS, M.O; ADAMS, M.R. "MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS". Editorial Acribia S.A. Primera Edición. Zaragoza España. 1997.
59. MOSSEL, D; MORENO GARCIA, B. "MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS, FUNDAMENTOS ECOLOGICOS PARA GARANTIZAR Y COMPROBAR LA INOCUIDAD Y LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS". Editorial Acribia. Zaragoza España. Primera Edición. 1985.
60. MULLER, Gunter. "MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS VEGETALES". Editorial Acribia. Zaragoza España. 1981.
61. MUNGUÍA CHIPANA, Yolanda. "ESTUDIO COMPARATIVO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (KUNTH) GRISEB "Muña" DE TRES REGIONES POR GC-MS". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOS DE SAN MARCOS. 2000.
62. MUNARES ECHEVARRIA, Manuel. "ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) EN EL ALMACENAJE DE PAPA COMO INHIBIDOR DEL BROTAMINETO Y MICROORGANISMOS". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1983.
63. MUÑOZ LOPEZ DE BUSTAMANTE, Fernando. "PLANRAS MEDICINALES Y AROMATICAS. ESTUDIO, CULTIVO Y PROCESADO". Ediciones Mundi. Madrid. 1987.
64. NASCIMENTO, Gislene; LOCATELLI, Juliana; FREITAS, Paulo; SILVA, Giuliana. "ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AND PHYTOCHEMICALS ON ANTIBIOTICRESISTANT BACTERIA". Brazilian Journal of Microbiology (2000) 31:247-256.

65. NAVARRO MOLL, M. Concepción. "USO RACIONAL DE LAS PLANTAS MEDICINALES". *Pharmaceutical Care España* 2000; 2: 9-19.
66. OTORONGO. REVISTA DE LA COMUNICACIÓN MULTISECTORIAL DE DESARROLLO DE LA FRONTERA NOR ORIENTAL. INTEGRACION AL DESARROLLO DEL PAIS. "POBLACION INDIGENA Y CONOCIMIENTOS TRADICIONALES DEL USO PLANTAS MEDICINALES". Edición N° 3. Diciembre de 1998.
67. ÖZKAN, G; SAG˘DIÇ, O; BAYDAR, N.G; BAYDAR, H. r. "ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *Rosa damascena* FLOWER EXTRACTS". *Food Sci Tech Int* 2004; 10(4):277-281.
68. PALACIOS VACCARÓ, Julio. "PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DEL PERÚ II". *Concytec. Perú. Serie Ciencias* 1997. Lima Perú. Pg: 176-184 / 234 - 239.
69. PEREZ, Jose Amiel; LOZANO REYES, Nancy; VARGAS, Liliana. "CARACTERIZACION ESPECTOFOTOMETRICA DE PLANTAS MEDICINALES". *Boletín de la Sociedad Química del Perú. Vol. LXI N° 1. Marzo* 1995.
70. PRIMO, V; ROVERA, M; ZANON, S; OLIVIA, M; DEMO, M; DAGHERO, J; SABINI, L. "DETERMINATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Minthostachys verticillata* (GRISEB) EPLING". *Revista Argentina de Microbiología. 2001: 33(2).*
71. QUERT ÁLVAREZ, Rolando; MIRANDA MARTÍNEZ, Migdalia; LEYVA CÓRDOVA, Benito; GARCÍA CORRALES, Humberto; GELABERT AYÓN, Fisma. "RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL EN *Pinus caribaea* MORELET SEGÚN EL SECADO AL SOL Y A LA SOMBRA. III". *Revista Cubana Farmacéutica* 2001;35(1):47-50.
72. RAAL, A; ARAK, E; ORAV, A; IVASK, K. "COMPARACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Matricaria recutita* L. DE ORIGEN DIVERSO". *Ars Pharmaceutica*, 44:2; 159-165, 2003.
73. REEVES ITA, Daniel. "ESTUDIO DE LA EXTRACCION, ALMACENAJE y ELABORACION DE BEBIDAS GASEOSAS CON ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1975.

74. REVISTA SOBRE PROCESAMIENTO A PEQUEÑA ESCALA. "CADENA ALIMENTARIA". "DESTILACION DE ACEITES ESENCIALES". VOL 5 Año 5 N° 5. Programa de Agroprocesamiento de ITDG. Perú. Julio 2000.
75. ROJAS NACCHA, Dianeth Carolina. "MICRONEGOCIOS RURALES. OPCION DE DESARROLLO RURAL. EL CASO DE LA BIODIVERSIDAD DE LAS PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS EN HUAMNGA Y CANGALLO". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 2004.
76. RUIZ, Walter Augusto. "FRACCIONAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (muña) Y SU APLICACIÓN EN LA INHIBICIÓN DEL BROTIAMIENTO DE LA PAPA – CULTIVAR MARIVA". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. 1975.
77. SALAMANCA OVIEDO, Félix. "ESTUDIO DE LA MUÑA Y SU EXTRACTO". Taller Feria Desarrollo de la Pequeña y Mediana Industria Alimentaria en Latinoamérica. INDDA/UNALM. 1986.
78. SALCEDO COA, Darío; CRISPIN PEREZ, Víctor; GAMARRA BALLENA, Gerardo; CESPEDES CHUMAN, José. "MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA". Facultad de Farmacia y bioquímica. Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos. UNMSM. Lima Perú 1985.
79. SALCEDO COA, Darío; CRISPIN PEREZ, Víctor. "MEDIO DE CULTIVO. INTERPRETACION BIOQUIMICA". Facultad de Farmacia y bioquímica. Departamento Academico de Microbiologia y Parasitologia. UNMSM. Lima Perú 1987.
80. SALMON BARRANTES, Laurence Rommel. "CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA ESPECIE VEGETAL (*Minthostachys mollis*) KUNT GRISEB: MUÑA EN LOS ASPECTOS FITOQUIMICOS, TOXICOLOGICOS, ANTIMICROBIANO Y BROMATOLOGICO". (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 1994.
81. SKOOG, Douglas; LEARY, James. "ANÁLISIS INSTRUMENTAL". Editorial Mc Graw Hill Interamericana de España. Cuarta Edición.
82. STASHENKO, Elena E; JARAMILLO, Beatriz E; MARTÍNEZ, Jairo R. "COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE PLANTAS DE LA FAMILIA

VERBENACEAE". Rev. Acad. Colomb. Cienc.: volumen XXVII, número 105-diciembre de 2003. 579-598.

83. SUBBA, M.S.; SOUMITHRI, T.C.; SURYANARAYANA, R. "ANTIMICROBIAL ACTION OF CITRUS OILS". Journal of Food Science. 1967; 32.
84. TOLOSA, L; CAÑIZARES, E. "OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS DE CAMPECHE". Ars Pharmaceutica, 43:1-2; 187-204, 2002.
85. TORTORA, Gerard; FUNKE, Berdell; CASE, Christine. "INTRODUCCION A LA MICROBIOLOGIA". Acribia S.A. Zaragoza España. 1993.
86. TYLER, Varro; BRADY, Lynn; ROBBERS, James. "FARMACOGNOSIA". Editorial El Ateneo. Segunda Edición. Buenos Aires Argentina. 1979.
87. UBILLUS, Fabiola; MUÑOZ, Elena; MESTRES, Ramón. "ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys tomentosa*)". Boletín de la Sociedad Química del Perú. Vol. LXIV N° 1. Marzo 1998.
88. VELIČKOVIĆ, Dragan T; RANDJELOVIĆ, Novicav; RISTIĆ, Mihailo S.; ŠMELCEROVIĆ, Andrija A.; VELIČKOVIĆ, Anas. "CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTION OF THE ETHANOL EXTRACTS OF *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopsis* L". J. Serb. Chem. Soc. 67 (10)639-646(2002).
89. WHITTEN, Keneth; DAVIS, Raymond; LARRY PECK, M. "QUIMICA GENERAL". Editorial Mc Graw Hill. Quinta Edición. España. 1999.
90. ZIGADLO, Julio; MAESTRI, Damián; LAMARQUE, Alicia; GUZMAN, Carlos; VELASCO-NEGUERUELA, Arturo; PEREZ-ALONSO, Maria; GARCIA-VALLEJOS, Maria; GROSSO, Nelson. "ESSENTIAL OIL VARIABILITY OF *Minthostachys verticillata*". Biochemical Systematics and Ecology. 1996: 24(4).

torada. Pero incluso en autoclaves en las que se emplean gases no volátiles como el agua, existe un riesgo de fugas que puede impedir variadas en la concentración de los componentes del medio, si cuando se inician las esterilizaciones sufridas.

El calor intermedio también se utiliza para la desinfección de los microorganismos. Siendo, como ya se ha comentado, el punto de ebullición, una temperatura más elevada que el punto ebullición, como estas temperaturas las sustancias se descomponen rápidamente, así como que las microorganismos volátiles. Además, el vapor de agua, especialmente si se genera a alta presión, es un agente eficaz para el control del interior de la cámara de esterilización. Se pueden emplear diferentes métodos: Ebullición, vapor saturado y vapor saturado a presión.

I) Ebullición: El agua hirviendo (100°C) tiene acción desinfectante, ya que algunas bacterias 100 microbios se destruyen las formas vegetativas de los microorganismos, pero las esporas bacterianas pueden sobrevivir incluso a temperaturas prolongadas. Se pueden utilizar el punto ebullición de agua hirviendo (esta con fines de desinfección en el laboratorio), cuando no se requiere el control de esterilidad o cuando no se dispone de otros métodos más precisos, como para material quirúrgico, tejidos, etcétera, así como para medios de cultivo que no pueden esterilizarse en autoclaves.

II) Vapor saturado: Este método se emplea con frecuencia para esterilizar medios de cultivo que no se pueden esterilizar a una temperatura superior a 100°C sin que pierdan algunas de sus propiedades, como leche, sueros, etcétera, etcétera. Se utilizan autoclaves a presión atmosférica, con la ventaja adicional, cuando no se dispone de autoclave a 100°C, y se realiza el proceso durante tres días consecutivos, de 12 horas a temperatura ambiente en las infecciones antes de la esterilización. La ventaja es que se puede esterilizar (100°C) durante 20-25 minutos desinfectando en estas condiciones las formas vegetativas pero no las esporas bacterianas. Si estas se encuentran presentes en la muestra generará después del control de la muestra y otras formas vegetativas serán desinfectadas en las siguientes horas.

Este método de esterilización se desvirtúa frente a la esterilización por radiación o filtración.

III) Vapor saturado a presión: La esterilización por vapor saturado utiliza vapor de agua saturado que se calienta a una temperatura sobre la presión sobre la presión atmosférica, siendo, estas sustancias con ella el punto de ebullición del agua a 100°C y 121°C y consecuentemente la desinfección de las formas microbianas (como las bacterias aerobias

o anaerobias) en un tiempo de 15 a 20 minutos. Este método se utiliza para esterilizar la muestra de desinfección de las esporas bacterianas, que presentan una alta resistencia térmica y que pueden sobrevivir, como ya se ha indicado, a 100°C durante horas. El vapor de agua saturado por encima de los 100°C se descompone en los gases de los microorganismos de los gases, como el hidrógeno y el oxígeno, formando un medio oxidante, formando que se oxidan el el vapor de agua y se oxidan. Este método de esterilización requiere el uso del autoclave.

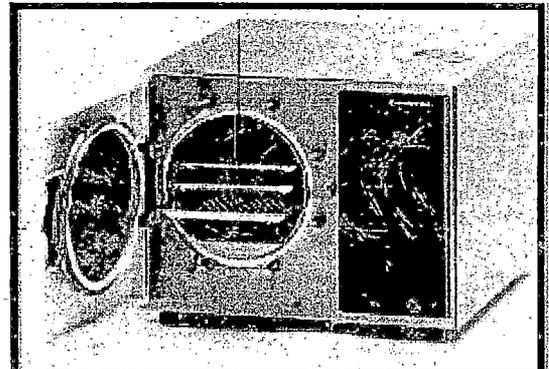


Figura 2.2: Autoclave de cuba horizontal

El autoclave permite esterilizar la muestra a una temperatura sobre la presión atmosférica, elevándose con ella la temperatura de ebullición del agua que se calienta en su interior.

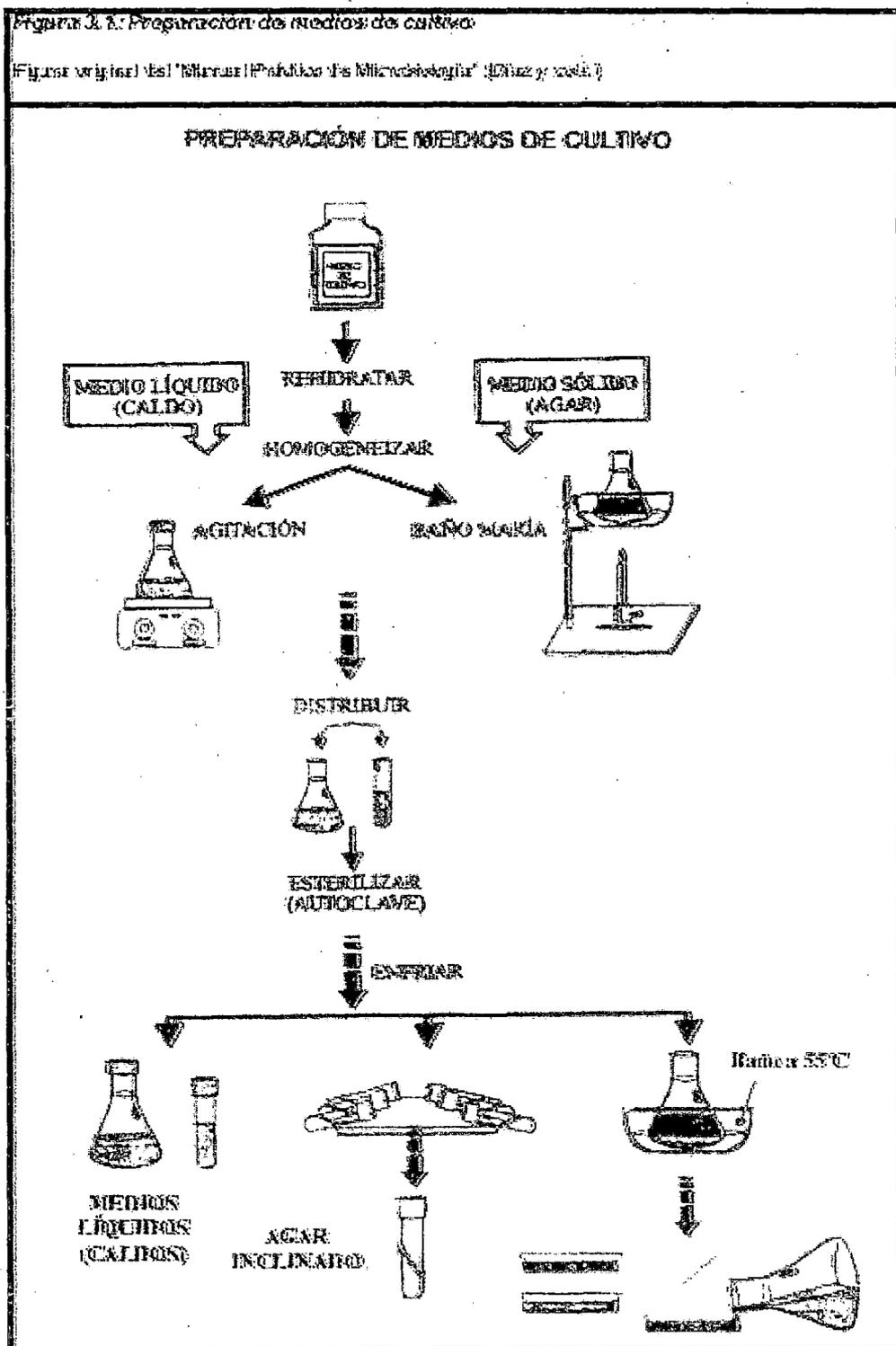
Como se ha comentado, también se puede utilizar, en autoclave, el material a esterilizar que se calienta sobre una rejilla o placa superior. Después de haber calentado el líquido, se conecta la cámara del vapor y comienza a elevarse la temperatura en su interior. La ventaja adicional del sistema de vapor es que se puede controlar la temperatura de ebullición en el interior del autoclave por medio de un controlador. La esterilización de los medios de cultivo requiere que se utilice un medio de cultivo antes de vapor de agua y en las que se calienta, ya que no se calienta la temperatura superior a la presión atmosférica y no se calienta la esterilización. La ventaja es que cuando se calienta el vapor de agua y, en particular de los microbios, comienza a elevarse la presión hasta una temperatura sobre la presión normal, elevándose con la temperatura la temperatura hasta 121°C. Temperaturas 15-20 minutos, en estas condiciones, el material se esteriliza. Es el incremento de temperatura que comienza de los 100°C y no la presión de que desinfecta los microorganismos.

Si se esteriliza con medios de líquidos, es necesario mantener el material en el autoclave durante períodos de tiempo más prolongados, para que pueda ser esterilizado los 121°C en el

APENDICE 3

Figura 3.1. Preparación de medios de cultivo.

Figure original vesl "Manual de Prácticas de Microbiología" (Díaz y cols.)



APENDICE 4

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE UN ANTIBIÓTICO

Las técnicas de dilución son las más generales de determinar la sensibilidad de una especie microbiana a un antibiótico. En particular, son útiles para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). La técnica de concentración mínima inhibitoria compara el inhibir el crecimiento. A partir de estas diluciones de determinación si es posible contar una infección causada por una microorganismos con una concentración. Si la CMI es menor que la concentración de la concentración que se observan son las células de la muestra inoculada, el resultado puede tener efecto y el microorganismo es susceptible; en caso contrario, los organismos y el microorganismo es susceptible resistente. Una limitación es un estudio de la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico. Los métodos especiales y técnicas microbianas presentan métodos para la sensibilidad de los microorganismos, los que son necesarios para una evaluación para poder determinar el comportamiento de un organismo para el tratamiento de una infección bacteriana.

Objetivo:

Determinar la sensibilidad o resistencia de un antibiótico de una bacteria a la bacteria, utilizando el método de dilución en tubo.

Materiales:

Cinco bacterias son inoculadas en el tubo de Enderbrock (2), 7 tubos con 1 ml de la muestra *Staphylococcus aureus*, solución de ampicilina (10 mg/ml) en la muestra *Staphylococcus aureus* (2 ml), pipetas de 1 ml y pipetas Pasteur.

Técnica:

1.- Preparación del inóculo:

Esta técnica es un método de suspensión bacteriana en solución para. Para ello, generalmente es necesario, si es posible, se debe un microorganismo en placa.

La preparación del inóculo es mejor cuando se usa un cultivo de un microorganismo en estado de un tubo de la muestra *Staphylococcus aureus* es inoculada en 10⁸ a 10⁹ células/ml.

2.- Preparación de las diluciones de antibiótico: a) Hacer un tubo de la muestra *Staphylococcus aureus* (2, 1, 0.5, 0.25 y 0 mg/ml).

b) Pipetear 1 ml del tubo que contiene la solución de ampicilina (10 mg/ml) en un tubo con 2.

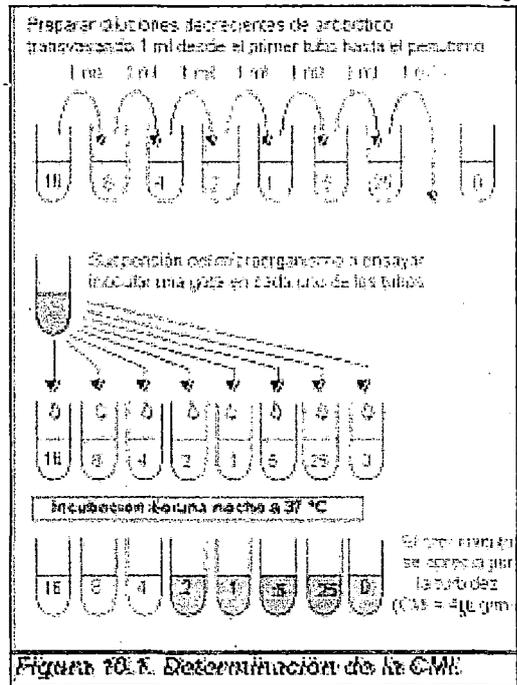
c) Mezclar bien y pipetear 1 ml en 1 tubo con 1 mg/ml (0.5 mg/ml).

d) Repetir el proceso anterior hasta llegar al tubo con 0.25 mg/ml, así que se observen 1 ml. No añadir más dilución al tubo con 0.25 mg/ml.

3.- Siembra: Tomar una muestra del tubo de 0.25 mg/ml con una pipeta Pasteur e inocular una gota en cada tubo de la serie de diluciones (incluyendo los de 10 y 0 mg/ml). Incubar los tubos a 37°C durante 24 h.

Interpretación:

Si las bacterias sobreviven al tubo donde son los tubos. Los que son susceptibles crecerán, el que sobrevive la concentración más baja de antibiótico susceptible es la CMI. El tubo que no sobrevive antibiótico debe estar fuera (control) positivo.



APENDICE 5

TABLA 1. Valores registrados de límites de confianza de los diámetros de zona de los discos de sensibilidad antibiótica -lactámicos y no lactámicos de fabricación extranjera

| DISCO DE SENSIBILIDAD | LÍMITES DE CONFIANZA | | | | | | OBSERVACIONES |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|--------------------------|-----------|----------------------|-----------|---------------|
| | t 0,05 (AL 95% DE PROBABILIDAD) (mm) | | | | | | |
| | E. coli ATCC 25922 | | P. aeruginosa ATCC 27853 | | S. aureus ATCC 25923 | | |
| ANTIMICROBIANA | V.T | V.E | V.T | V.E | V.T, | V.E. | |
| Amoxicilina/Ác. Clavulánico 20/m10g ^a | 19,0-250 | 22,0-27,2 | - | - | 28,0-36,0 | 39,9-44,8 | No conforme |
| Ampicilina 10 mg ^a | 16,0-22,0 | 23,3-25,4 | - | - | 27,0-35,0 | 37,7-42,5 | No conforme |
| Cefotaxime 30mg ^a | 29,0-35,0 | 29,6-33,3 | 18,0-22,0 | 18,1-21,6 | 25,0-31,0 | 28,8-31,1 | Conforme |
| Cefotaxime 30mg ^a | 25,0-32,0 | 25,5-27,2 | 22,0-29,0 | 24,3-28,9 | 16,0-20,0 | 16,2-19,9 | Conforme |
| Cefotaxime 30mg ^a | 29,0-35,0 | 31,0-34,8 | 17,0-23,0 | 19,2-21,4 | 22,0-28,0 | 22,4-28,0 | Conforme |
| Cefotaxime 30mg ^a | 20,0-26,0 | 20,5-25,4 | - | - | 27,0-28,0 | 27,8-31,1 | Conforme |
| Oxacilina 30mg ^a | - | - | - | - | 18,0-24,0 | 18,1-23,3 | Conforme |
| Penicilina 10U ^a | - | - | - | - | 26,0-37,0 | 40,2-47,3 | No conforme |
| Ácido Nalídico 30 mg ^b | 22,0-28,0 | 22,7-25,2 | - | - | - | - | Conforme |
| Amicacina 30 mg ^b | 19,0-26,0 | 24,4-31,4 | 18,0-26,0 | 20,9-28,6 | 20,0-26,0 | 26,8-28,4 | No conforme |
| Ciprofloxacina 5 mg ^b | 30,0-40,0 | 30,6-37,4 | 25,0-33,0 | 30,5-32,2 | 22,0-30,0 | 25,3-29,3 | Conforme |
| Clindamicina 2 mg ^b | - | - | - | - | 24,0-30,0 | 27,5-30,0 | Conforme |
| Cloranfenicol 30 mg ^b | 21,0-20,0 | 24,4-26,4 | - | - | 19,0-26,0 | 20,0-25,5 | Conforme |
| Eritromicina 15 mg ^b | - | - | - | - | 22,0-30,0 | 22,9-29,4 | Conforme |
| Estreptomina 10 mg ^b | 12,0-20,0 | 21,2-23,8 | - | - | 14,0-22,0 | 20,4-26,2 | No conforme |
| Gentamicina 10 mg ^b | 19,0-26,0 | 20,8-26,0 | 16,0-21,0 | 18,0-20,9 | 19,0-27,0 | 19,9-25,1 | Conforme |
| Norfloxacin 10 mg ^b | 28,0-35,0 | 28,8-31,2 | 22,0-29,0 | 26,2-28,5 | 17,0-28,0 | 19,8-28,0 | Conforme |
| Vancomicina 30 mg ^b | - | - | - | - | 15,0-19,0 | 12,5-17,3 | No conforme |

V.E= Valores experimentales ^aAntibiótico
b-lactámico
V.T= Valores Teóricos (Norma M2-A5 NCCLS) ^bAntibiótico
no b-lactámico

X.ANEXOS.

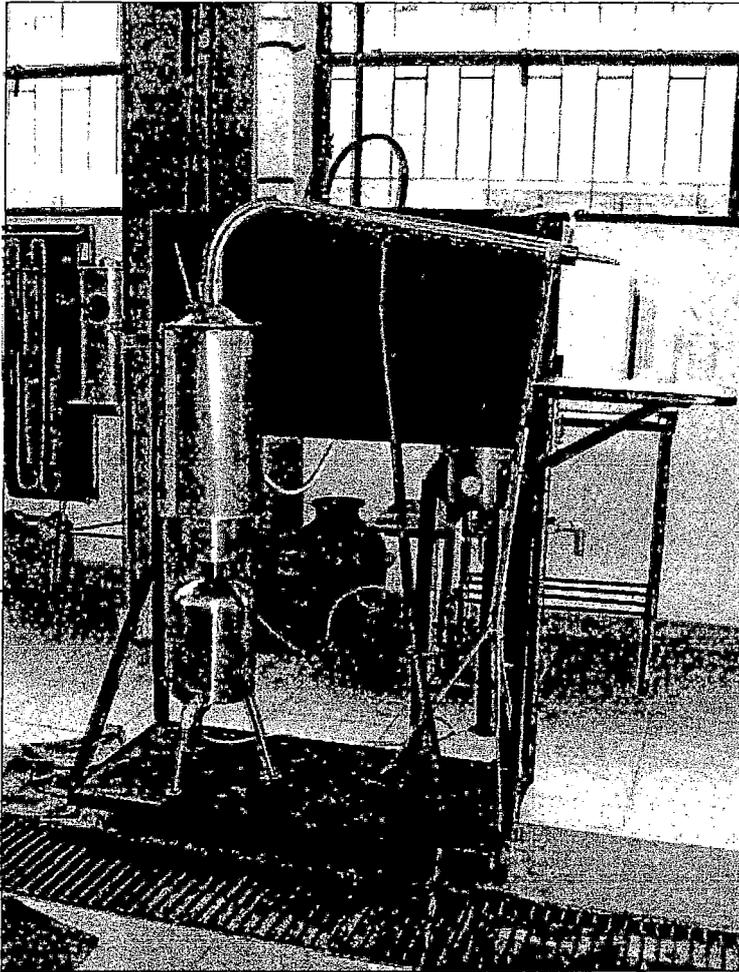


Foto 1: Equipo de Extracción por arrastre por vapor.

Foto 2: Aceite Esencial de Muña.



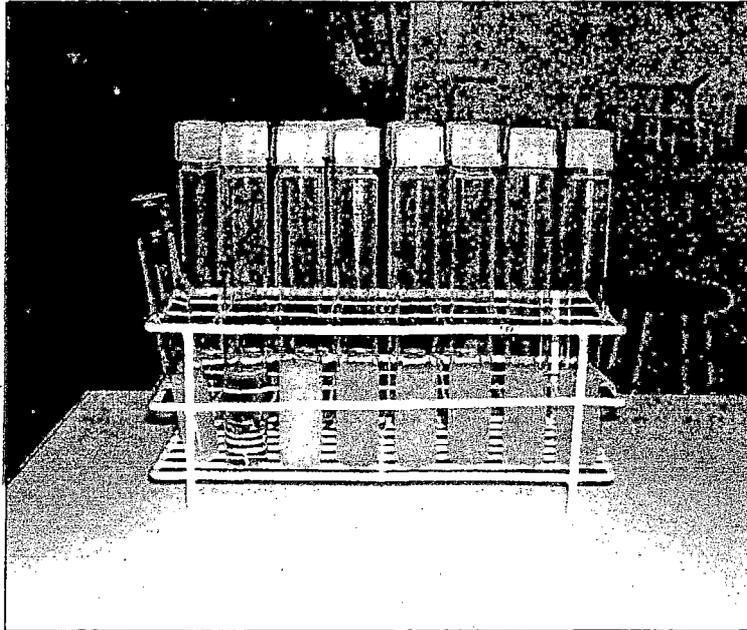


Foto 3: Batería para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

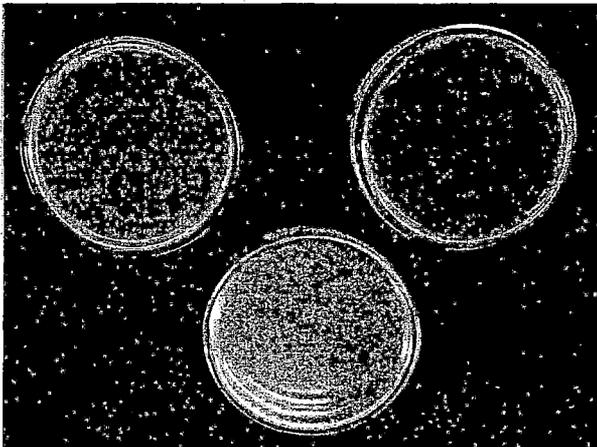
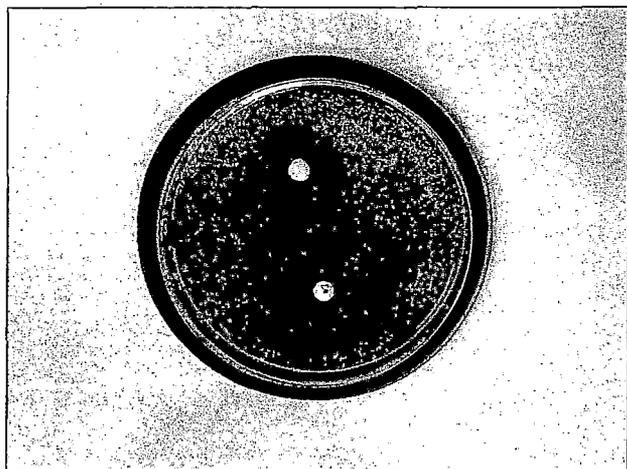


Foto 4: Siembra de 3 diluciones diferentes de una misma concentración.

Foto 5: Prueba de sensibilidad al antibiótico Cefotaxime contra Solución de Aceite esencial de Muña para *Staphylococcus aureus*.





INFORME DE ENSAYO
N° 334-06

Cliente : **HELIDA ELIZABETH CAMACHO MARTINEZ**
Dirección : Urb. Brisas de Sta. Rosa 3ra. Etapa Mz. G Lt. 11 – SMP.
Atención : Srta. Helida E. Camacho M.
Referencia USAQ : 198-01
Cotización : 258/2006/USAQ
Muestra : ACEITES ESENCIAL DE MUÑA
Fecha de Recepción : 15/08/06
Fecha de Emisión : 04/09/06

RESULTADOS – MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL DE MUÑA

| N° | TR | COMPUESTOS | PM | FORMULA | % AREA |
|----|-------|---------------------------------------|-----|------------------------------------------------|---------|
| 1 | 2.65 | Butanal,3-Methyl | 86 | C ₅ H ₁₀ O | 0.0078 |
| 2 | 5.45 | Butanoic Acid,2-Methyl-,Ethyl Ester | 130 | C ₇ H ₁₄ O ₂ | 0.0068 |
| 3 | 9.15 | Alpha.-Pinene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.6495 |
| 4 | 11.33 | Beta.-Pinene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.7038 |
| 5 | 11.63 | Beta.-Myrcene | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 0.2149 |
| 6 | 13.76 | DL-Limonene | 136 | C ₅ H ₁₂ O | 1.0416 |
| 7 | 13.90 | 1,8-Cineole | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 0.1227 |
| 8 | 15.64 | Linalool Oxide | 170 | C ₁₀ H ₁₈ O ₂ | 0.0467 |
| 9 | 16.98 | Linalool | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 2.1259 |
| 10 | 19.64 | P-Menthone | 154 | C ₁₀ H ₁₈ O | 24.1305 |
| 11 | 20.52 | Isopulegone | 152 | C ₁₀ H ₁₆ O | 1.4643 |
| 12 | 22.97 | Pulegone | 152 | C ₁₀ H ₁₈ O | 29.2150 |
| 13 | 24.88 | 8-Hydroxy-delta.-4(5)-P-Menthen-3-one | 168 | C ₁₀ H ₁₆ O ₂ | 0.1750 |
| 14 | 25.14 | Phenol,5-Methyl-2-(1-methylethyl) | 150 | C ₁₀ H ₁₄ O | 0.1658 |
| 15 | 27.64 | Piperitenone Oxide | 166 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ | 11.9734 |
| 16 | 29.62 | Trans-Caryophyllene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.8810 |



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS



| Nº | TR | COMPUESTOS | PM | FORMULA | % AREA |
|----|-------|--------------------------|-----|------------------------------------------------|---------|
| 17 | 30.09 | Carane,4,5-Epoxy-,Trans | 152 | C ₁₀ H ₁₆ O | 0.2668 |
| 18 | 30.76 | Alpha.-Humelene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.1166 |
| 19 | 30.91 | Alloaromadendrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.0381 |
| 20 | 31.55 | Germacrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.3335 |
| 21 | 31.87 | Ledene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 0.0191 |
| 22 | 32.07 | Bicyclogermacrene | 204 | C ₁₅ H ₂₄ | 1.3888 |
| 23 | 32.73 | 1S,Cis-Calamenene | 202 | C ₁₅ H ₂₂ | 0.0102 |
| 24 | 34.64 | (+)Spathulenol | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 1.2705 |
| 25 | 34.79 | (-)-Caryophyllene Oxide | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.1705 |
| 26 | 36.23 | Isospathulenol | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.6084 |
| 27 | 37.22 | Longipinocarveol, Trans- | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O | 0.0205 |
| 28 | 42.63 | Platambin | 238 | C ₁₅ H ₂₆ O ₂ | 0.0426 |
| 29 | 45.95 | Manoyl Oxide | 290 | C ₂₀ H ₃₄ O | 0.0889 |
| | | Otros | | | 22.7008 |

Muestra proporcionada por el cliente

Método: USAQ-ME-11.Determinación de compuestos por GC-MS.



SRB
Quím. Ma. Angélica Rodríguez Best
Directora de la USAQ
CQP:0597

Nota:

El presente Informe solamente es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada cualquier corrección, o enmienda en el mismo lo anula automáticamente.

Observ.:

La muestra podrá ser devuelta dentro del plazo de 30 días calendarios de recepcionada. Sin embargo cualquier consulta de resultados podrá ser absuelta dentro de los 15 días calendarios de emitido el Informe de Ensayo, dado el tiempo indicado no se aceptaran reclamos.



ANEXO 01

EQUIPO EMPLEADO:

CROMATOGRAFO DE GASES CON DETECTOR DE MASAS

MARCA : PERKIN ELMER

MODELO: CLARUS

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

TEMPERATURA DEL HORNO:

80 °C por 2 min.

10 °C hasta 300 °C x 30 min.

TEMPERATURA DEL INYECTOR: 200 °C

TEMPERATURA DEL DETECTOR: 200 °C

FLUJO: 20 PSI

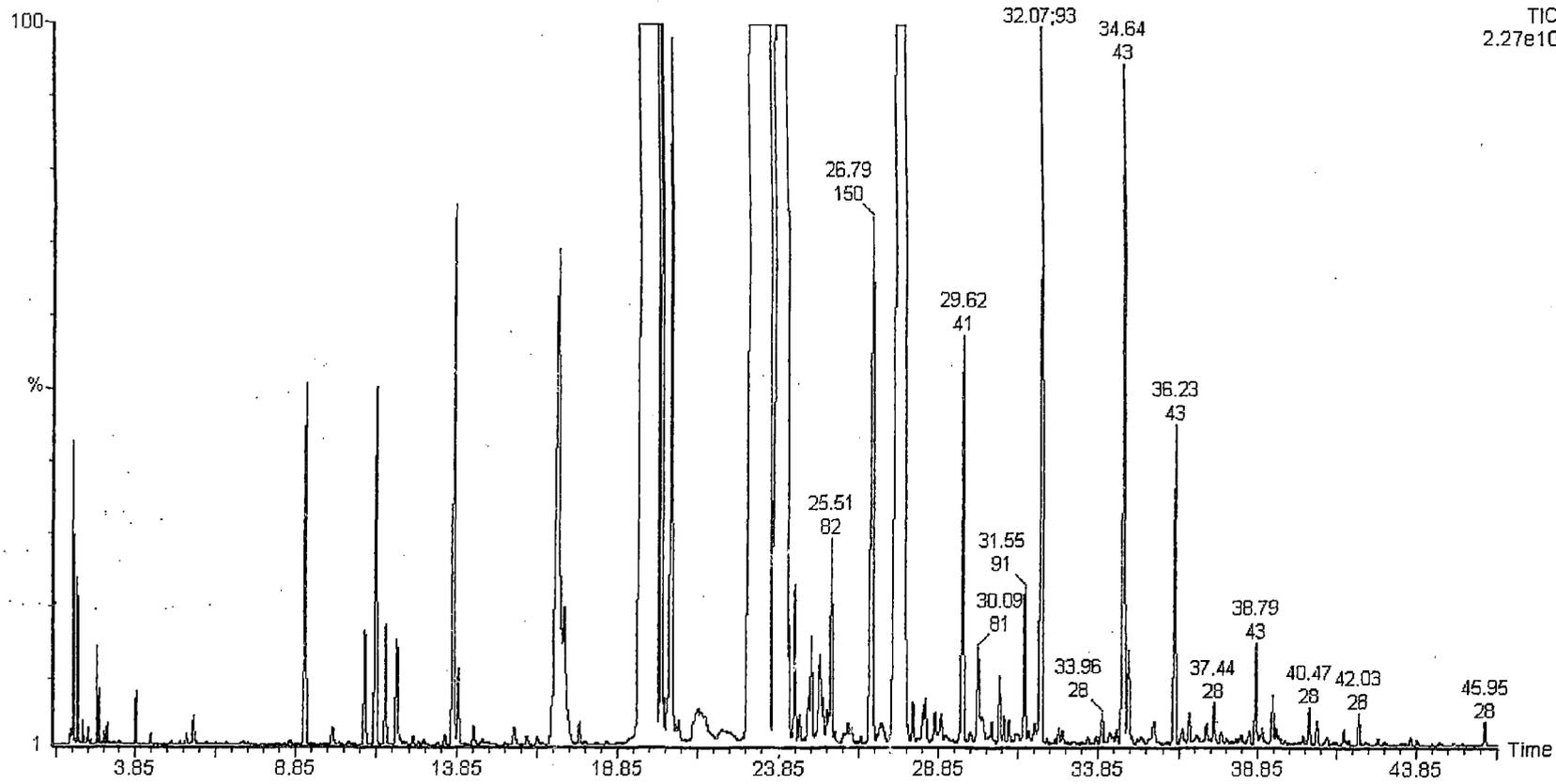
COLUMNA EMPLEADA: SPB-1

VOLUMEN DE INYECCION : 0,2 µL

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Scan EI+
TIC
2.27e10

Muna-USAQ



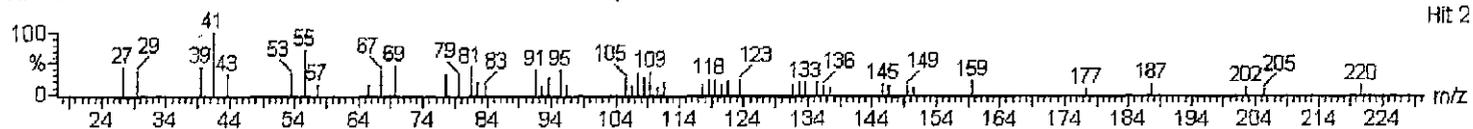
| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|--------------------------|------|------------------------------------------------|
| 1 | 804 | 657 | METHYL DIHYDROISOSTEMOL | 334 | C ₂₁ H ₃₄ O ₃ |
| 2 | 801 | 660 | LONGIPINGCARVEOL, TRANS- | 320 | C ₁₅ H ₂₄ O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

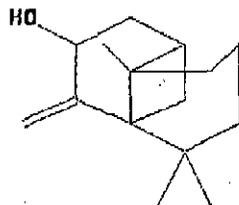
Muna-USAQ 7359 (37.222) Cm (7351:7371-7370:7378x1.200)



R:801 Nist 2441: LONGIPINGCARVEOL, TRANS-



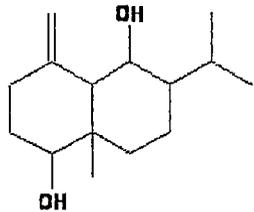
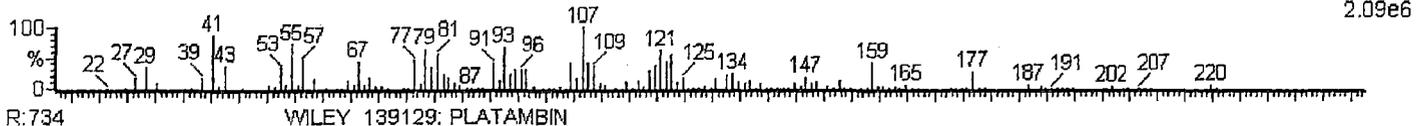
0,C:\TURBOMASS\METANOL.PRO\Data\,Lavanda-USAQ2,raw,19001492,4



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------|------|------------------------------------------------|
| 4 | 734 | 532 | PLATAMBIN | 238 | C ₁₅ H ₂₆ O ₂ |
| 5 | 734 | 532 | PLATAMBIN | 238 | C ₁₅ H ₂₆ O ₂ |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 8432 (42.633) Cm (8416:8454-8443:8468x1.200)

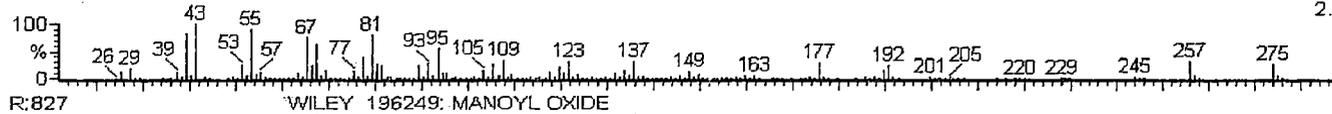


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-----------------------------------------------------------------|------|---------|
| 5 | 828 | 681 | 1H-NAPHTHO[2,1-B]PYRAN, 3-ETHENYLDODECAHYDRO-3,4A,7,7,10A-PENTA | 290 | C20H34O |
| 6 | 827 | 681 | MANOYL OXIDE | 290 | C20H34O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

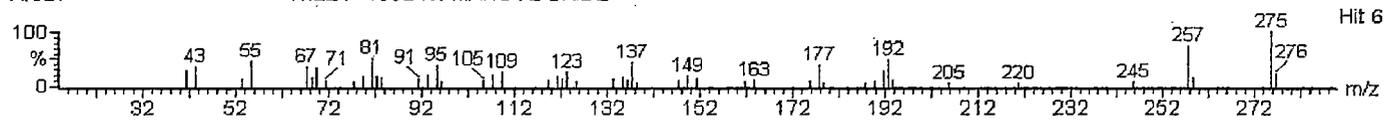
Muna-USAQ 9090 (45.951) Cm (9080:9101-9040:9058x1.200)

2.65e7



R:827

WILEY 196249: MANOYL OXIDE



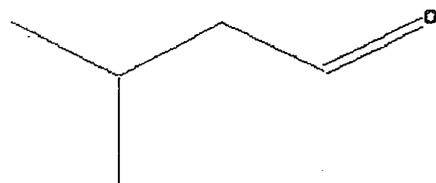
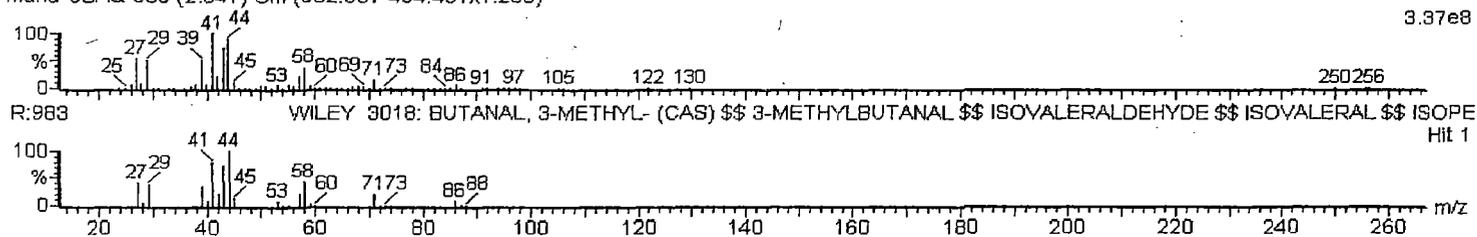
Hit 6

| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 983 | 927 | BUTANAL, 3-METHYL- (CAS) \$\$ 3-METHYLBUTANAL \$\$ ISOVALERALDEHYDE | 86 | C5H10O |
| 2 | 976 | 831 | BUTANAL, 3-METHYL- (CAS) \$\$ 3-METHYLBUTANAL \$\$ ISOVALERALDEHYDE | 86 | C5H10O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 505 (2.647) Cm (502:507-494:497x1.200)

3.37e8

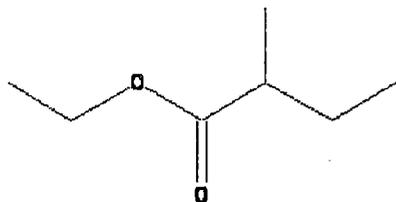
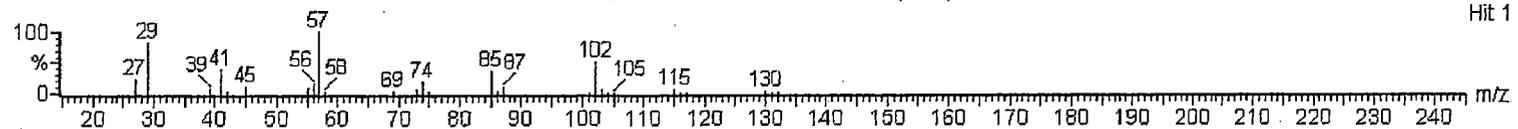
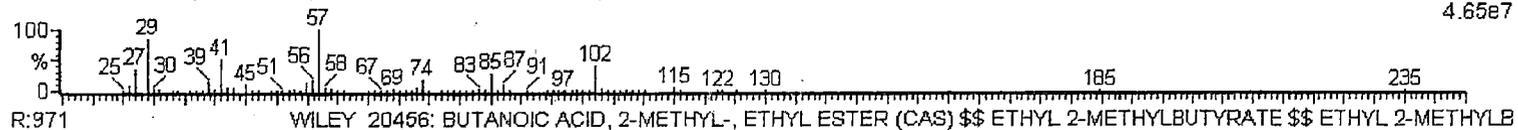


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 971 | 809 | BUTANOIC ACID, 2-METHYL-, ETHYL ESTER (CAS) \$\$ ETHYL 2-METHYLBUTY | 130 | C7H14O2 |
| 2 | 962 | 721 | BUTANOIC ACID, 2-METHYL-, ETHYL ESTER (CAS) \$\$ ETHYL 2-METHYLBUTY | 130 | C7H14O2 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 1060 (5.445) Cm (1056:1065-1042:1049x1.200)

4.65e7



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Form |
|-----|-----|-----|-----------------------------------------------------------------------------|------|------|
| 1 | 990 | 985 | .ALPHA-PINENE, (-)- \$\$\$ BICYCLO[3.1.1]HEPT-2-ENE, 2,6,6-TRIMETHYL- (CAS) | 136 | C10H |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 1794 (9.147) Cm (1789:1797-1766:1771x1.200)

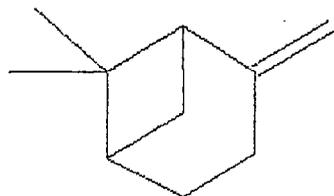
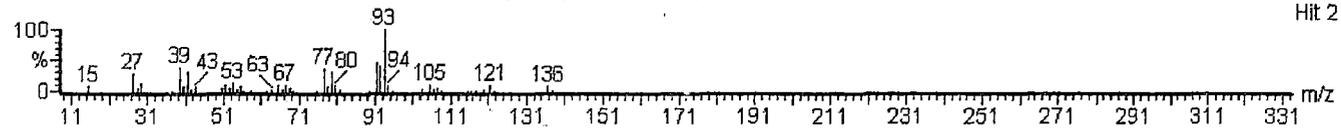


R:990

Nist 48888: BICYCLO[3.1.1]HEPT-2-ENE, 2,6,6-TRIMETHYL-, (+/-)-

1.59e9

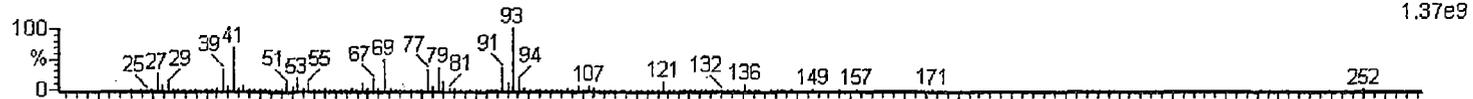
Hit 2



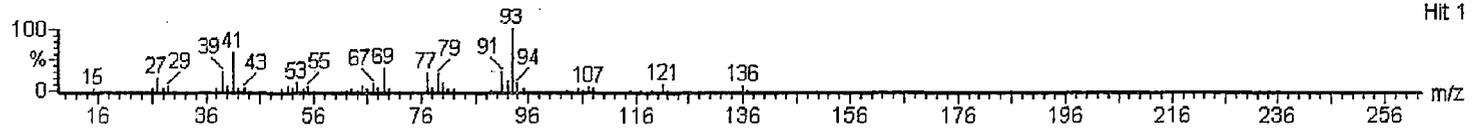
| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula | CAS |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------|-------|
| 1 | 990 | 976 | BETA-PINENE | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 127-9 |
| 2 | 980 | 972 | 2-BETA-PINENE \$\$ BICYCLO[3.1.1]HEPTANE, 8,8-DIMETHYL-2-METHYLENE- | 136 | C ₁₀ H ₁₆ | 127-9 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 2226 (11.325) Cm (2219:2232-2181:2196x1.200)



R:990 Nist 48535: BETA-PINENE

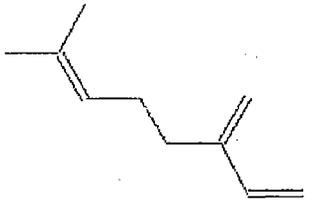
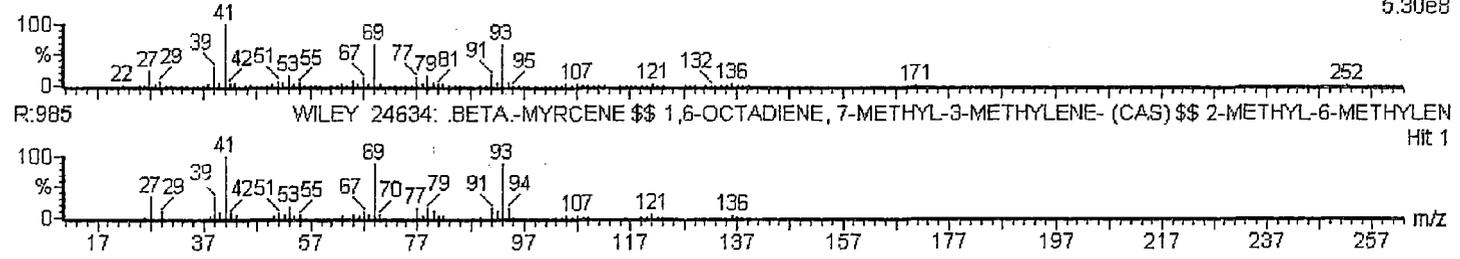


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 985 | 978 | .BETA-MYRCENE \$1,6-OCTADIENE, 7-METHYL-3-METHYLENE- (CAS) \$2-M | 136 | C10H16 |
| 2 | 982 | 977 | .BETA-MYRCENE \$1,6-OCTADIENE, 7-METHYL-3-METHYLENE- (CAS) \$2-M | 136 | C10H16 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 2286 (11.628) Cm (2279:2293-2256:2268x1.200)

5.30e8

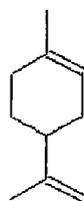
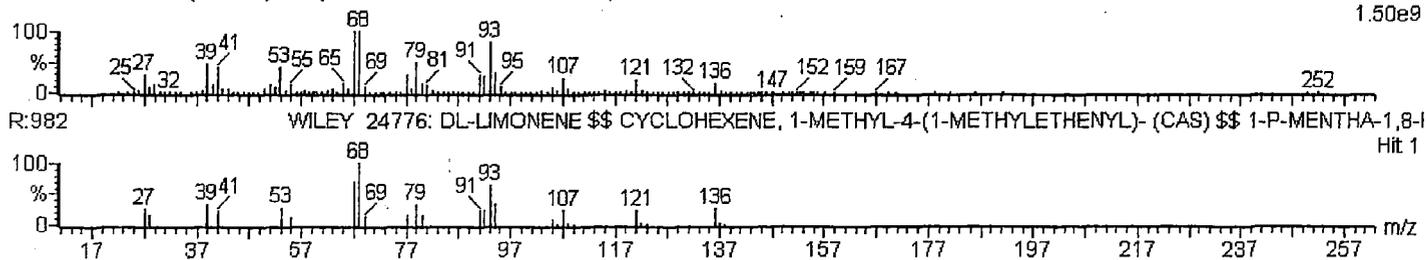


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 982 | 855 | DL-LIMONENE \$\$\$ CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHENYL)- (CAS) | 136 | C10H16 |
| 2 | 977 | 792 | DL-LIMONENE \$\$\$ CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHENYL)- (CAS) | 136 | C10H16 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 2708 (13.756) Cm (2701:2713-2563:2581x1.200)

1.50e9



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|----------------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 965 | 488 | 1,8-CINEOLE \$\$ 2-OXABICYCLO[2.2.2]OCTANE, 1,3,3-TRIMETHYL- (CAS) \$\$ TE | 154 | C10H18O |
| 2 | 963 | 916 | 1,8-CINEOLE \$\$ 2-OXABICYCLO[2.2.2]OCTANE, 1,3,3-TRIMETHYL- (CAS) \$\$ TE | 154 | C10H18O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAG 2737 (13.902) Cm (2729:2745-2667:2682x1.200)

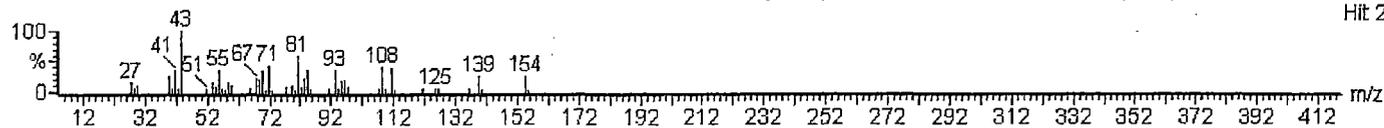
1.9988



R:963

WILEY 41680: 1,8-CINEOLE \$\$ 2-OXABICYCLO[2.2.2]OCTANE, 1,3,3-TRIMETHYL- (CAS) \$\$ TERPAN \$\$ ZINEC

Hit 2

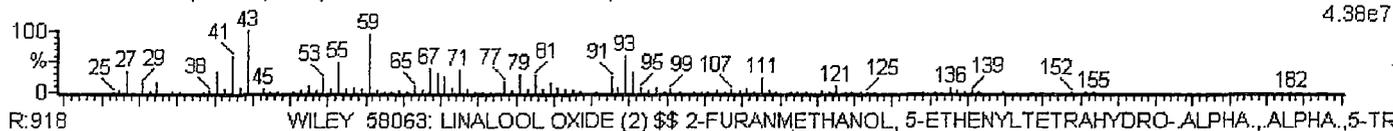


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-------------------------------------------------------------------|------|----------|
| 1 | 918 | 858 | LINALOOL OXIDE (2) \$\$ 2-FURANMETHANOL, 5-ETHENYL-TETRAHYDRO-ALP | 170 | C10H18O2 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 3082 (15.642) Cm (3077:3089-3042:3047x1.200)

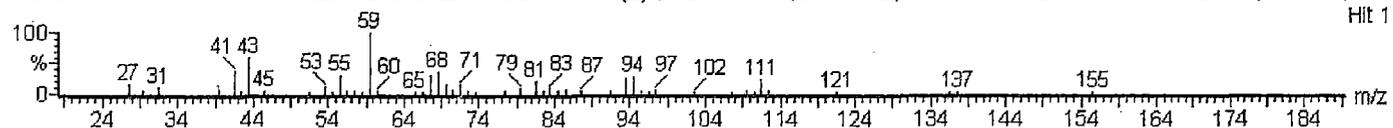
4.38e7



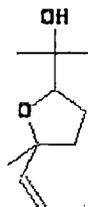
R:918

WILEY 58063: LINALOOL OXIDE (2) \$\$ 2-FURANMETHANOL, 5-ETHENYL-TETRAHYDRO-ALPHA.,ALPHA.,5-TE

HIT 1



0,C:\TURBOMASS\METANOL.PRO\Data\Romero-USAQ1,raw,19001492,4

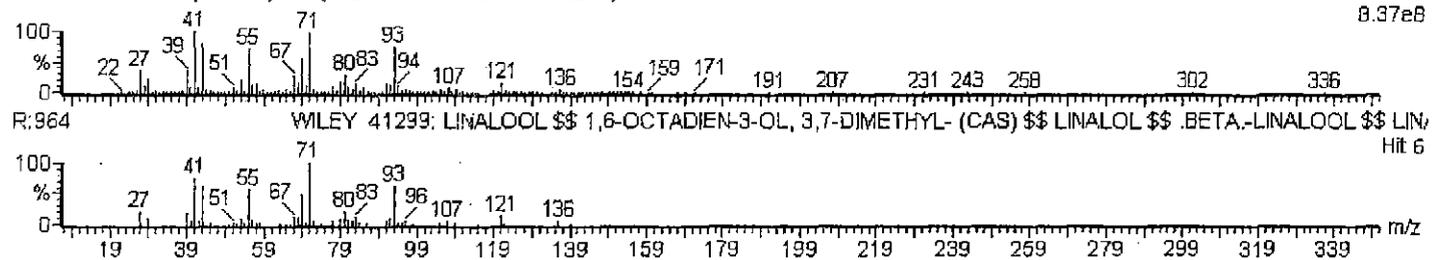


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|------------------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 982 | 626 | LINALOOL \$\$ 1,6-OCTADIEN-3-OL, 3,7-DIMETHYL- (CAS) \$\$ LINALOL \$\$.BETA | 154 | C10H18O |
| 2 | 978 | 956 | LINALOOL \$\$ 1,6-OCTADIEN-3-OL, 3,7-DIMETHYL- (CAS) \$\$ LINALOL \$\$.BETA | 154 | C10H18O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 3348 (16.983) Cm (3324;3375-3258;3280x1.200)

8.37e8

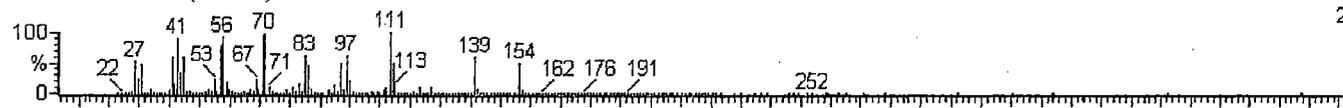


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 937 | 918 | P-MENTHONE\$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)-, TRANS | 154 | C10H18O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

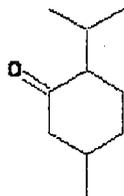
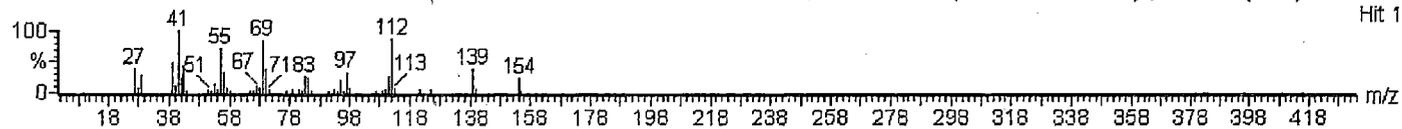
Muna-USAQ 3874 (19.636)

2.61e9



R:937 WILEY 41493; P-MENTHONE \$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)-, TRANS- (CAS) \$\$ TRANS

Hit 1

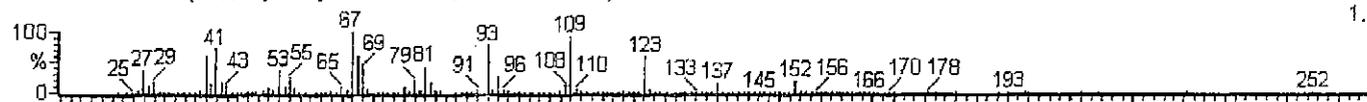


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 987 | 970 | ISOPULEGONE \$\$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHENYL)-, TR | 152 | C10H18O |
| 2 | 943 | 918 | ISOPULEGONE \$\$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHENYL)-, TR | 152 | C10H18O |

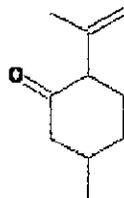
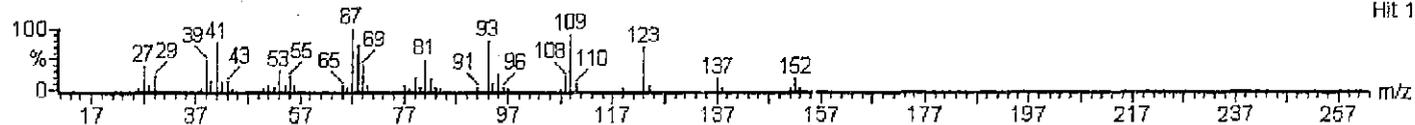
, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 4048 (20.517) Cm (4039:4058-4005:4022x1.200)

1.19e9



R:987 WILEY 38815: ISOPULEGONE \$\$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHENYL)-, TRANS- (CAS) \$\$\$ ISOPULEGONE Hit 1

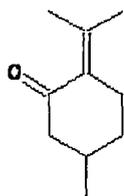
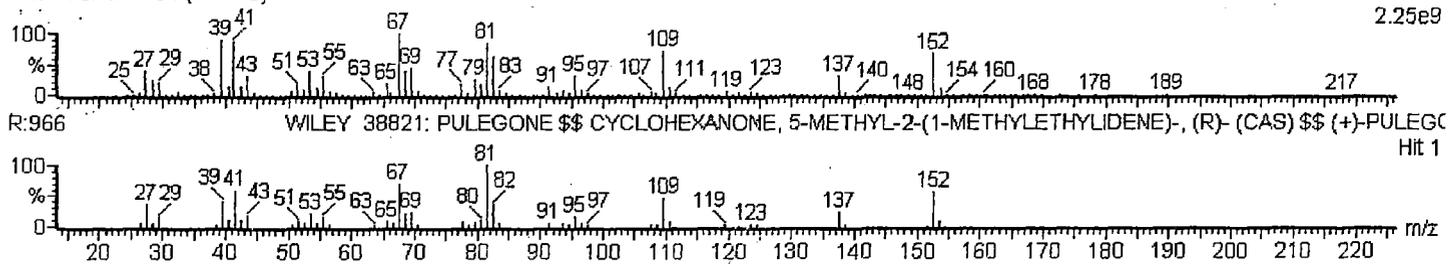


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 966 | 937 | PULEGONE \$\$ CYCLOHEXANONE, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYLIDENE)- (R | 152 | C10H18O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 4534 (22.968)

2.25e9



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|--------------------------------------|------|------------------------------------------------|
| 1 | 970 | 507 | 8-HYDROXY-DELTA-4(5)-P-MENTHEN-3-ONE | 168 | C ₁₀ H ₁₆ O ₂ |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

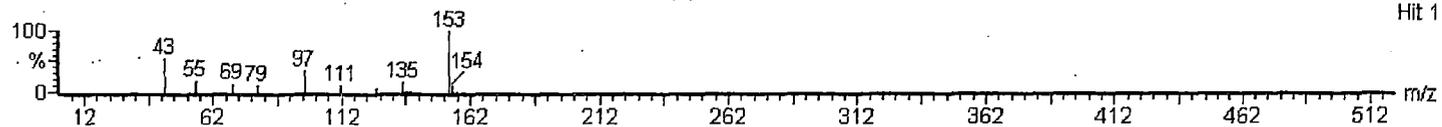
Muna-USAQ 4911 (24.875) Cm (4900:4920-4930:4941x1.200)



R:970

WILEY 55670: 8-HYDROXY-DELTA-4(5)-P-MENTHEN-3-ONE

Hit 1

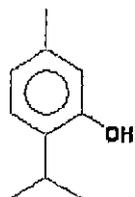
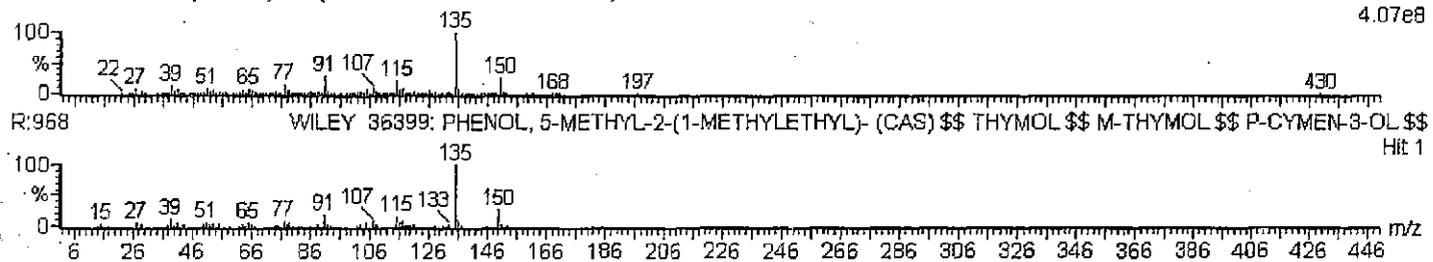


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-----------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 960 | 990 | PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) THYMOL M-THYMOL | 150 | C10H14O |
| 2 | 961 | 859 | PHENOL, 5-METHYL-2-(1-METHYLETHYL)- (CAS) THYMOL M-THYMOL | 150 | C10H14O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 4964 (25.142) Cm (4954:4978-4918:4937x1.200)

4.07e8

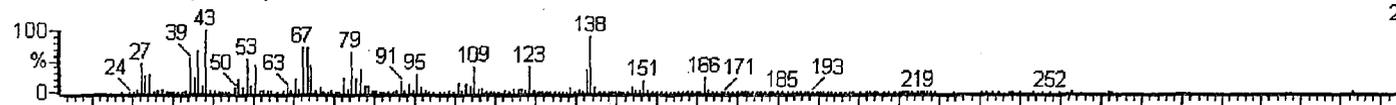


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|--------------------|------|------------------------------------------------|
| 1 | 936 | 883 | PIPERITENONE OXIDE | 166 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

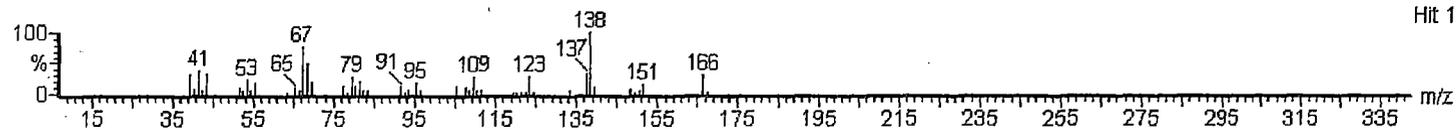
Muna-USAQ 5459 (27.639)

2.79e9



R:936 WILEY 53290: PIPERITENONE OXIDE

Hit 1

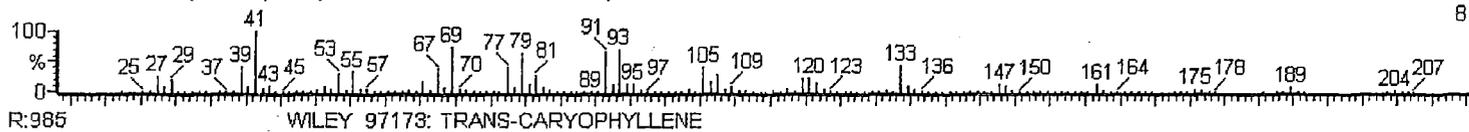


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------|------|---------------------------------|
| 1 | 985 | 952 | TRANS-CARYOPHYLLENE | 204 | C ₁₅ H ₂₄ |
| 2 | 981 | 967 | TRANS-CARYOPHYLLENE | 204 | C ₁₅ H ₂₄ |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 5851 (29.617) Cm (5845:5855-5808:5815x1.200)

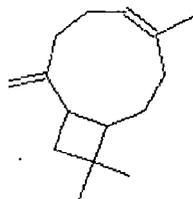
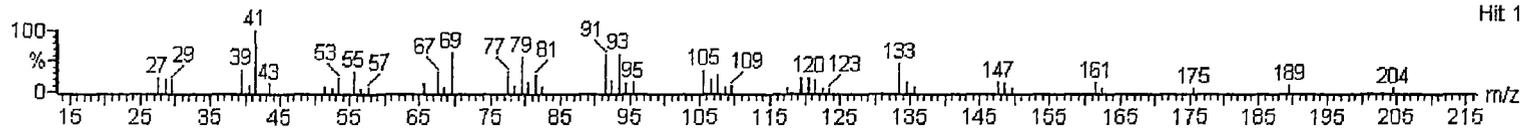
8.72e8



R:985

WILEY 97173: TRANS-CARYOPHYLLENE

Hit 1

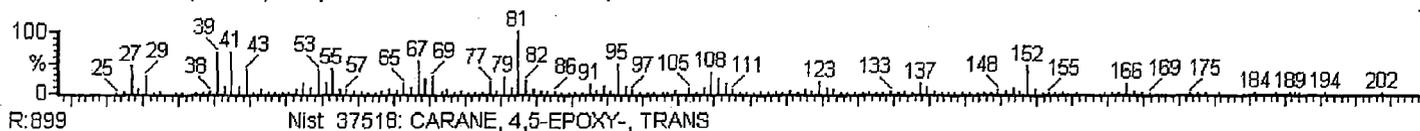


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------|------|---------|
| 1 | 888 | 001 | CARANE, 4,5-EPOXY-, TRANS | 152 | C10H16O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 5945 (30.091) Cm (5937:5951-5906:5922x1.200)

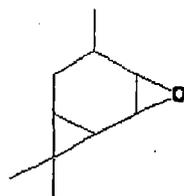
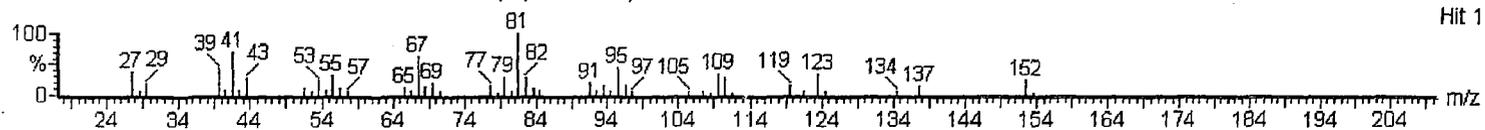
1.84e8



R:899

NIST 37518: CARANE, 4,5-EPOXY-, TRANS

Hit 1

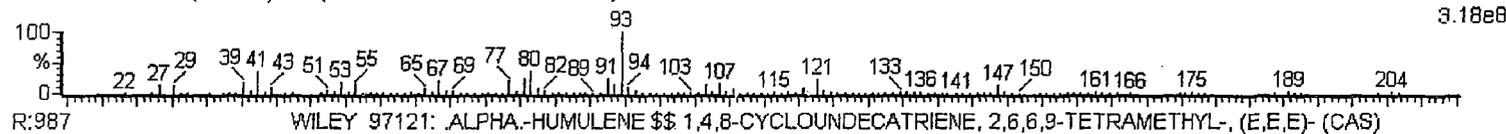


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-----------------------------------------------------------------|------|---------------------------------|
| 1 | 987 | 683 | ALPHA-HUMULENE \$ 1,4,8-CYCLOUNDECATRIENE, 2,6,6,9-TETRAMETHYL- | 204 | C ₁₅ H ₂₄ |

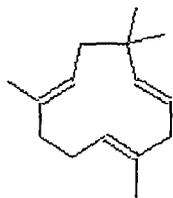
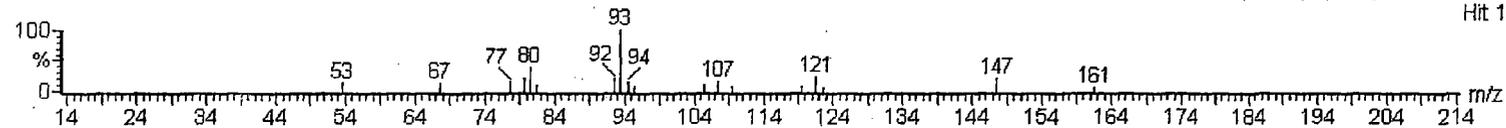
. 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 6078 (30.761) Cm (6074:6082-6056:6060x1.200)

3.18e8



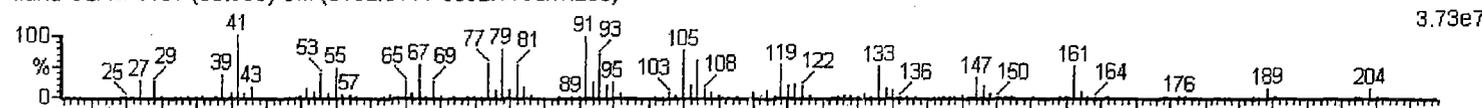
Hit 1



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-------------------|------|---------------------------------|
| 3 | 970 | 954 | ALLOAROMADENDRENE | 204 | C ₁₅ H ₂₄ |

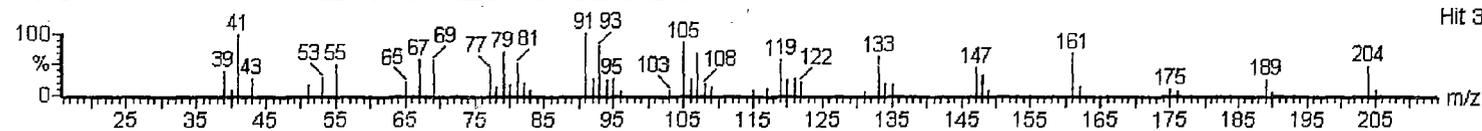
, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 6107 (30.908) Cm (6102:6111-6092:6096x1.200)

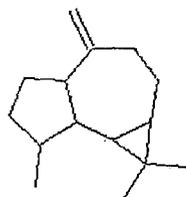


R:970

WILEY 97430: ALLOAROMADENDRENE



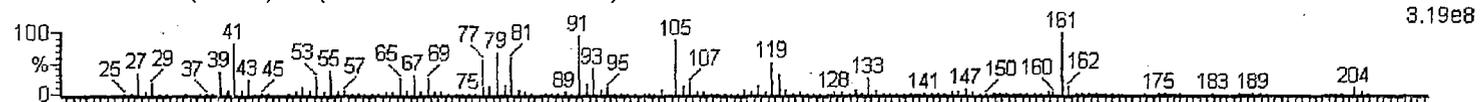
Hit 3



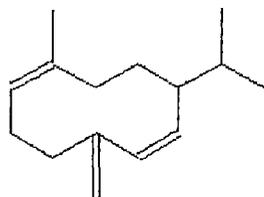
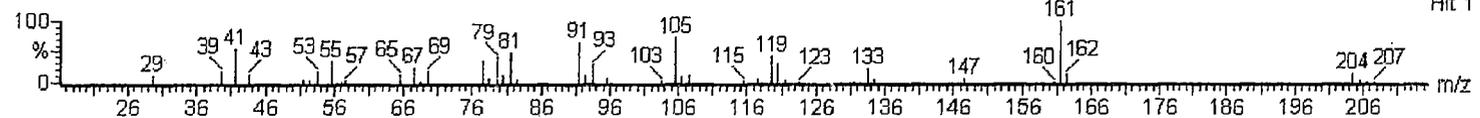
| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 978 | 935 | GERMACRENE D \$\$\$ 1,6-CYCLODECADIENE, 1-METHYL-5-METHYLENE-8-(1-M | 204 | C15H24 |
| 2 | 975 | 931 | GERMACRENE D \$\$\$ 1,6-CYCLODECADIENE, 1-METHYL-5-METHYLENE-8-(1-M | 204 | C15H24 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 6235 (31.553) Cm (6232:6240-6209:6216x1.200)



R:978 WILEY 97520: GERMACRENE D \$\$\$ 1,6-CYCLODECADIENE, 1-METHYL-5-METHYLENE-8-(1-METHYLETHYL)-, [S-(E,E)] Hit 1

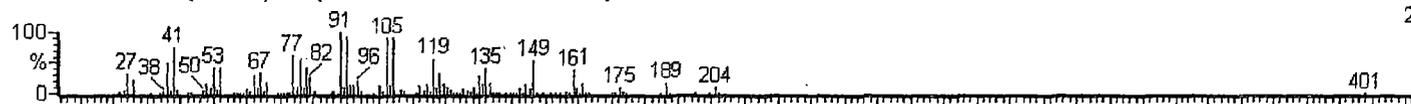


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|------------------------|------|---------|
| 1 | 994 | 497 | VALENCENE 2 | 204 | C15H24 |
| 2 | 993 | 510 | TRANS-GAMMA-BISABOLENE | 204 | C15H24 |
| 3 | 888 | 680 | LEDENE | 204 | C15H24 |
| 4 | 888 | 748 | LEDENE | 204 | C15H24 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 6297 (31.866) Cm (6289:6307-6274:6280x1.200)

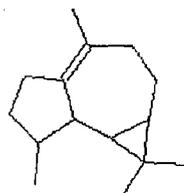
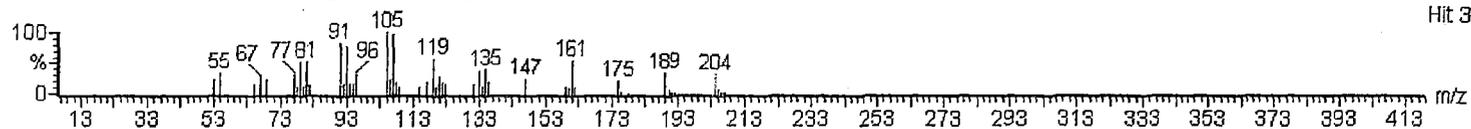
2.26e7



R:888

WILEY 97437: LEDENE

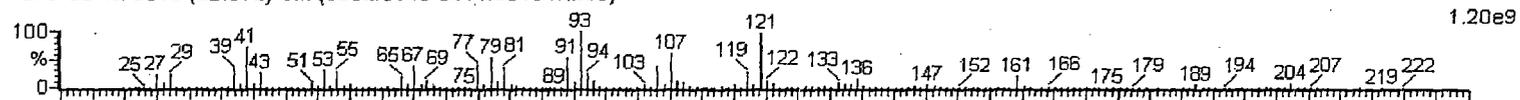
Hit 3



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-------------------|------|---------|
| 1 | 963 | 722 | BICYCLOGERMACRENE | 204 | C15H24 |
| 2 | 962 | 802 | BICYCLOGERMACRENE | 204 | C15H24 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

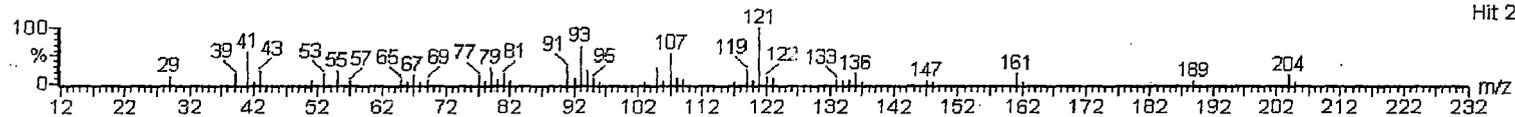
Muna-USAQ 6338 (32.072) Cm (6332:6345-6311:6318x1.200)



R:962

WILEY 97557: BICYCLOGERMACRENE

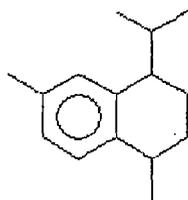
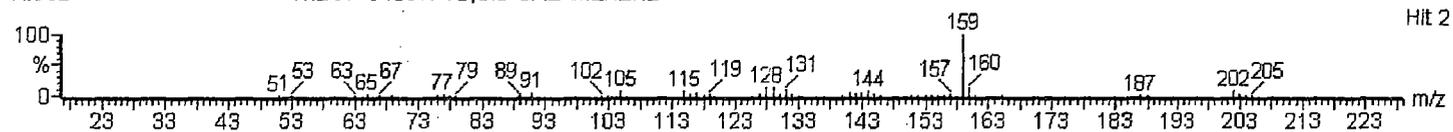
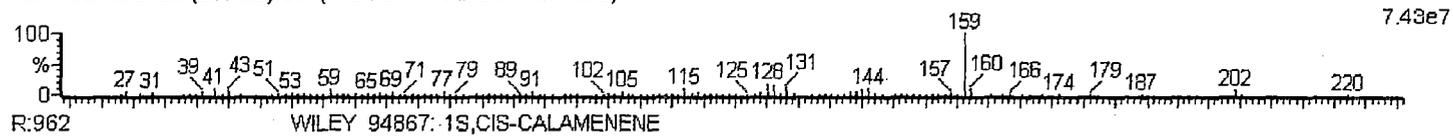
Hit 2



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------------------------------------------------------------|------|---------|
| 1 | 976 | 726 | TRANS-CALAMENENE | 202 | C15H22 |
| 2 | 962 | 824 | 1S,CIS-CALAMENENE | 202 | C15H22 |
| 3 | 982 | 811 | NAPHTHALENE, 1,2,3,4-TETRAHYDRO-1,6-DIMETHYL-4-(1-METHYLETHYL)-, (1 | 202 | C15H22 |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 6468 (32.728) Cm (6464:6472-6455:6457x1.200)

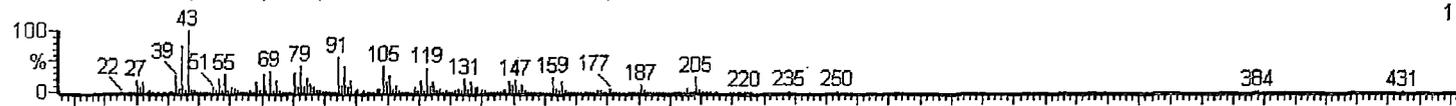


| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-----------------------|------|-----------------------------------|
| 1 | 980 | 946 | (+) SPATHULENOL | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O |
| 2 | 968 | 934 | (-) SPATHULENOL (CAS) | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

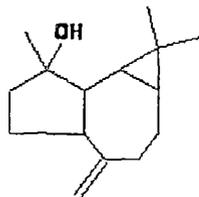
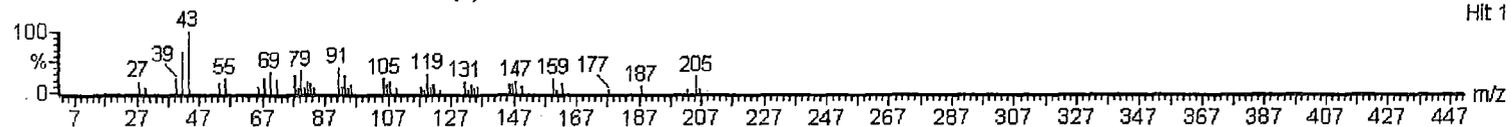
Muna-USAQ 6848 (34.644) Cm (6837:6855-6811:6821x1.200)

1.13e9



R:980 WILEY 117023: (+) SPATHULENOL

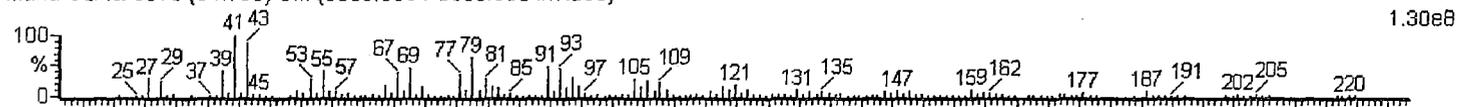
Hit 1



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|-------------------------|------|---------|
| 1 | 994 | 497 | (-)-CARYOPHYLLENE OXIDE | 220 | C15H24O |
| 2 | 994 | 632 | (-)-CARYOPHYLLENE OXIDE | 220 | C15H24O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

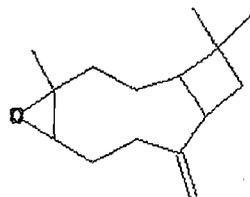
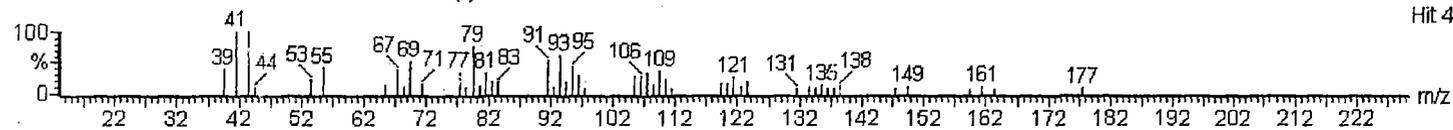
Muna-USAQ 6876 (34.786) Cm (6869:6884-6858:6864x1.200)



R:943

WILEY 117009: (-)-CARYOPHYLLENE OXIDE

Hit 4



| Hit | REV | for | Compound Name | M.W. | Formula |
|-----|-----|-----|---------------|------|-----------------------------------|
| 1 | 960 | 935 | ISOPATHULENOL | 220 | C ₁₅ H ₂₄ O |

, 16-Aug-2006 + 10:43:49

Muna-USAQ 7162 (36.228) Cm (7156:7168-7177:7187x1.200)

4.88e8

