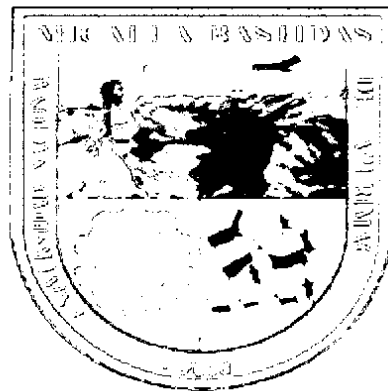


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE  
APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL  
ACEITE ESENCIAL DE MUÑA – MUÑA (*Satureja  
brevicalyx* Epling.) SOBRE TRES CEPAS  
BACTERIANAS”**

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

**SILVIA CÉCILIA TELLO ROJAS**

**Abancay, agosto del 2012**

**PERÚ**



| UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC |                       |
|---|-----------------------|
| CÓDIGO  | MFN                   |
| T<br>IAG<br>T<br>2012                             |                       |
| Ed. 2   | BIBLIOTECA<br>CENTRAL |
| FECHA DE INGRESO:                                 | 14 ENE 2013           |
| Nº DE INGRESO:                                    | 00310                 |



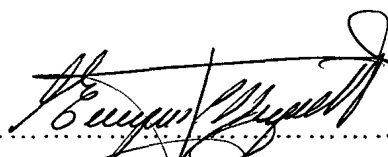
**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO  
DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA – MUÑA  
(*Satureja brevicalyx* Epling.) SOBRE TRES CEPAS  
BACTERIANAS”**

# UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

## FACULTAD DE INGENIERÍA

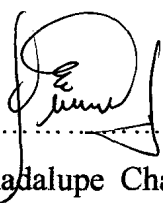
### ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Jurado calificador integrado por:



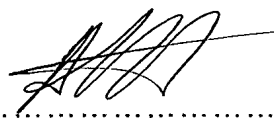
Ing. Enrique Mujica Paredes

Presidente



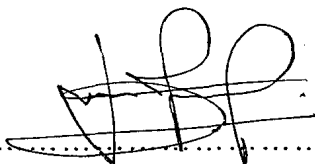
Msc. Ing. Guadalupe Chaquilla Quilca

Jurado



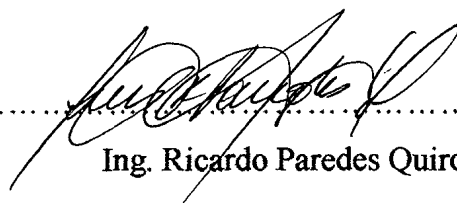
Ing. Alfredo Fernández Ayma

Jurado



Ing. Didí Juan Flores Cruz

Asesor



Ing. Ricardo Paredes Quiroz

Co - asesor



## *DEDICATORIA*

A dios por darme sabiduría; a mis padres y hermanos quienes me han apoyado en todo, por su inmenso cariño y apoyo incondicional; Doris, Carmen Guadalupe, que desde el cielo observa mi camino y que deben estar orgullosas de mis logros y a mis amigos por sus buenos consejos y enseñanzas.

## *AGRADECIMIENTOS*

A Dios por darme la sabiduría, el entendimiento para culminar mi mayor reto y la fortaleza para enfrentar cada día.

A mis padres y hermanos quienes me han apoyado en todo lo que he querido hacer en la vida, me han impulsado en los momentos en que he querido dar marcha atrás, a su inmenso cariño y apoyo incondicional. Por haber sufrido y reído conmigo.

A Doris, Carmen Guadalupe, que desde el cielo observa mi camino y que deben estar orgullosas de mis logros; siempre les tendré presente. A mis amigos por los buenos consejos y enseñanzas.

Al Dr. Carlos Shiva raymondi por su incondicional valiosa colaboración y orientación durante la ejecución del proyecto, dedicación y amistad; al Dr. Luis Jara, por su valioso apoyo prestado, docentes de la universidad Peruana Cayetano Heredia.

A los miembros del Jurado examinador y calificador: Presidente: Ing. Abel Mujica Paredes; miembros: Msc. Ing. Chaquilla Guadalupe; Ing. Alfredo Fernandez Ayma

Al Ing. Juan Didi Flores y al Ing. Luis Ricardo Paredes Por su valiosa asesoría y dedicación, docentes de la universidad de la Universidad Nacional Micaela Bastidas.

A la Q.F. Giovana, a la Dra. Rosario Rojas Quispe por su desinteresada colaboración en la obtención del aceite esencial de la planta medicinal docente de la universidad Peruana Cayetano Heredia.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de “muña – muña” *Satureja brevicalyx* epling obtenido de una de las Provincia de Apurímac. El cual se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua; posteriormente fue sometido a un análisis Fisicoquímico, así como a la determinación de su composición química por medio del Espectrómetro de masas acoplado a un Cromatógrafo de gases (EM/CG) e incorporado un detector de ionización de llama (FID).

La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar; resultando en orden de sensibilidad, para *Bacillus cereus* 21,67 mm; *Listeria monocytogenes* 17,67 mm y *Echerichia coli* 11,67mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CBM), se determinó por el método de dilución en microplacas y cultivo en placas, resultando para *Bacillus cereus* 1,563 µg/mL de CMI y 1,563 µg/mL de CBM, *Listeria monocytogenes* 0,781 µg/mL de CMI y 0,781 µg/mL de CBM y para *Echerichia coli* 1,563 µg/mL de CMI y 3,125 µg/mL de CBM. Se detectó presencia de fenoles, los que validan la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* epling.

Palabras claves: Aceite esencial de muña - muña, actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria (CIM), concentración mínima bactericida (CBM).

## ABSTRACT

The current monography have been purposed to determine chemical compounds by qualitative tests, as well as antibacterial activity of “muña – muña” *Satureja brevicalyx Epling* leaves essential oil, from Apurimac Department. The muña – muña leaves essential oil was obtained by Steam distillation. These essential oils were undergone to Physical-Chemistry analyses, as well as a Spectrophotometry Test by Mass Spectrometry joint to Gas Chromatography joint to detector of llamas ionization.

The antibacterial activity was determined by plate difution method, resulting in order of sensitivity, for *Bacillus Cereus* 21,67 mm; *Listeria Monocytogenes* 17,67 mm and *Echerichia coli* 11,67mm. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for were determined by the microplate dilution method and the utilization of plate cultivate method resulting in for *Bacillus Cereus* 1,563 µg/mL and CMI 1,563 µg/mL of CBM, *Listeria Monocytogenes* 0,781 µg/mL de CMI and 0,781 µg/mL of CBM and for *Echerichia coli* 1, µg/mL de CMI y 3,125 µg/mL of CBM. Was showed presence of phenols, which validate the antimicrobial activity of essential oil of *Satureja brevicalyx epling*.

**Key Word:** essential oils of the muña -muña, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

## TABLA DE CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| Dedicatoria   | i   |
| Agradecimientos   | ii  |
| Tabla de contenido  | iii |
| Índice de tablas  | iv  |
| Resumen   | v   |
| Abstract  | vi  |
| 1. INTRODUCCION   | 1   |
| 2. MARCO TEORICO  | 2   |
| 2.1.Descripción general de la muña – muña                                 | 3   |
| 2.2. <i>Satureja brevicalyx Epling</i> (muña – muña)                      | 3   |
| 2.3. Aceite esencial  | 5   |
| 2.3.1. Biogénesis de los aceites esenciales                               | 5   |
| 2.3.2. Ubicación de los aceites esenciales en las plantas                 | 6   |
| 2.3.3. Composición química del aceite esencial                            | 6   |
| 2.3.4. Factores que influyen la composición química                       | 11  |
| 2.3.5. Análisis y control de calidad del aceite esencial                  | 12  |
| 2.3.6. Tipos de aceites esenciales  | 13  |
| 2.4. Métodos de extracción de los aceites esenciales                      | 14  |
| 2.5.Análisis instrumental   | 16  |
| 2.5.1. Cromatografía de gases (GC)  | 16  |
| 2.5.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). | 17  |
| 2.5.3. Detector de ionización de llama (FID)                              | 17  |
| 2.6. Validación por organismos internacionales (NCCLS)                    | 17  |
| 2.7. Antimicrobianos  | 18  |
| 2.7.1. Principios Antimicrobianos Provenientes de Plantas                 | 19  |
| 2.8. Métodos de Evaluación Antimicrobiana                                 | 19  |
| 2.8.1. Método de Difusión en Agar   | 20  |
| 2.8.2. Evaluación de la Susceptibilidad Microbiana                        | 21  |
| 2.8.3. Método de Micro dilución en Caldo                                  | 22  |
| 2.8.3.1. Determinación de la CIM y CBM                                    | 22  |
| 2.9. Bacterias patógenas  | 23  |
| 2.9.1. <i>Listeria Monocytogenes</i>                                      | 24  |
| 2.9.2. <i>Echerichia E. coli</i>  | 25  |



|   |    |
|---|----|
| 2.9.3. <i>Bacillus cereus</i>                                     | 26 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL   | 27 |
| 3.1. Lugar de ejecución   | 27 |
| 3.2. Materiales y métodos para las pruebas de evaluación in vitro | 27 |
| 3.3. Material biológico   | 28 |
| 3.4. Actividad antimicrobiana por el método de difusión en discos | 29 |
| 3.4.1. Extracción del aceite esencial Muña – muña                 | 30 |
| 3.4.2. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial             | 30 |
| 3.4.3. Análisis cromatográfico del aceite esencial                | 30 |
| 3.4.4. Prueba de sensibilidad mediante el método de difusión      | 31 |
| 3.5. CIM mediante el método de dilución en microplacas            | 35 |
| 3.5.1. Procedimiento para el método de dilución en microplacas    | 36 |
| 3.5.2. Preparación de inóculos bacterianos y procedimiento        | 38 |
| 3.5.3. Concentración mínima inhibitoria (CBM )                    | 39 |
| 3.6. Concentración mínima bactericida (CIM)                       | 40 |
| 3.7. Diseño estadístico   | 41 |
| 3.7.1. Modelo de difusión en agar                                 | 42 |
| 3.7.2. Modelo estadístico para el método de difusión en agar      | 42 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES                                       | 43 |
| 4.1. Evaluación de efectos de los tratamientos                    | 46 |
| 4.2. Resultados del método de Difusión en Agar                    | 48 |
| 4.3. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CIM)      | 56 |
| 4.4. Resultados de la concentración mínima bactericida (CBM)      | 59 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES                                 | 62 |
| 5.1. Conclusiones   | 62 |
| 5.2. Recomendaciones  | 63 |
| 6. BIBLIOGRAFIA   | 64 |
| 7. ANEXOS   | 69 |



## INDICE DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Fig.1. Planta de Muña – Muña “ <i>Satureja brevicalyx Epling</i> ”        | 4   |
| Figura.2. Estructura química de monoterpenos y sesquiterpenos             | 8   |
| Figura.3. <i>Listeria Monocytogenes</i>                                   | 24  |
| Figura.4. <i>E. coli</i>  | 25  |
| Figura.5. <i>Bacillus Cereus</i>  | 26  |
| Figura.6. Reactivación de la cepa de <i>E. coli</i> en TSA                | 29  |
| Figura.7. Reactivación de la cepa de <i>Listeria Monocytogenes</i> en TSA | 29  |
| Figura.8. Esquema de la microplaca  | 40  |
| Figura.9.Obtención del aceite esencial                                    | 44  |
| Figura.9.1.Diagrama de dispersión por nivel de actividad antimicrobiana   | 48  |
| Figura.10. Promedio del halo de inhibición                                | 50  |
| Figura.11.Halo de inhibición de la <i>Listeria m</i>                      | 51  |
| Figura.12.Halos de inhibición de <i>Bacillus cereus</i>                   | 52  |
| Figura.13.Halos de inhibición de <i>E. coli</i>                           | 53  |
| Figura.14.Concentración mínima inhibitoria (CIM) de la <i>Listeria m</i>  | 56. |
| Figura.15.Concentración mínima inhibitoria (CIM) de la <i>E. Coli</i>     | 57  |
| Figura.16.Concentración mínima inhibitoria (CIM) de la <i>Bacillus C</i>  | 58. |
| Figura.17.Concentración mínima bactericida (CBM) de la <i>listeria m.</i> | 59  |
| Figura.18.Concentracion mínima bactericida (CBM) de <i>Bacillus c</i>     | 60. |
| Figura.19.Concentracion mínima bactericida (CBM) de <i>E. coli</i>        | 61  |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta                                    | 3  |
| Tabla 2. Composición química de la muña – muña                                    | 4  |
| Tabla 3. Grupos funcionales del aceite esencial                                   | 8  |
| Tabla 4. Parámetros utilizados en el control de calidad de los aceites esenciales | 12 |
| Tabla 5 Métodos más usados en la destilación de aceites                           | 14 |
| Tabla.6.Reactivación de cepas bacterianas   | 33 |
| Tabla.7.Reactivación de cepas bacterianas   | 38 |
| Tabla.8.Dosis utilizada como inhibidor del aceite esencial                        | 39 |
| Tabla.9.Valores de interpretación de datos en microplacas                         | 40 |
| Tabla.10. Formato de la evaluación del método de difusión                         | 41 |
| Tabla.11.Características fisicoquímicas del aceite esencial                       | 43 |
| Tabla.12.Componentes químicos del aceite esencial de muña - muña                  | 44 |
| Tabla.13.Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana                      | 46 |
| Tabla.14.Análisis de tukey  | 47 |
| Tabla.15.Promedio de halos de inhibición en mm                                    | 49 |
| Tabla.16. Halo de inhibición del aceite esencial de contra <i>Listeria m.</i>     | 54 |
| Tabla.17. Halo de inhibición del aceite esencial contra <i>Bacillus c.</i>        | 55 |
| Tabla.17. Halo de inhibición del aceite esencial contra <i>E. coli.</i>           | 55 |
| Tabla.18.CIM y CBM para el aceite esencial sobre las cepas patógenas              | 61 |



## 1. INTRODUCCION

El Perú es conocido como el tercer país mega biodiverso del mundo, siendo catalogado por algunos científicos como el segundo o primero, porque posee una extraordinaria riqueza biológica de fuente natural de moléculas bioactivas. La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones nos sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científica y tecnológicamente con los respectivos estudios.

En cuanto a plantas aromáticas nativas estas son numerosas, una de ellas es *satureja brevicalyx* conocido como “Muña – muña, inca muña”, de la que se reporta virtudes terapéuticas en enfermedades de las vías respiratorias y del aparato digestivo, además de cualidades como preservante de alimentos por su propiedad antimicrobiana. La presencia de microorganismos en alimentos mínima o parcialmente procesados conduce a buscar alternativas de inhibición mediante el uso de sustancias esenciales naturales que no sean perjudiciales para el consumidor mediante el uso de compuestos antimicrobianos en lugar de conservadores sintéticos

El problema que existe en la producción y la utilización de las plantas medicinales de muña - muña en el departamento de Apurímac es la falta de conocimiento de su transformación tecnológica para darle un valor agregado para rescatar el potencial del producto que es el aceite esencial de muña – muña y de su poder antimicrobiano que se deriva de terpenoides y compuestos fenólicos , los productores por falta de conocimiento no le dan un debido uso comercial de las plantas medicinales a causa de que los consumidores son pocos lo cual la comercialización y la transformación de esta planta ocasionaría el incremento de las ganancias de los pobladores y su valor agregado.

Ya que la muña - muña es un recurso no aprovechada por ser una planta silvestre que crece en zonas alto andinas en Apurímac, se desconoce las propiedades de la muña - muña y al extraer el aceite esencial que contiene

propiedades bioactivas para su posterior evaluación de la actividad antimicrobiana y la utilización de diferentes métodos de aplicación tanto cualitativo y cuantitativo dentro de ellas el método de difusión en agar que se utilizan discos de papel Whatman para conocer la actividad antimicrobiana y el otro método de microdilución donde se utiliza microplacas para determinar la concentración mínima del aceite esencial que va a inhibir a la bacteria con la finalidad de encontrar fuentes antibacteriales que esté al alcance en la aplicación de la industria.

Al determinar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de muña – muña contra tres cepas bacterianas se determinara la concentración mínima del aceite esencial capaz de inhibir a las bacterias y demostrar si realmente es bactericida o bacteriostático mediante la determinación de la concentración mínima bactericida.

Estos resultados evidencian la factibilidad de explotación y aplicación de la muña- muña y de sus aceites que podrían utilizarse como aditivos o conservadores, en cereales emboisados, en quesos y en alimentos parcialmente procesados, principalmente en alimentos o productos donde el olor y el sabor de la muña – muña no influyan negativamente en sus propiedades sensoriales. Los aceites también podrían utilizarse como desinfectantes industriales, quizá seguidos de un enjuague para eliminar los residuos del compuesto, los cuales podrían proporcionar alguna característica sensorial a los productos que entren en contacto con las superficies desinfectadas.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Descripción general de la muña - muña

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981), la especie se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

Tabla 1: Clasificación taxonómica

|                   |   |
|-------------------|---|
| DIVISIÓN          | Magnoliophyta   |
| CLASE             | Magnoliopsida   |
| SUB – CLASE       | Asteridae   |
| ORDEN             | Limiales  |
| FAMILIA           | Lamiaceae   |
| GÉNERO            | <i>Satureja</i>   |
| ESPECIE           | <i>Brevicalyx</i>   |
| NOMBRE CIENTIFICO | <i>Satureja brevicalyx</i> epling   |
| NOMBRE COMUN      | urqu muña, wayra muña, inca muña, orégano de los incas, salqa muña, sacha muña. |

Fuente: A. Cronquist, 1981

### 2.2. Muña – muña (*Satureja brevicalyx* epling)

Es una planta de porte arbustiva perennifolio, erguido de 1.0 - 1.5 m de altura, aromática y pubescente. Hojas muy pequeñas, espatuladas, sésiles, verticiladas y opuestas, de margen entero. Flores blancas, solitarias, axilares, tetrámeras, bilabiadas; cáliz gamosépalo; corola gamopétala; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano (Bandoni, 2002)

El género *Satureja* cuenta con unas 200 especies en el mundo, todas estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios de la Tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. *Satureja brevicalyx* es una especie endémica de las regiones alto andinas sureñas del Perú. La *Satureja brevicalyx* crece en la parte sur andina del Perú (Ayacucho, Apurímac, Cuzco y Puno), entre las altitudes de 3300 – 3800 msnm,

es de predilección por laderas de suelos areno-arcillosos y pedregosos (Carhuapoma, 2002).

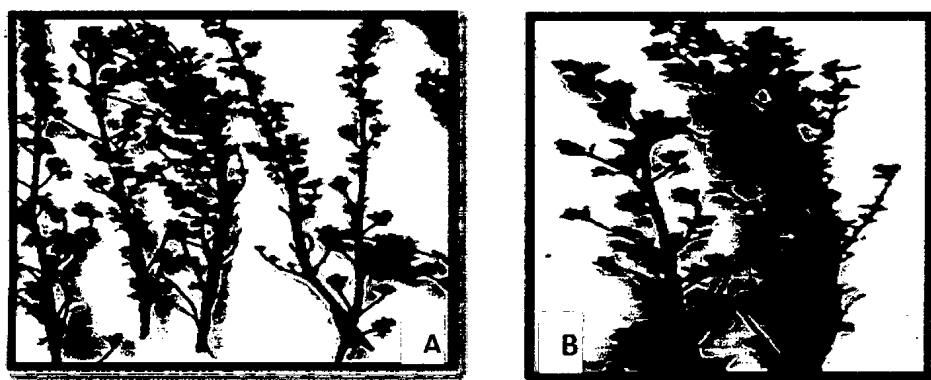


Figura 1: Plantas de Muña – Muña “*Satureja brevicalyx Epling*”(A, B)

Según informaciones etnobotánicas y etnofarmacológicas es usada para resolver problemas gastrointestinales y para la corrección de desordenes menstruales. Es digestivo, carminativo, contra la gastritis y antiespasmódica. También es usado como analgésico a partir de las hojas en caso de dolores musculares (Carhuapoma, 2002). En la tabla 2 se describe la composición química de la hoja de muña muña.

Tabla 2: Composición química de la muña – muña, en 100 gr. de parte comestible

| Componentes mayoritarios | Cantidad % | Componentes minoritarios | Cantidad µg |
|--------------------------|------------|--------------------------|-------------|
| Agua                     | 16         | Hierro                   | 22.40       |
| Proteínas                | 3.20       | Vitaminas                | _____       |
| Grasas                   | 2.80       | Retinol                  | 306         |
| Carbohidratos            | 66.30      | Tiamina                  | 0.35        |
| Fibras                   | 9.40       | Riboflavina              | 1.81        |
| Minerales                | _____      | Ac. Ascórbico            | 21.10       |
| Calcio                   | 2.24       | Otro componente          | _____       |
| Fósforo                  | 269        | Acidosdébiles            | 2.54        |

Fuente: Soto, 1999

### 2.3. Aceite esencial

Los términos aceite esencial o esencia son utilizados para referirse a las sustancias líquidas, aromáticas y volátiles de características lipofílicas, que se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas a través de métodos físicos, destilación con vapor, y que llevan en sí misma la huella, olor y sabor, del material vegetal del que proceden. Los aceites esenciales poseen una química compleja, aunque generalmente son mezclas de sustancias orgánicas químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos, dentro de ellos tenemos a los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos cetonas, ésteres, etc., la presión de vapor es suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente; son derivadas del metabolismo secundario de las plantas y asociadas o no a otros componentes (Duran, 2005)

Se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas, frutos y se les obtienen por destilación dependiendo del método y la condición del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua. Son líquidos solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua (Checira, *et al.*, 1992)

#### 2.3.1 Biogénesis de los aceites esenciales

En las plantas se presentan unas vías metabólicas particulares, no existentes en los animales, por las cuales se pueden producir cantidades grandes de compuestos de naturaleza química conocida, la mayoría de los cuales no tiene un rol específico aún bien conocido (Gomez, 2006). El conjunto de estas vías metabólicas se le conoce como metabolismo secundario. Cabe señalar, que los productos de este proceso de biosíntesis, en general, cumplen con las siguientes funciones:

- ❖ Tienen una distribución restringida
- ❖ No juegan rol en el metabolismo primario
- ❖ La principal función de algunos de ellos es la protección contra el ataque de insectos y patógenos

- ❖ Son atractivos de los animales para la polinización y la dispersión del fruto y de la semilla
- ❖ Se acumulan en grandes cantidades sin efectos negativos en las células o en las plantas.

### 2.3.2 Ubicación de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales se ubican en las diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, flores y frutos, así como también en diferentes órganos celulares (Duran, 2005). Es así como los aceites de menta y lavanda se localizan en pelos glandulares, mientras que el aceite de la pimienta se ubica en las células modificadas del parénquima. De igual forma, el aceite de rosa y jazmín se encuentra en las flores; el aceite de menta y eucalipto en las hojas; el alcanfor en los leños; el de los cítricos en los frutos; el aceite de almendras en las semillas y el aceite esencial de *Lippia alba* se encuentra principalmente en las hojas (fuertes, *et al.*, 2000).

### 2.3.3 Composición químicas de los aceites esenciales

Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

- A. No terpenoides: En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.
- B. Terpenoides: Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.


Los terpenos derivan de unidades de isopreno ( $C_5$ ) unidas en cadena. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos ( $C_{10}$ ), aunque también son comunes los sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) y los diterpenos ( $C_{20}$ ). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Sánchez *et al.*, 2005).

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- ❖ Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles (timol, carvacrol)
- ❖ Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor, thuyona)
- ❖ Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- ❖ Éteres (1,8 - cineol) y peróxidos (ascaridol)
- ❖ Hidrocarburos (limoneno,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno)

En la Tabla 3 se muestran los diferentes compuestos que se encuentran en el aceite esencial, los grupos funcionales de cada categoría y sus propiedades correspondientes como antimicrobiano antiséptico, etc.

Tabla 3: Grupos funcionales del aceite esencial

| Compuesto     | Grupo funcional   | Ejemplo                     | Propiedades   |
|---------------|---|-----------------------------|---|
| Alcohol       | $\begin{array}{c}   \\ -C-OH \\   \end{array}$                                      | Mentol, geraniol            | Antimicrobiano, antiséptico, tónico, espasmolítico          |
| Aldehído      | $\begin{array}{c} O \\    \\ R-C-H \end{array}$                                     | Citral, citronelal          | Espasmolítico, sedante, antiviral                           |
| Cetona        | $\begin{array}{c} O \\    \\ R_1-C-R_2 \end{array}$                                 | Alcanfor, tuyaona           | Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico                |
| Éster         | $\begin{array}{c} O \\ // \\ R_1-C \\ \backslash \\ O-R_2 \end{array}$              | Metil salicilato            | Espasmolítico, sedativo, antifúngico                        |
| Éteres        | -C - O - C -  | Cineol, ascaridol           | Expectorante, estimulante                                   |
| Éter fenólico | Anillo - O - C  | Safrol, anetol, miristicina | diurético, carminativo, estomacal, expectorante             |
| Fenol         |  | Timol, eugenol, carvacrol   | Antimicrobiano<br>Irritante<br>Estimulante inmunológico     |
| Hidrocarburo  | Sólo contiene C y H   | Pineno, limoneno            | Estimulante<br>descongestionante<br>antivírico, antitumoral |

Fuente: Checira, G, 1992

### 2.3.3.1 Hidrocarburos, Monoterpenicos y sesquiterpenicos

Son los compuestos más abundantes en los aceites esenciales, y precursores de los más complejos, que son los terpenos oxidados. Se denominan terminando en -eno (Fuentes, *et al.*, 2000)

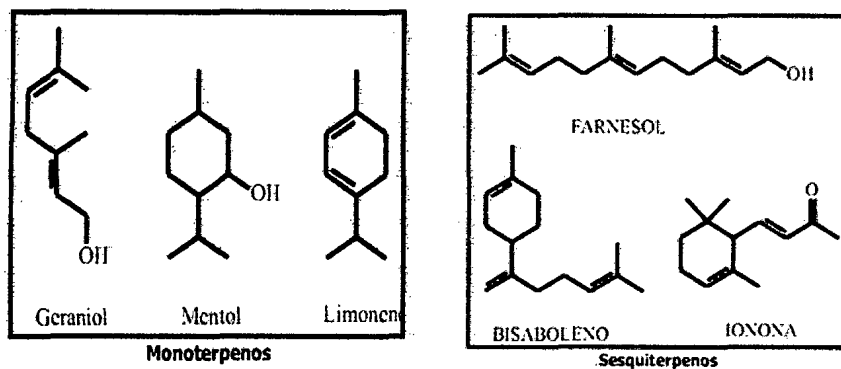


Figura 2: Estructura química de monoterpenos y sesquiterpenos

#### 2.3.3.1.1 Limoneno

Concretamente un carbono asimétrico. Por lo tanto existen dos isómeros ópticos: el d-limoneno y el l-limoneno. La nomenclatura IUPAC correcta es R-limoneno y S-limoneno, respectivamente, pero se emplean más los prefijos d y l.

Al tratarse de dos isómeros, sus olores son distintos ya que el d-limoneno huele a limón mientras que el l-limoneno huele a pino (Fuentes, *et al.*, 2000)

Por ejemplo el limoneno es el precursor de los principales componentes de la esencia de las mentas (*Mentha spp.*, *F. lamiaceae*), como carvona y mentol. El limoneno se encuentra también en cítricos y en el eneldo (Sánchez *et al.*, 2005).

#### 2.3.3.2 Alcoholes

Los alcoholes llevan el grupo hidroxilo (-OH) unido al esqueleto C<sub>10</sub>. Se denominan terminados en (-ol). Son muy apreciados por su aroma (Sánchez *et al.*, 2005).

### 2.3.3.2.1 Linalool

Es un terpeno con un grupo alcohol cuya forma natural es común en muchas flores y plantas aromáticas. Su olor floral con un toque mentolado le ha conferido cierto valor para su uso en productos aromáticos (Martínez, 2006).

Por ejemplo, el linalool, que tiene dos formas, el R - linalool se encuentra en la rosa y la lavanda y es el componente mayoritario de la *Mentha arvensis*. La forma S-linalool en el aceite de lavanda con un contenido > 5% indica adulteración (Martínez, 2006).

El linalool le da el sabor a las hojas de té, el tomillo y el cardamomo. Otro compuesto de este grupo, el mentol, es uno de los responsables del sabor y el olor de la menta, cuya esencia puede tener hasta un 50% de este componente (Martínez, 2006).

### 2.3.3.3 Aldehídos

Los aldehídos son compuestos muy reactivos. Se nombran acabados en (- al). Muchos de ellos, por ejemplo los encontrados en los cítricos, se corresponden con su respectivo alcohol, por ejemplo, geraniol – geranial o citronelol – citronelal (Segovia, *et al.*, 2010)

Son abundantes en los cítricos, responsables del olor característico, principalmente los isómeros geranial ( $\alpha$  citral) y neral ( $\beta$  citral) juntos conocidos como citral. Este compuesto, además de su aroma característico, tiene propiedades antivirales, antimicrobianas y sedantes. Pero muchos de ellos, incluido el citral, son irritantes para la piel por lo que no se puede hacer uso tópico de ellos (Segovia, *et al.*, 2010)

Otro grupo importante son los aldehídos aromáticos, como el benzaldehído, componente principal del aceite de almendras amargas y responsable de su aroma característico (Segovia, *et al.*, 2010).

#### 2.3.3.4 Fenoles

Sólo se encuentran en unas pocas especies pero son muy potentes e irritantes. Los más importantes son el timol y el carvacrol, que se encuentran en los tomillos (*G. Thymus*) y oréganos (*G. Origanum*), ambos de la Fam. *Labiatae*. Otro fenol muy importante es el eugenol, que se encuentra en muchas especies, por ejemplo en la esencia de clavo. Es un potente bactericida, así como anestésico, y se emplea en odontología (Segovia, *et al.*, 2010).

#### 2.3.3.5 Éteres fenólicos

Son los componentes principales de especias como el apio y el perejil (apiol), anís (anetol), albahaca (metilchavicol) y estragón (estragol). El safrol es un componente muy empleado en perfumería que se encuentra en la corteza del árbol del sasafrás (*Sassafras albidum*, *F. lauraceae*) (Segovia, *et al.*, 2010).

#### 2.3.3.6 Cetonas

Se producen por la oxidación de alcoholes y son moléculas bastante estables. Terminan en –ona. La carvona está presente en la *Mentha spicata*. La tuyona (aislada por primera vez en la Tuya, *Thuja occidentalis*, *F. cupressaceae*) y pulegona son bastante tóxicas y nunca deben usarse en el embarazo. La tuyona se encuentra en plantas como el género *Artemisia* (*Artemisia absinthium*, con la cual se hace el vermouth y la absenta), y en la salvia (*S.officinalis*). La pulegona se aisló por primera vez en el poleo (*Mentha pulegium*) (Martinez, 2006).

#### 2.3.3.7 Éteres

Los éteres u óxidos monoterpénicos son reactivos e inestables. Un ejemplo es el óxido de bisabolol presente en la manzanilla (*Matricaria chamomilla*).

Otro muy común es el 1,8 – cineol (también llamado eucaliptol), que es el componente principal del aceite de eucalipto. Es expectorante y mucolítico y el componente principal de medicamentos para la tos. El aceite de eucalipto varía en aroma según el contenido en 1,8 – cineol. El aceite rico en este componente

(*Eucaliptus globulus*, *F. myrtaceae*) se emplea más para uso medicinal, mientras que el de contenido más bajo (por ejemplo *E. radiata*) se emplea para aromaterapia (Sánchez *et al.*, 2005).

#### 2.3.3.8 Ésteres

La mayoría de los éteres se forman por reacción de un alcohol terpénico con ácido acético. Su aroma caracteriza a los aceites en los que se encuentran. Por ejemplo, el aceite de lavanda contiene linalol y su éster, acetato de linalilo. La abundancia relativa de estos dos compuestos es un indicador de buena calidad (Sánchez *et al.*, 2005).

El salicilato de metilo, derivado del ácido salicílico y metanol, es un compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina que se encuentra en un tipo de brezo (*Gaultheria procumbens*, *F. Ericaceae*), y se emplea tópicamente en linimentos (Segovia, *et al.*, 2010)

#### 2.3.3.9 Eucaliptol

El eucaliptol (1,8-cineol) se obtiene de las hojas de las diversas especies de eucalipto. Líquido miscible con alcohol, su olor varía entre el de la menta y el de la trementina. Se utiliza en perfumería, medicina y para la flotación de minerales. Se encuentra en muchos productos, ungüentos y linimentos, cremas, inhaladores para aliviar la congestión nasal, medicamentos para el dolor en encías, boca y garganta y enjuagues bucales (Fuentes, *et al.*, 2000).

#### 2.3.4 Factores que influyen sobre la composición química

Existen diferentes factores que influyen sobre la composición química de un aceite esencial entre ellos se pueden destacar los siguientes:

- ❖ Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad
- ❖ Método del cultivo: fertilizantes, abonos y pesticidas
- ❖ Época de recolección y parte de la planta

- ❖ Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento pos cosecha
- ❖ Modo de obtención del aceite: destilación (hidrodestilación, arrastre con vapor, solventes, fluido supercrítico)
- ❖ Edad de la planta y su estado fenológico.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la modificación de la composición de los aceites esenciales, está relacionado con el momento oportuno para comenzar la cosecha del material vegetal, ya que existe un momento óptimo en cada órgano de la planta para una acumulación máxima de principios activos, que son función de su estado fenológico, y también puede deberse a variaciones durante el día (Zekaria, 2007)

### **2.3.5 Análisis y control de calidad de los aceites esenciales**

Dentro de todos los niveles de la cadena productiva de aceites esenciales, el primer control que se realiza, es el de los parámetros organolépticos. Esta prueba se realiza para saber si el aceite esencial presenta adulteración, la dilución, aunque en otros casos, el comprador puede exigir un análisis químico con el fin de saber la proporción en la cual se encuentran sus componentes principales, o en el peor de los casos, exigirle a la empresa certificaciones en BPM, ISO.

En la Tabla 4, se observan los parámetros que más se utilizan para el control de calidad de los aceites esenciales como las características organolépticas, determinación física característica cromatografía y espectrofotométrica.



Tabla 4: Parámetros utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Características organolépticas   | Olor<br>Color<br>Apariencia<br>Textura  |
| Determinación físicas            | Densidad<br>Miscibilidad en etanol<br>Índice de refracción<br>Rango de destilación                |
| Índices químicos                 | Índice de refracción<br>Determinación de aldehídos y cetonas                                      |
| Características cromatográficas  | Cuantificación de los componentes principales<br>Análisis por cromatografía de gases (GC – MS,GC) |
| Características espectroscópicas | Ultravioleta<br>Infrarrojo  |

Fuente: Checira, G, 1992

#### 2.3.5.1 Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia transparente, mide la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en la sustancia. Se usa para la identificación y determinación de la pureza de un compuesto y para el análisis de la composición de mezclas binarias homogéneas de constituyentes conocidos (AOAC, 1990). Esta propiedad sirve para controlar la pureza del aceite esencial, que tienen un índice de refracción característico y, para ello se exige su medición según la norma ISO 280:1998.

#### 2.3.5.2 Solubilidad

Los aceites se disuelven bien en solventes orgánicos tales como benceno, pentano, éter de petróleo, etc. En cambio, se obtienen grandes diferencias de su solubilidad en alcohol de 70 – 90%. Si bien los aceites esenciales son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias (AOAC, 1990). La norma internacional que rige esta determinación es ISO 875:1999.

### 2.3.5.3 Densidad

La determinación de la densidad permite algunas veces deducir acerca de la composición de los aceites. Los aceites esenciales que tienen densidades mayores de  $1,0 \text{ g/cm}^3$ , contienen principalmente, fenoles o sus derivados y ésteres, los de densidad más baja son ricos en hidrocarburos monoterpénicos (AOAC, 1990). La densidad se mide de acuerdo con la norma ISO 279:1998.

### 2.3.6 Tipos de aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden ser clasificados de la siguiente manera.

- ❖ **Aceites esenciales crudos:** son directamente aislados de la planta, sin procesamiento adicional alguno y se utilizan como materia prima para velas, artículos de aseo y limpieza, insecticidas, etc.
- ❖ **Aceites esenciales refinados:** tienen el mayor valor agregado y se utilizan en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y de perfumes.

## 2.4 Métodos de extracción de los aceites esenciales

La destilación es el principal método para extraer los aceites esenciales de las plantas aromáticas, puede ser directo o con vapor de agua. La elección del método depende de la cantidad o características del aceite (volatilidad, punto de ebullición de los componentes, etc), como de la planta o su parte de la cual se va a extraer el aceite esencial (Vargas y Bottia, 2008).

Dentro de las prácticas existen tres métodos que son los más utilizados tanto a nivel industrial, como de laboratorio y dependen del grado de contacto entre el material vegetal y el agua, estos son: La hidrodestilación, destilación con agua/vapor y destilación por arrastre con vapor. En la Tabla 5, se muestra una descripción general de estos métodos de extracción (Vargas y Bottia, 2008).

Tabla 5: Descripción general de los métodos más usados en la destilación de aceites.

| Método de destilación                          | Descripción   |
|--|---|
| Destilación con agua:<br>(hidro - destilación) | Es el método de destilación más simple y relativamente económico. El material es inmerso en agua y puesto a hervir. El vapor y aceite se condensan y se separan del agua. Este método es apropiado para plantas finamente pulverizadas. El inconveniente es que los compuestos pueden sufrir hidrólisis durante la destilación. |
| Destilación con agua y vapor                   | Similar a la destilación con agua, sólo que el material vegetal no necesita ser pulverizado o picado, y es mantenido sobre una criba perforada, que lo separa del agua. Este método es ligeramente más costoso que el anterior.   |
| Destilación por arrastre con vapor             | Este método utiliza vapor seco para extraer el aceite. Es más caro que los dos anteriores. Es apropiado para plantas con aceites que tienen compuestos con puntos de ebullición muy alto. La calidad del aceite obtenido es buena.  |

Fuente: Stashenko, et al. 1998

#### 2.4.1 Hidrodestilación (HD)

El principio del método es llevar el agua hasta su punto de ebullición, la cual está en contacto directo con el material vegetal, de tal forma que los vapores generados atraviesen los tejidos de la planta, arrastrando las sustancias de interés (Stashenko, *et al.*, 1998).

Los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación presentan olores fuertes y colores más oscuros, en comparación con los producidos por otros métodos. Podrán resultar de menor calidad, ya que algunos componentes, como los ésteres, pueden experimentar la hidrólisis, algunos hidrocarburos monoterpénicos o aldehídos son susceptibles a la polimerización. Los compuestos oxigenados, fenoles, tienden a ser algo solubles en agua (Stashenko, *et al.*, 1998)

## **2.4.2 Destilación con agua/vapor**

El material vegetal se coloca sobre un fondo perforado o criba, la cual está ubicada a cierta distancia del fondo de un tanque llamado retorta. La parte más baja contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El principio de la destilación con agua/vapor es llevar el agua a su estado de ebullición, en donde el vapor generado atraviesa el material vegetal, arrastrando los metabolitos secundarios volátiles, de tal manera, que todos los vapores generados puedan ser luego condensados y recolectados. El tiempo total de destilación es función de la naturaleza de los componentes presentes en el aceite esencial. Si el aceite contiene compuestos con puntos de ebullición altos, el tiempo de destilación es muy largo (Stashenko, *et al.*, 1998).

## **2.4.3 Destilación por arrastre con vapor**

Es el método más usado a nivel industrial y de laboratorio, permite obtener el aceite esencial con buen rendimiento, y además, se puede procesar grandes cantidades de material vegetal. El proceso consiste en hacer pasar vapor de agua por un recipiente que contiene el material vegetal. El vapor de agua extrae la esencia de la planta y se forma una mezcla gaseosa homogénea. Al salir del recipiente, a una presión controlada, el vapor de agua enriquecido con aceites esenciales se enfría en un condensador donde regresa a la fase líquida. Estos dos líquidos (agua y aceite), finalmente, son separados gracias a sus diferencias de densidad, en un decantador o vaso Florentino. Algunas de las ventajas que presenta este método es que no requiere el uso de equipos muy sofisticado (Stashenko, *et al.*, 1998).

## **2.5 Análisis instrumental**

### **2.5.1 Cromatografía de gases (GC)**

Es la técnica más importante para el estudio de los aceites esenciales. La cromatografía, es un método físico de separación de mezclas complejas, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria (sólida o líquida) y otra es la móvil (gas N<sub>2</sub>, He, H<sub>2</sub>). La

columna se encuentra localizada dentro del horno, se usa la temperatura constante o programada. En la entrada, la columna está conectada a un inyector, en donde se introduce una porción de la muestra a analizar. La muestra entra en la columna y los analitos pasan a través de ella a diferentes velocidades, emergiendo a distintos tiempos, de acuerdo estrictamente con su temperatura de ebullición, cuando la fase estacionaria es apolar. La cromatografía de gases separa los compuestos de una mezcla, pero para su identificación se hace necesario implementar otras técnicas espectroscópicas como son la espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopía infrarroja (IR), etc (Stashenko, *et al.*, 1998).

El tiempo de retención no es un parámetro absolutamente confiable para el análisis cualitativo de componentes, ya que depende de muchas variables, tipo de columna, temperatura, flujo del gas de arrastre, cantidad de muestra inyectada, etc. Por este motivo, se hizo necesaria la aplicación de un sistema de índices de retención, propuesto por Kováts, que sirve para la identificación cualitativa. Este sistema se basa en la comparación de la posición del pico del compuesto de interés, con la de los picos correspondientes a los hidrocarburos patrón, uno, que eluye antes y, otro, después del analito (Salmon, 1983).

### **2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).**

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas, permite hacer un análisis rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas. Este sistema de GC-MS consta de tres bloques: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y un sistema de datos (Stashenko, *et al.*, 1998).

### **2.5.3 Detector de ionización de llama (FID)**

En cromatografía de gases, el detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más extensamente utilizado y, por lo general, uno de los más aplicables. En un quemador, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente (Palacios, *et al.*, 2004).

El detector de ionización de llama debido a que es un detector que responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es un detector sensible a la masa, más que un sistema sensible a la concentración. En consecuencia, este detector tiene la ventaja de que los cambios en el caudal de la fase móvil tienen poco efecto sobre la respuesta del detector (Palacios *et al.*, 2004).

## **2.6 Validación por organismos internacionales**

Se han desarrollado muchos métodos específicamente para determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El beneficio de basar los nuevos métodos en los ya existentes como los ensayos convencionales del “National Committee for Clinical and Laboratory Standards” (NCCLS), es que los nuevos ensayos tenderán a ser más fácilmente aceptados por cuerpos regulatorios (NCCLS, 2005).

El NCCLS se encarga de determinar y en su caso mejorar, la calidad de los resultados de laboratorio identificando la necesidad, prioridad y manejo del desarrollo de los protocolos y guías en los laboratorios clínicos y manufactureros para que estos puedan caracterizar y mejorar los sistemas analíticos. Además, los métodos del NCCLS se han diseñado específicamente para asegurar la actividad de los componentes antimicrobianos, y los factores que afecten la reproducibilidad se han investigado exhaustivamente. Aun cuando los métodos del NCCLS se han desarrollado para agentes antimicrobianos convencionales, se pueden hacer modificaciones menores para que estos métodos puedan ser usados para probar la efectividad de aceites esenciales y extractos vegetales (NCCLS, 2005).

## **2.7 Antimicrobianos**

Desde el siglo XVIII se ha empleado sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas y se acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano, llamadas antibióticos, de ahí surgió la penicilina, estreptomina, gentamicina, itraconazol, etc. Las cuales también han sido obtenidas sintéticamente, a través de modificación química, total o parcial de las moléculas por biosíntesis (Stella, *et al.*, 2005).

El ataque a los microorganismos, por parte de los antimicrobianos, se puede dar de diferentes maneras: por inhibición de la síntesis de la pared celular, de las funciones de la membrana celular, de la traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos (Gómez, 2008)

Los antibióticos son productos metabólicos naturales de hongos, bacterias o actinomicetos, capaces de impedir el crecimiento o destruir microorganismos, estas sustancias pueden actuar de dos maneras:

- ❖ Como microbicidas, es decir, que matan las formas vegetativas de los gérmenes, especialmente se denominan bactericidas, refiriéndose a bacterias y fungicidas refiriéndose a hongos.
- ❖ Como microbiostático, es decir que inhibe el crecimiento de microorganismos y se denominará bacteriostático o fungistático, según se refiere a bacterias o a hongos respectivamente.

Muchos de los antibióticos tienen considerables inconvenientes, bien sea por poseer un limitado espectro antimicrobiano, serios efectos colaterales, o por la resistencia de muchas bacterias y hongos a los agentes quimioterapéuticos actualmente utilizados. Estos factores estimulan a la búsqueda de nuevos principios activos, que sean efectivos frente a infecciones clínicas causadas por microorganismos Gram negativos, Gram positivos, hongos, virus y mico bacterias (Stella, *et al.*, 2005).

### **2.7.1 Principios Antimicrobianos Provenientes de Plantas**

Los mecanismos por los cuales las plantas pueden conseguir la destrucción o inhibición de los microorganismos pueden ser atribuidos a los metabolitos

antimicrobianos que pueden actuar en alguno de los siguientes puntos: impidiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o bien alterando la membrana celular bacteriana sobre la que actúan (Perez, 2006).

Por ejemplo, los taninos precipitan las proteínas, fenómeno que, al ocurrir en la membrana citoplasmática bacteriana, altera la permeabilidad de la misma y, por lo tanto, el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho conllevando esto a la muerte célula (Guisa, *et al.*, 2007).

Los compuestos esteroidales pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química: los de naturaleza hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Hemmer, *et al.*, 1988).

## 2.8 Métodos de Evaluación Antimicrobiana

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a sustancias con potencial antimicrobiano determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro* (Hemmer, *et al.*, 1988)

Factores como la composición y el pH del medio, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo y los microorganismos

utilizados en la prueba pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales (Guisa, *et al.*, 2007)

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: Tamizaje y concentración mínima inhibitoria. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo procedimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Se evalúa si hubo crecimiento, una completa supresión del crecimiento es requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados, para evitar confusiones en la interpretación de resultados provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas. Adicionalmente, para los casos en los que hubo crecimiento es posible evaluar de nuevo la actividad a distintas concentraciones (NCCL, 2005).

Generalmente, la medición de la actividad antimicrobiana se realiza por medio del método de difusión o el método de dilución. La selección del método depende de las necesidades del investigador, las cuales han hecho que los métodos sufran modificaciones con el fin de optimizar las técnicas empleadas y por consiguiente obtener resultados confiables (Hemmer, *et al.*, 1988)

### **2.8.1 Método de Difusión en Agar**

Este se basa en el procedimiento descrito por Bauer - Kirby y permite estimar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos (Bauer *etal.*1966). Se utiliza un disco, agujero o cilindro como reservorio en el agar, luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor del reservorio (Segovia, *et al.*, 2010)

El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semi – cuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente antimicrobiano. Este método es frecuentemente utilizado en investigación, pero

tiene la desventaja de ser poco creíble en casos en los cuales la muestra se difunde con dificultad en el medio debido a la inexistente relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana (Bauer, *et al.*, 1966).

Este método no requiere dispersión homogénea en agua del extracto a evaluar, la cantidad de muestra utilizada en el tamizaje es pequeña y permite probar cinco a seis compuestos contra varios organismos, además es el más conveniente para el tamizaje preliminar de sustancias puras (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.) (Bauer, *et al.*, 1966). Los resultados se evalúan de la siguiente manera:

- ❖ Ausencia del halo alrededor del pocillo o reservorio: actividad negativa. Presencia del halo de inhibición alrededor del pocillo o reservorio: actividad positiva. Luego, el resultado obtenido, se compara con los resultados en los métodos de dilución.

### **2.8.2 Evaluación de la Susceptibilidad Microbiana**

Para demostrar la susceptibilidad que tienen los microorganismos a diversos aceites esenciales Duraffourd y col. realizaron estudios estadísticos determinando tablas de actividad antimicrobiana basada en porcentajes. Estos consideran la actividad de los aceites esenciales en función al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (HICB):

- ❖ Nula (-), para un diámetro inferior a 8 mm.
- ❖ Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- ❖ Medio (muy sensible =++) para un diámetro entre 14 y 20m.

Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++)

### 2.8.3 Método de Micro dilución en Caldo

Mediante éste método se puede determinar la inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba, en presencia de concentraciones decrecientes de los extractos y aceites esenciales, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo). Estos se han venido usando para la determinación de las concentraciones de extractos de plantas, aceites esenciales o sustancias puras, así como para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana (ICMSF, 2000).

Es un técnica en la que se prueba una suspensión normalizada de bacterias frente a varias concentraciones del extracto a ensayar (normalmente mediante diluciones seriadas que reducen la concentración a la mitad) en un medio liquido estandarizado. El método se puede realizar en placas de microtitulación (Microdilución). Una placa puede contener de 7 a 8 o de 12 a 6 diluciones seriadas del extracto incluyendo en la microplaca los controles: de inhibición (caldo + aceite esencial), el control de esterilidad (caldo + DMSO) y finalmente el control de crecimiento (caldo + bacterias). Después del período de incubación se examinan los cultivos visualmente o turbidimétricamente y se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento del microorganismo (ICMSF, 2000).

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible (Segovia, *et al.*, 2010). Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y de procesar una gran cantidad de muestras; además ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales (ICMSF, 1998).

### 2.8.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de posibles componentes antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). La concentración mínima inhibitoria (CIM) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. (Yarseni, 2005).

Un agente antimicrobiano es un agente químico que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los agentes bactericidas son aquellas que matan a las bacterias mientras que los agentes bacteriostáticos son aquellos que inhiben el crecimiento bacteriano. Estos agentes pueden variar según su toxicidad selectiva, teniendo unos efectos similares sobre todo los tipos de célula y otros son selectivos y tóxicos para el microorganismo (Yarseni, 2005).

## 2.9 Bacterias patógenas

### 2.9.1 *Listeria monocytogenes*

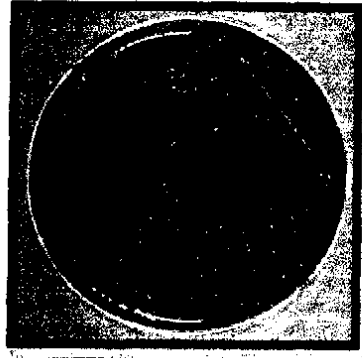
El género *Listeria* se divide en seis especies (*Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, y *Listeria grayi*), donde sólo *Listeria monocytogenes* es patógena para el hombre (Roccourt y Cossart, 1997). Es una bacteria Gram positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1°C y 45 °C con un óptimo a 37 °C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, lo cual le diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4, crece en presencia de un 10% de NaCl y sobrevive a un 16 a 20% (ICMSF, 2000). Se encuentra ampliamente distribuida tanto en el ambiente terrestre (suelo, plantas, ensilaje,

materia fecal, aguas residuales), en el ambiente acuícola y también en lugares donde se procesan alimentos. En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación, entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes (Guisa, *et al.*, 2007)

El patógeno a pesar de no formar endosporas es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras de alimentos y al interior de los refrigeradores domésticos. *Listeria monocytogenes* es un residente intestinal temporal en el ser humano ya que el 5% al 10% de la población en algún momento es portadora, sin presentar los síntomas. *Listeria monocytogenes* ha sido aislada de alimentos sin procesar como leche, carne y vegetales y de alimentos procesados como quesos suaves, helado, mantequilla, carne cruda, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos listos para el consumo, los que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los contaminados post procesamiento térmico (ICMSF, 2000).

#### **2.9.1.1 *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria**

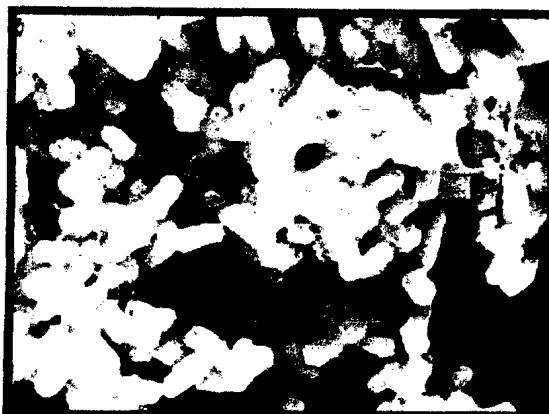
La presencia del patógeno en materias primas como leche, carne, pescado y vegetales, refuerza la necesidad que las industrias procesadoras de estos alimentos se establezca barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso. En particular en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno. Es por ello, que las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso. Éstas consisten en un riguroso control del uniforme del personal, lavado de manos, uso de pediluvios y reducción del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos (ICMSF, 2000). Se reactiva la cepa de *L. monocytogenes* en agar sangre. En la figura 3 se puede observar a la cepa de *Listeria monocytogenes* sembrada en el agar sangre.



**Figura 3:** *Listeria monocytogenes* (Doyle, *et al.*, 2001).

### 2.9.2 *Echerichia E. coli*

*Escherichia coli* está presente en grandes concentraciones en la microflora intestinal normal de las personas y los animales donde, por lo general, es inocua. Sin embargo, en otras partes del cuerpo *E. coli* puede causar enfermedades graves, como infecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis. Un número reducido de cepas enteropatógenas pueden causar diarrea aguda. Se han determinado varios tipos de cepas que son las siguientes como la *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Se cuenta con más información sobre los primeros cuatro tipos mencionados, pero se conocen peor la patogenicidad y la prevalencia de cepas de ECEA y ECAD. Se reactiva la cepa de *E. coli* en agar tripticosa soya (TSA). En la figura 4 se muestra a la bacteria *E. coli* microscópicamente (Doyle, *et al.*, 2001).



**Figura 4:** *Escherichia coli* (Doyle, et al., 2001)

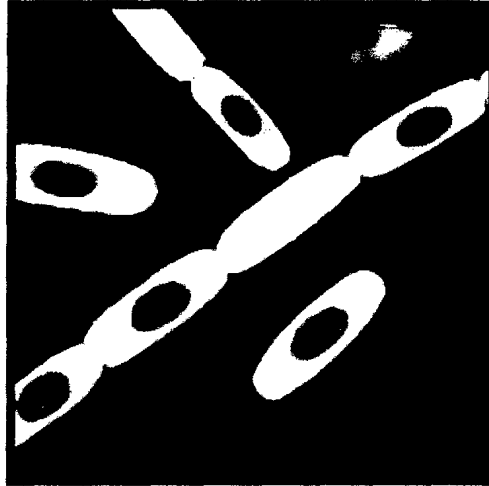
### 2.9.3 *Bacillus cereus*

Bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil. La espora es ovoidea, central y no deformante. Hidroliza la lecitina de la yema del huevo y no fermenta el manitol. Temperatura óptima 30°C a 37°C, su temperatura de crecimiento 5°C a 55°C y temperatura de germinación 5°C a 8°C. Su pH óptimo 4.5 a 9.3, Aw 0.95 y su concentración de sal 7.5%. Produce dos tipos de toxiinfecciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética (ICMSF, 2000).

Produce 2 síndromes uno de ellos es el Emético la cual produce intoxicación, periodo de incubación 1 – 5 h, causado por toxina termorresistente, los síntomas son vómitos, náuseas, calambres abdominales; el segundo es el Diarreico: se origina una enterotoxina que es termolábil, el periodo de incubación es entre 8–16 h, los síntomas son diarrea copiosa y acuosa, retortijones (ICMSF, 2000).

Una amplia variedad de alimentos que se puede encontrar el *Bacillus cereus* es en la carne, la leche, las verduras y el pescado se han asociado con la intoxicación alimentaria de tipo diarreicas. Los brotes de tipo vómitos, por lo general han sido asociados con los productos de arroz, sin embargo, otros alimentos con almidón como los productos de papa, la pasta y el queso también han sido implicados. Mezclas de alimentos como salsas, budines, sopas, guisos, pastas, ensaladas y han sido a menudo con los brotes de intoxicación alimentaria. Se

reactiva la cepa de *Bacillus Cereus* en agar nutritivo (ICMSF, 2000). En la figura 5 se observa a *Bacillus c.* a nivel microscópico.



**Figura 5:** *Bacillus cereus* (Doyle, et al., 2001).

### **3 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.3 Lugar de ejecución**

Las pruebas experimentales de la obtención del aceite esencial, determinación de los componentes químicos del aceite esencial y la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña - muña frente a tres cepas bacterianas se realizaron en los diferentes laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **3.2 Materiales, equipos y medios de cultivo**

##### **3.2.1 Materiales**

- ❖ pHmetro Hanna (pH 3 - 10 ± 0,01)
- ❖ Pipeta multicanal (30 - 300 µL) transferpette
- ❖ Micropipetas de diversa graduación (0,5–10µL, 20–200µL, 100 – 1000 µL)
- ❖ Placas petri de 90 mm de diámetro
- ❖ Gradillas de acero inoxidable
- ❖ Tubos de vidrio
- ❖ Microplacas de fondo U x 96 pocillos
- ❖ Bicker de 250 y 500 ml
- ❖ Probetas graduadas
- ❖ Asas de platino
- ❖ Hisopos estériles
- ❖ Pinzas estériles
- ❖ Guantes
- ❖ Mechero bunsen
- ❖ Parafilm
- ❖ Matraces aforados
- ❖ Discos de papel filtro

### 3.2.2 Equipos

- ❖ Cabina de bioseguridad de clase II tipo A, marca Bioair
- ❖ Espectrofotómetro (rango de luz visible)
- ❖ Agitador Vortex 2000rpm (vm mixer digisystem)
- ❖ Micro incinerador eléctrico (esterilizador de asa)
- ❖ Horno microondas
- ❖ Estufa para aerobios 37 °C
- ❖ Autoclave vertical de 24 litros, marca MV
- ❖ Balanza electrónica de precisión
- ❖ Refrigeradora
- ❖ Equipo de destilación de acero inoxidable
- ❖ Cromatógrafo de gas- espectrómetro de masa incorporado el detector de ionización de llama (CG-CM-FID)

### 3.2.3 Medios de cultivo y productos químicos

- ❖ Agar tripticasa soya (TSA), (Difco)
- ❖ Agar mueller – hinton, (Difco)
- ❖ Agar nutritivo, (Difco)
- ❖ Agar agar, (Difco)
- ❖ Agar sangre,( Difco)
- ❖ Caldo tripticasa soya (CASO), (Difco)
- ❖ Iodonitrotetrazolium chloride (INT)
- ❖ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ❖ Alcohol etílico de 70 °C
- ❖ Cloruro de sodio (NaCl)

### 3.3 Material biológico

Se llevó a cabo con tres cepas bacterianas de referencia de la *American Type Culture collection* (ATCC) que se utilizan en las pruebas de cualquier antimicrobiano, elegidas entre ellas consideradas de mayor

interés como contaminantes de productos destinados al consumo humano. En la figura 6 se observa la cepa a partir de la cepa liofilizada en agar nutritivo para su posterior estudio. En la figura 6 se observa la cepa reactivada a partir de la cepa liofilizada para su posterior estudio.

Las cepas bacterianas ensayadas son:

- ❖ *Echerichia coli* ATCC 25922
- ❖ *Bacillus cereus* ATCC 11778
- ❖ *Listeria monocytogenes* ATCC



Figura 6: Reactivación de la cepa de *Bacillus cereus* en agar nutritivo

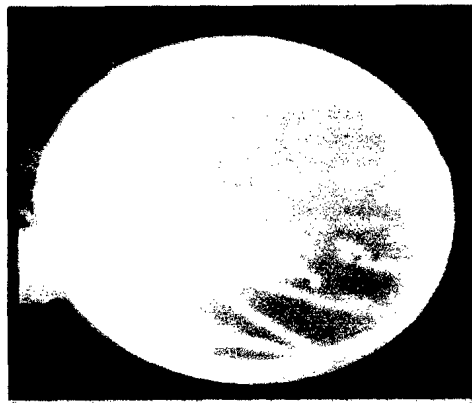


Figura 7: Reactivación de la cepa de *E. coli* en TSA

### **3.4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña - muña mediante el método de difusión en discos**

Para determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña con la prueba de sensibilidad mediante el método de difusión de discos sobre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *E. coli* primero se extrae el aceite esencial a partir de hojas previamente secas para continuar con su caracterización fisicoquímica (propiedades físicas y análisis cromatográfico) como se observa a continuación.

#### **3.4.1 Extracción del aceite esencial de muña – muña**

A partir de 3.200 kilos de hojas seca de muña fueron sometidas a extracción por el método de destilación con agua y vapor en un equipo de destilación de acero inoxidable. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio, se deshidrató las impurezas de agua en el aceite esencial con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C.

#### **3.4.2 Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de muña - muña**

Las características fisicoquímicas del aceite se determinó a una temperatura ambiental de 21 °C, se determina las propiedades físicas como el rendimiento en seco, olor, sabor y color ; las propiedades químicas como la densidad relativa, índice de refracción.

#### **3.4.3 Análisis cromatográfico del aceite de muña - muña**

Se realizó por métodos cromatográficos y espectroscópicos. Empleando cromatógrafo de gas-detector de ionización de llama (GC-FID) y el cromatógrafo de gases–espectrómetro de masas (CG-MS). Con columnas Supelcowax TM 10 y metilsilicona SE-30 (30m x 0.25 mm, 0.25 m de grosor de película). El análisis por GC-FID fue realizada en un Hewlett-

Packard 6890 computarizado con un procesador de software, en condiciones de muestra 0.1 mL de aceite esencial en 10 mL de etanol (1%); con columna a temperatura de inyección 250 °C, temperatura de horno a 60–220 °C (10 minutos), gas transportador helio y temperatura detector a 270 °C. El espectro de masa fue obtenido con un sistema computarizado constituido por un cromatógrafo de gas Hewlett - Packard 5890 series II acoplado a un detector selectivo de masa Hewlett - Packard 5971, usando las mismas condiciones analíticas mencionadas arriba. El espectro de masa fue tomado sobre 35-400 m/z, usando un voltaje de ionización de 70 eV. La identificación es basada en comparación de las señales en la mezcla espectral, con estos datos compilados se acudió a una librería referente y con la ayuda de un software laboratory - made.

#### **3.4.4 Prueba de sensibilidad mediante el método de difusión de discos**

La metodología utilizada para evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial se detalla a continuación:



### 3.4.4.1 Procedimiento para el método de difusión en agar por discos

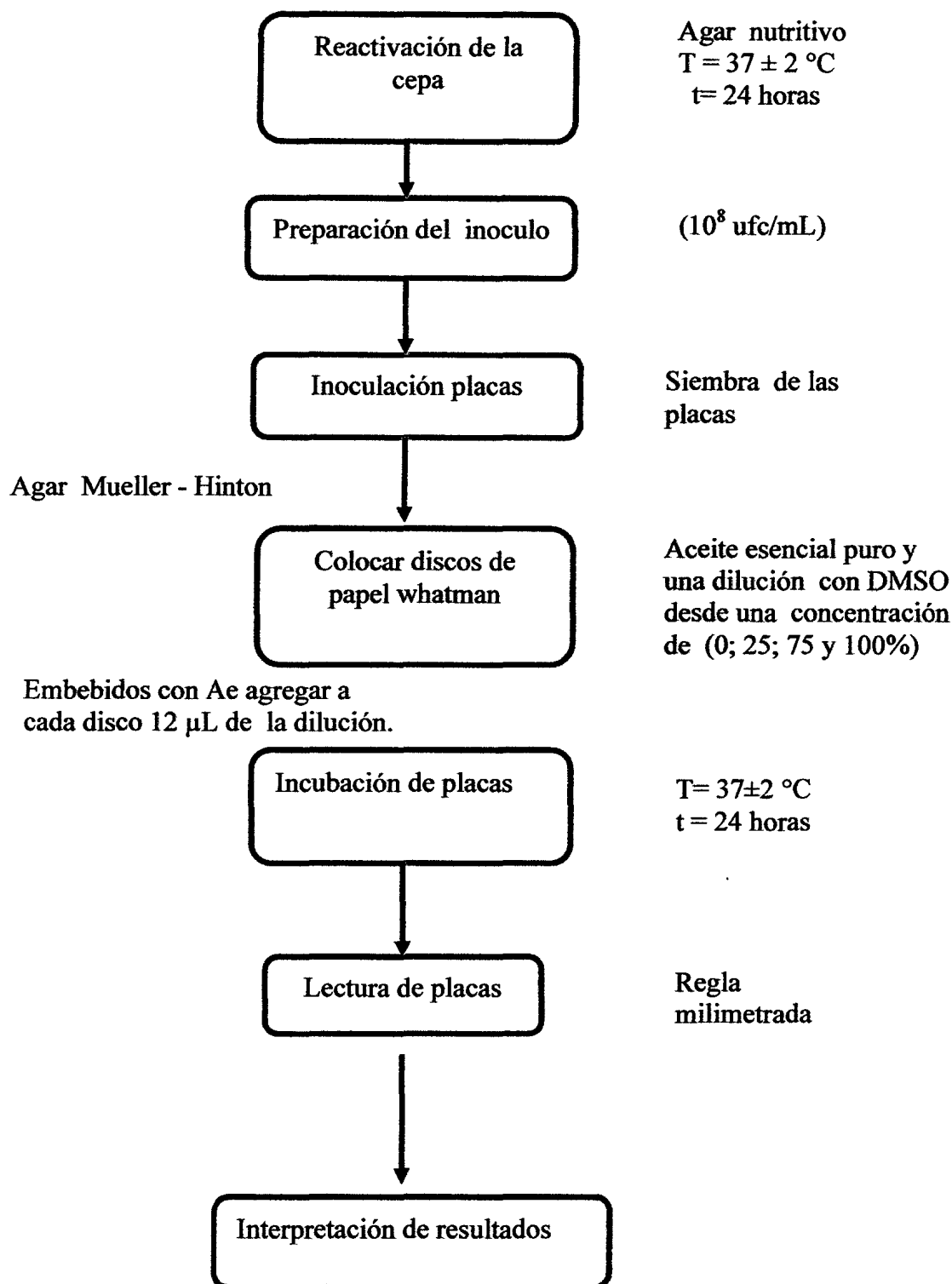
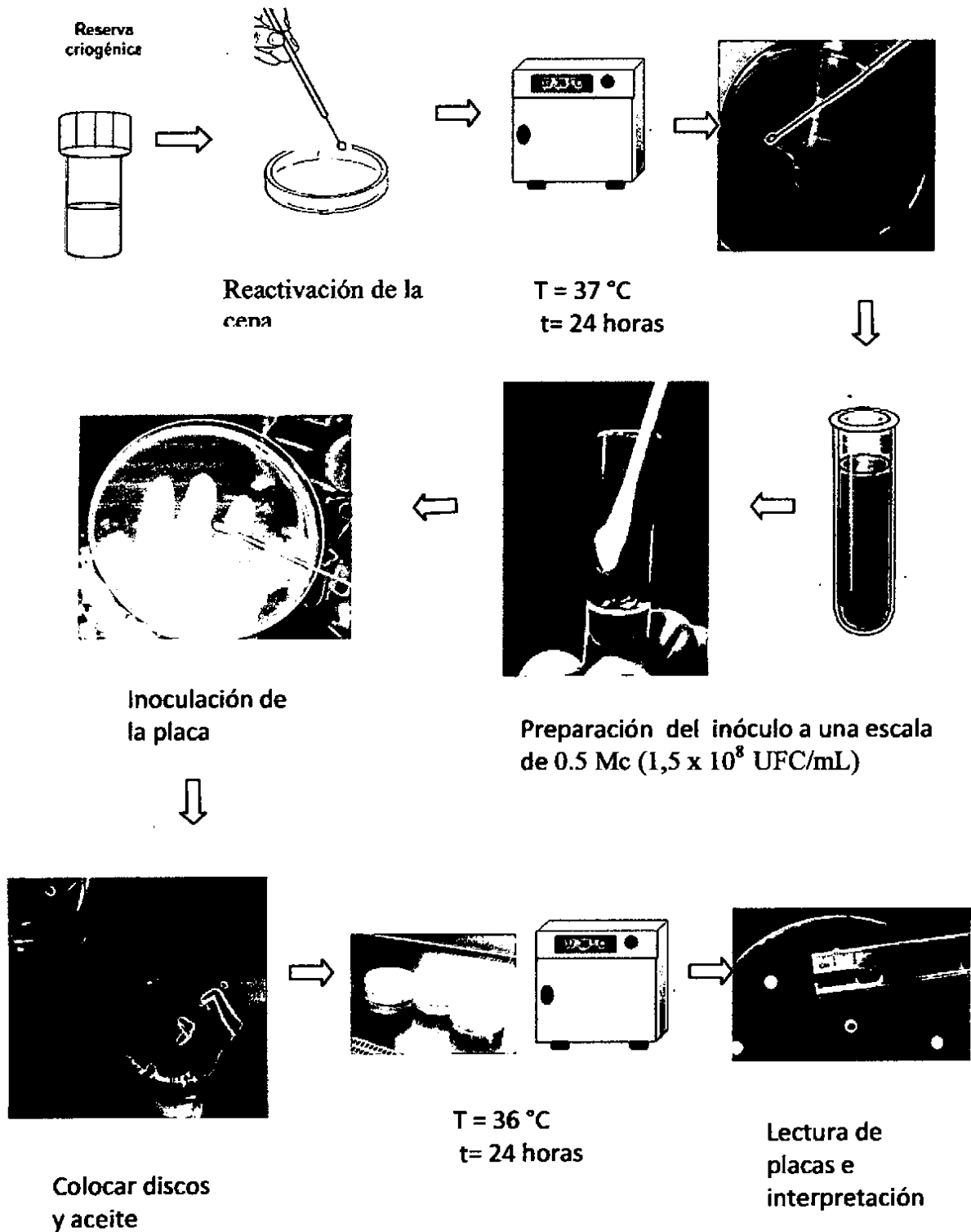


Figura 9: Diagrama del flujo general de la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña por el método de difusión en discos.

### 3.4.4.1.1 Procedimiento para el método de difusión en discos



### 3.4.4.2 Preparación de inóculos bacterianos y procedimiento

La preparación de inóculos bacterianos se inicia con la siembra e incubación de las bacterias a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. En la tabla 6 se muestra las condiciones de incubación y el medio de cultivo que se utiliza para reactivar las tres cepas bacterianas utilizadas

**Tabla 6: Reactivación de cepas bacterianas para la difusión en agar**

| Bacteria                      | Medio de cultivo     | Condiciones de incubación |
|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Echerichia coli</i>        | Agar tripticasa soya | 37 °C durante 24 horas    |
| <i>Bacillus Cereus</i>        | Agar nutritivo       | 37 °C durante 24 horas    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Agar tripticasa soya | 37 °C durante 24 horas    |

Se obtiene los cultivos a partir de cepas puras, se prepara una suspensión de cada uno de ellos tomando 3 – 4 colonias aisladas utilizando como herramienta hisopo esteril para que luego sean inoculadas a un tubo de 9 ml de suero fisiológico (NaCl al 0,9 %) para luego ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al estándar de 0,5 Mc Farland que es igual a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL utilizando el espectrofotómetro de longitud de onda a 625 nm (nanómetros) y la suspensión obtenida es ajustada de 0,08 a 0,1 que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

#### **Procedimiento:**

Se preparó el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se autoclavó a 121 °C/15 lb de presión por 15 minutos y se dejó enfriar hasta la temperatura de 45 – 50 °C, posteriormente se agregó a placas petri esterilizadas un aproximado de 20 ml de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.

El medio de cultivo utilizado es agar Mueller - Hinton (MH), los inóculos bacterianos utilizados es del orden  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, las placas petri son de diámetro de 9 mm, la placa del medio de cultivo debe tener un profundidad de 4mm para evitar posteriores problemas.

Después de 15 minutos de ajustado el inóculo ,se procedió a inocular a las placas de Mueller Hinton utilizando un hisopo estéril, presionando el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo y del líquido para evitar demasiada humedad, se siembra la superficie seca del Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones para asegurar una completa y homogénea distribución luego se deja reposar durante 15 minutos.

Se procede a colocar los discos sobre la superficie del agar utilizando pinza estéril aplicando una ligera presión a una distancia no menor de 24 mm des un centro al otro .

Posteriormente se procedió a colocar el aceite esencial sobre la superficie de los discos previamente esterilizados para lo cual se utilizó una micro pipeta de capacidad 10 – 15  $\mu$ L, la cantidad de dilución utilizada es de 12  $\mu$ L de dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) de las concentraciones en porcentajes de 25%, 50%, 75 %, 100 % (puro), del aceite esencial de muña – muña (*Satureja brevicalyx* epling), como control positivo se utilizó el antibiótico tetraciclina y como control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) ,cada concentración se realizó por triplicado.

Posteriormente se llevó las placas a incubar a la estufa dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos , incubando de forma invertida a una temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  durante 24 horas y en ambiente aerobio.

Para la medida de zona de inhibición de crecimiento mediante la lectura de los halos se deberá tener en cuenta el área que no muestre el desarrollo obvio , la interpretación de resultados es la siguiente fórmula:

$$\text{Valor inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{diámetro del disco}(6\text{mm})}{2}$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó cultivos control de cada cepa para comprobar su viabilidad.

### **3.5. Concentración mínima inhibitoria mediante el método de dilución en microplacas.**

Conociendo la actividad antimicrobiana del aceite esencial se determino cual es la concentracion minima del aceite esencial de muña muña capaz de inhibir el crecimiento bacterianos. A continuación se muestra el procedimiento para determinar la concentración mínima inhibitoria.



### 3.5.1. Procedimiento para el método por dilución en microplacas

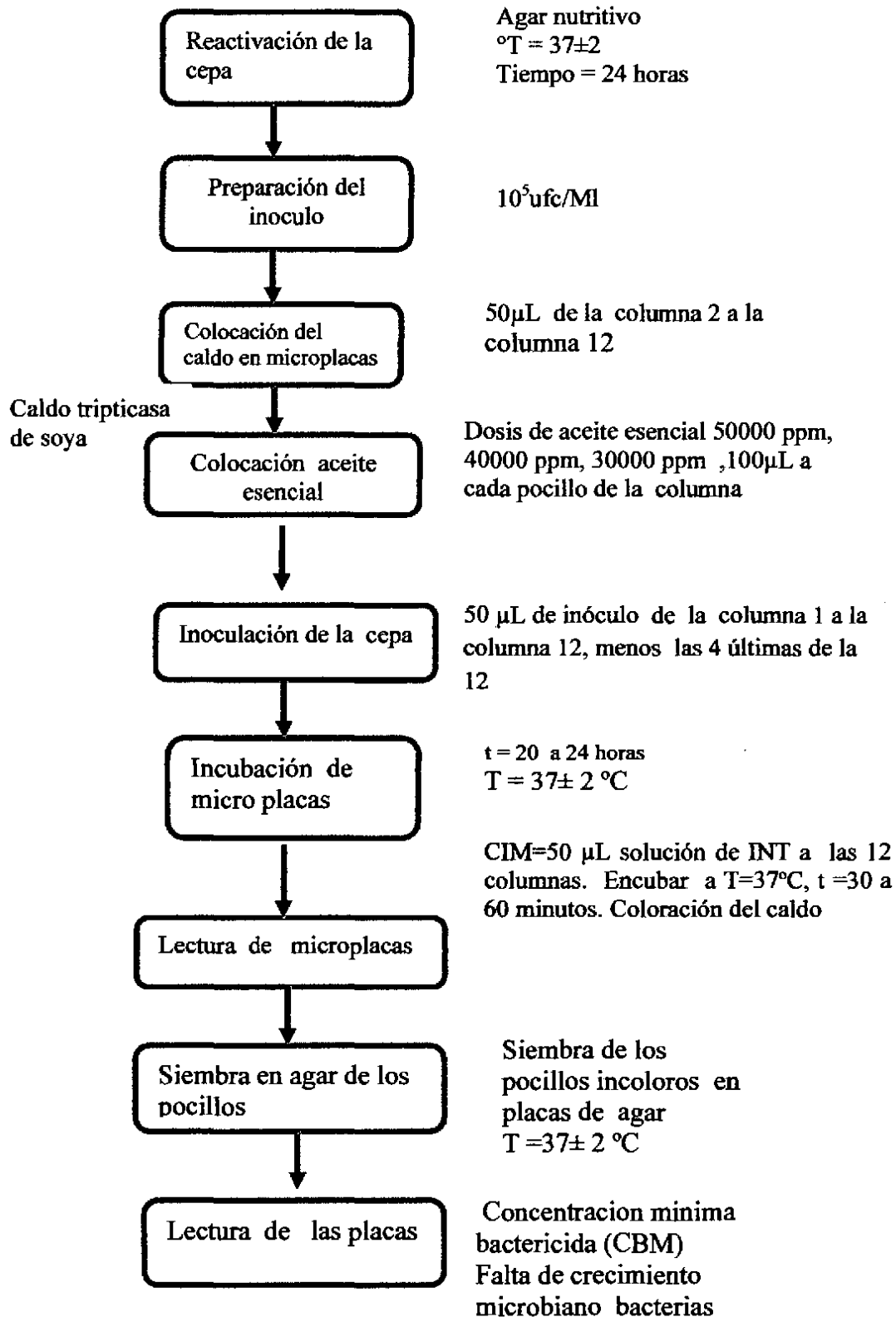
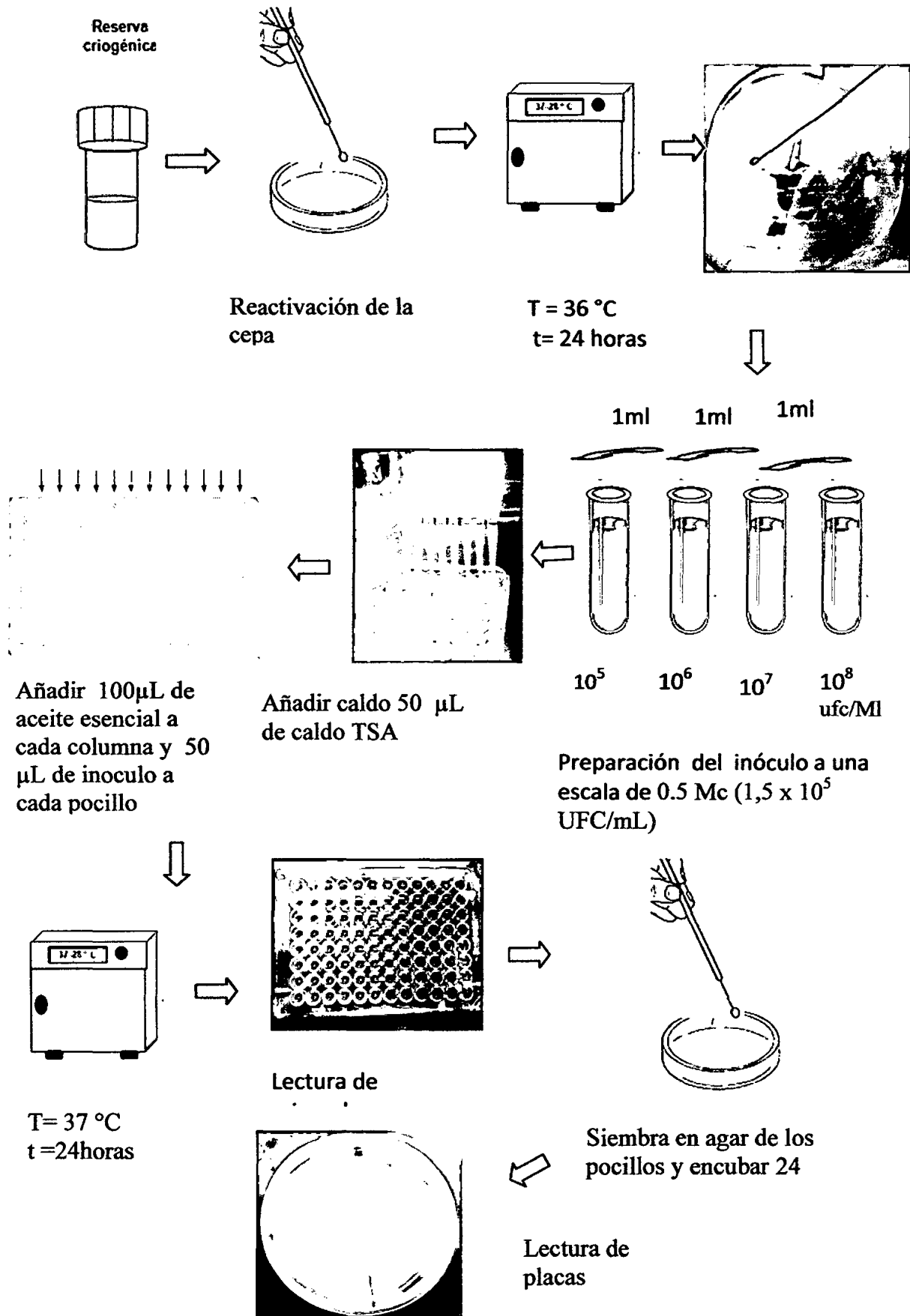


Figura 10: Diagrama del flujo general para determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida del aceite esencial de muña – muña por el método de micro dilución.

### 3.5.1.1 Procedimiento para el método de dilución en microplacas



### 3.5.2 Preparación de inóculos bacterianos y procedimiento

La preparación de inóculos bacterianos se inicia con la siembra e incubación de las bacterias a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. En la tabla 7 se muestra las condiciones de incubación y el medio de cultivo que se utiliza para reactivar las tres cepas bacterianas utilizadas

Tabla 7: Reactivación de cepas bacterianas para el método de micro dilución

| Bacteria                      | Medio de cultivo     | Condiciones de incubación |
|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Echerichia coli</i>        | Agar tripticasa soya | 37 °C durante 24 horas    |
| <i>Bacillus cereus</i>        | Agar nutritivo       | 37 °C durante 24 horas    |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Agar tripticasa soya | 37 °C durante 24 horas    |

#### Procedimiento:

Se obtiene los cultivos a partir de cepas puras, se prepara una suspensión de cada uno de ellos tomando 3 – 4 colonias aisladas utilizando como herramienta hisopo esteril para que luego sean inoculadas a un tubo de 9 ml de suero fisiológico (NaCl al 0,9 %) para luego ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al estándar de 0,5 Mc Farland que es igual a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL utilizando el espectrofotómetro de longitud de onda a 625 nanómetros y la suspensión obtenida es ajustada de 0,08 a 0,1 que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL

#### Ensayo de bacterias

Después de ajustar el inóculo a una turbidez equivalente al estándar de 0,5 Mc Farland que es igual a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL utilizando el espectrofotómetro, dentro de los 15 minutos siguientes se mezcló la suspensión antes de diluirlo, añadiendo 1ml de la suspensión original a 9 ml de caldo tripticasa soya ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL), de esta nueva suspensión añadimos 1ml a 9ml de caldo tripticasa soya ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL) así sucesivamente hasta obtener una dilución

final de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL .

Se trabaja con TSB (caldo tripticasa soya) y agar al 0,15 % como emulsificante con el aceite esencial

### 3.5.3 Concentracion mínima inhibitoria (CIM)

#### Procedimiento:

En la primera columna se deposita 100  $\mu$ L de aceite esencial según sea el caso, 100000 ppm, desde la segunda columna hasta la columna 12 de pocillos se deposita 50  $\mu$ L de caldo TBS + 0,15 % de agar, se prepara soluciones seriadas a partir de las primeras columnas de pocillos y a continuación se adicionan 50  $\mu$ L de microorganismos a una dilución de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL , mediante la dilución seriada se reduce la primera dilución del aceite esencial 50000 ppm obteniendo un volumen final para cada pocillo de 100  $\mu$ L, la cuatro primeras de la columna 12 son para control positivo y las 4 últimas filas son para el control negativo

Después de las 24 horas a de incubación 37°C en aerobeosis se adicionó 50  $\mu$ L de una solución de iodonitrotetrazolium chloride (INT) a una concentración de (4 mg/mL) a cada uno de los pozos y la placa se incubó a 37°C  $37^\circ\text{C} \pm 2$  entre 30 y 60 minutos, permitiendo a los microorganismos viables metabolizar el INT. Un cambio de color violeta intenso indica crecimiento del microorganismo, por consiguiente la CIM es la concentración mínima del aceite esencial donde no se evidencia ningún cambio de color Finalmente, los pozos que no presentaron cambio de color se repicaron en agar tripticasa soya (TSA) para determinar la concentracion mínima bactericida que es la ausencia de bacterias viables en ellos. En la tabla 8 se observa la concentracion utilizada de aceite esencial junto con el dimetilsulfóxido trabajada en dosis.

Tabla 8: Dosis utilizada como inhibidor del aceite esencial

| Dosis de aceite esencial | Cantidad aceite ( $\mu$ L) | Cantidad de DSMO( $\mu$ L) |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 50000 ppm                | 50                         | 950                        |
| 40000 ppm                | 40                         | 960                        |

|                  |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    |    |
|------------------|-------|-------|-----------|------|------|------------|-----|-----|-----|----|----|----|
| <b>30000 ppm</b> |       |       | <b>30</b> |      |      | <b>970</b> |     |     |     |    |    |    |
| Ppm              | 1     | 2     | 3         | 4    | 5    | 6          | 7   | 8   | 9   | 10 | 11 | 12 |
|                  | 50000 | 25000 | 12500     | 6250 | 3125 | 1563       | 781 | 391 | 195 | 98 | 49 |    |
| A                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C+ |
| B                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C+ |
| C                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C+ |
|                  | 40000 | 20000 | 10000     | 5000 | 2500 | 1250       | 625 | 313 | 157 | 79 | 40 |    |
| D                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C+ |
| E                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C- |
| F                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C- |
|                  | 30000 | 15000 | 7500      | 3750 | 1875 | 938        | 469 | 234 | 117 | 59 | 29 |    |
| G                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C- |
| H                |       |       |           |      |      |            |     |     |     |    |    | C- |

DMSO = Dimetilsulfóxido

Tabla 9: Valores de interpretación de datos en microplacas.

Esquema de la microplaca y la forma de uso para la evaluación

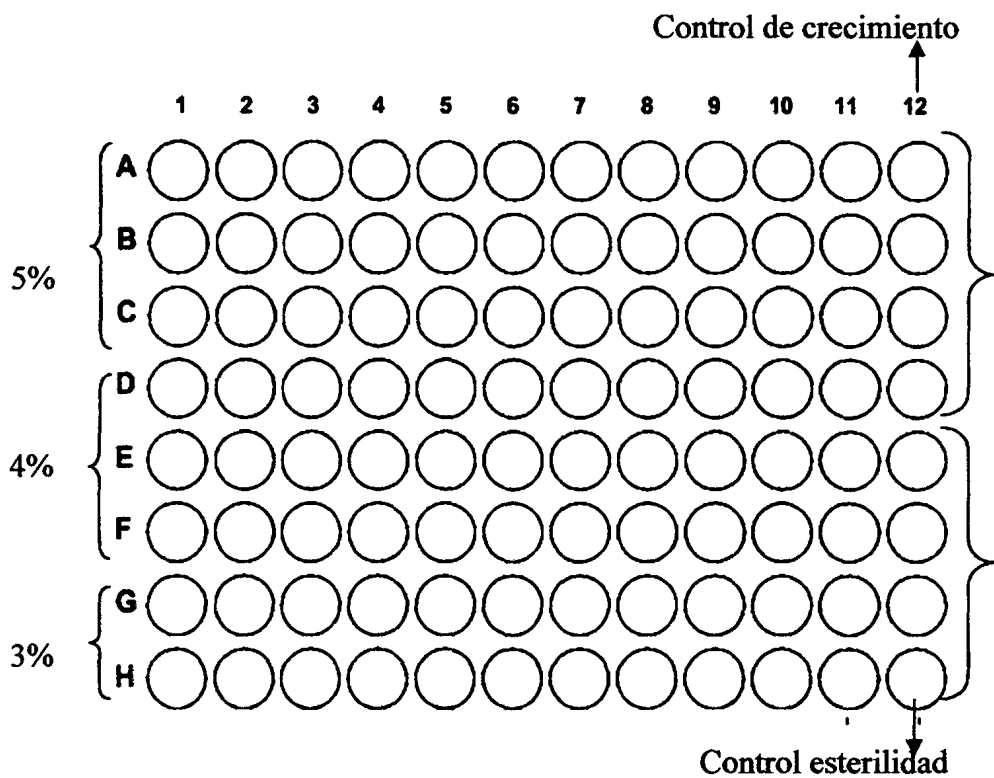


Figura 8: Esquema de la microplaca

### 3.6 Concentración mínima bactericida (CBM)

La menor concentración donde no se observó crecimiento bacteriano en cualquiera de los duplicados fue tomada como CIM. Después de determinar la CIM, el contenido del duplicado que no mostró incremento en la turbidez a cada intervalo de tiempo, fue inoculado por rayado sobre placas contentivas de agar triptycasa soya (TSA) y agar sangre, para comprobar si realmente se había inhibido el crecimiento bacteriano y así se determinó la concentración mínima bactericida (CBM), mediante la siembra en placas con agar utilizando la asa de collar para sembrar de los pocillos que no presenten una coloración rosa o violeta, es decir, pocillos que se determina como la concentración mínima inhibitoria y anteriores pocillos para posteriormente encubar las placas sembradas en estrías durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

### 3.7 Diseño estadístico

#### 3.7.1 Método de difusión en agar

En el diseño completamente al azar se obtiene 12 tratamientos, donde cuatro son las concentraciones para conocer el comportamiento del desarrollo de crecimiento y tres es la cantidad de las bacterias que se trabajara, al finalizar se obtiene 36 unidades experimentales a partir de los 12 tratamientos que se realizara por triplicado.

Tabla 10: formato de la evaluación del método de difusión en agar

| Rep. | Dilución del aceite esencial en % |   |   |                      |   |   |                      |   |   |                      |   |   |
|------|-----------------------------------|---|---|----------------------|---|---|----------------------|---|---|----------------------|---|---|
|      | C <sub>0</sub> = 100%             |   |   | C <sub>1</sub> = 75% |   |   | C <sub>2</sub> = 50% |   |   | C <sub>3</sub> = 25% |   |   |
|      | a                                 | B | C | a                    | b | c | a                    | B | C | a                    | b | c |
| 1    |                                   |   |   |                      |   |   |                      |   |   |                      |   |   |
| 2    |                                   |   |   |                      |   |   |                      |   |   |                      |   |   |
| 3    |                                   |   |   |                      |   |   |                      |   |   |                      |   |   |

Rep = Repeticiones



a= *Listeria monocytogenes*

b= *Bacillus cereus*

c = *Echerichia coli*

C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> = %, concentración del aceite esencial

### 3.7.2 Modelo estadístico

El modelo estadístico que se trabajo es el diseño completamente al azar.

#### 3.7.2.1 Modelo estadístico para el método de difusión en agar

Todos los efectos cumplen la restricción de sumar cero, es decir, son desviaciones respecto a la medida general  $\mu$ .

**A<sub>i</sub> : Bacterias:** (3 niveles; i = 1, 2, 3 )

A<sub>1</sub> = *Listeria Monocytogenes*

A<sub>2</sub> = *B. cereus*

A<sub>3</sub> = *E. coli*

**B<sub>j</sub> : Concentración de aceite esencial de *Satureja brevicalyx* , “muña – muña”:**

(4 niveles; j = 1, 2, 3,4)

B<sub>1</sub> = 25%

B<sub>2</sub> = 50 %

B<sub>3</sub> = 75 %

B<sub>4</sub> = 100 %

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Características físicas y químicas del aceite esencial de muña – muña se determinó a una temperatura ambiental de 21 °C. Se obtuvo aproximadamente 31,60 ml de aceite esencial mediante la técnica de arrastre de vapor y agua. En la tabla 11 se observa los resultados evaluados de dicho aceite como las propiedades físicas.

Tabla 11: Características fisicoquímicas del aceite esencial

| Propiedades físicas  | Índice                    |
|----------------------|---------------------------|
| Olor                 | Fuerte resistente         |
| Color                | Amarillento y translucido |
| Sabor                | Amargo                    |
| Densidad relativa    | 0,913                     |
| Índice de refracción | 1,470                     |
| Rendimiento en seco  | 0,986                     |

Las constantes físicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* caracterizan los grupos de componentes químicos presentes, y además son parámetros de calidad aromática que permiten tomar decisiones en futuros proyectos de rentabilidad comercial. Según Bandoni (2000), los valores de rendimiento  $\geq 1.0\%$  de aceite esencial, las categorizan a las especies aromáticas en excepcionalmente interesantes y promisorias. Para el caso de la *S. brevicalyx* resulta ser un valor significativamente alto (tabla 11), llegando a 0,986 % v/p. Los resultados de la densidad e índice de refracción, permitirán en lo posterior caracterizar y analizar los parámetros de control de calidad, siendo novedosos para el caso de la especie en estudio. Según Carhuapona (2007), obtiene casi los mismos valores de la tabla 11 de *S. brevicalyx*.

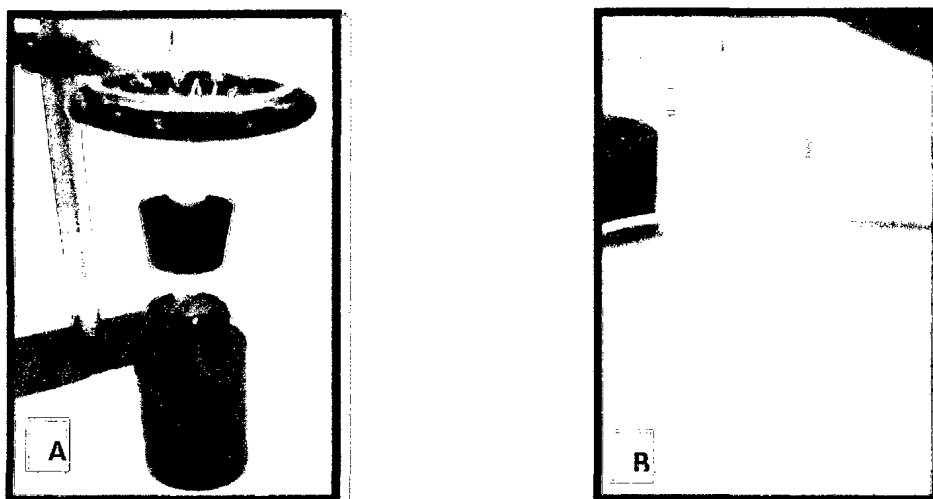


Figura 9: Obtención del aceite esencial. A (secado del aceite esencial). B (determinación de la densidad)

En la tabla 12 se observa los componentes químicos del aceite esencial encontrados del aceite esencial mediante un análisis cromatográfico y también se registra el porcentaje de cada componente y el tiempo de retención.

Tabla 12: Componentes químicos del aceite esencial de muña - muña

| Compuesto            | Porcentaje (%) | Tiempo de retención (min) |
|----------------------|----------------|---------------------------|
| Iso mentona          | 10,71          | 26,78                     |
| Mentona              | 32,74          | 27,15                     |
| Pulegona             | 20,89          | 29,59                     |
| Isopulegona          | 3,15           | 27,43                     |
| Carvacol             | 6,27           | 30,92                     |
| $\beta$ - linalool   | 5,80           | 24,55                     |
| $\rho$ -cimol        | 2,79           | 21,87                     |
| 1,8 -Cineol          | 1,71           | 32,15                     |
| Timol                | 0,35           | 31,22                     |
| $\alpha$ - terpinene | 1,33           | 23,13                     |
| $\beta$ -pineno      | 0,25           | 18,23                     |
| A - pineno           | 0,24           | 20,09                     |
| Limoneno             | 0,40           | 23,62                     |
| Sabineno             | 0,11           | 23,62                     |
| $\beta$ - mircenol   | 0,20           | 20,08                     |
| 3- octanol           | 0,11           | 20,61                     |
| Biciclogermacreno    | 3,17           | 37,51                     |

|                        |      |       |
|------------------------|------|-------|
| $\beta$ -cariofileno   | 3,54 | 27,15 |
| Piperitenona           | 0,48 | 30,08 |
| Piperitona             | 0,27 | 32,77 |
| Acetato de geranill    | 0,27 | 39,70 |
| Oxido de cariofileno   | 0,15 | 34,27 |
| Espatulenol            | 0,26 | 39,75 |
| $\alpha$ - humuleno    | 0,30 | 37,43 |
| Trans- isopulegona     | 0,11 | 20,61 |
| $\gamma$ - terpineno   | 1,33 | 23,13 |
| aromadendreno          | 0,17 | 36,56 |
| Germacreno B           | 0,24 | 41,38 |
| Dietil pthalato        | 0,42 | 39,07 |
| $\alpha$ -Phellandrene | 0,30 | 17,87 |
| Epiglobulol            | 0,22 | 41,69 |

En la tabla 12 se observa los componentes detectados del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* “muña - muña”, determinándose un total de 31 componentes, con 11 compuestos mayoritarios (77,28%) de los cuales dos, la mentona (32%), la pulegona (20,89%) y iso mentona(10 %), son los principales, además carvacol (6,27%), isopulegona (3,15%), biciclogermacreno (3,17%) y demás componentes.

La determinación de los componentes de este aceite esencial es de suma Importancia. Los compuestos identificados coinciden con lo encontrado por (Morales, 2007) en cuanto a la composición del aceite esencial de muña - muña, pero al mismo tiempo revelan la presencia de nuevos componentes que abren nuevas líneas de investigación pues se trata de metabolitos secundarios de esta especie.

Los compuestos mayoritarios identificados permiten suponer la actividad que estos componentes pudieran tener, es decir, los mecanismos de acción antimicrobianos. Según Zekaria D, 2007; el  $\alpha$ -pineno es un terpeno cíclico el cual actúa a nivel membranal, alterando la unión de los fosfolípidos presentes en la bicapa lipídica de las bacterias Gram positivas.

#### 4.1. Evaluación de efectos de los tratamientos

##### 4.1.1. Efectos de la concentración del aceite esencial de muña - muña

Los factores de estudio (concentración del aceite esencial en dimetilsulfoxido y las cepas bacterianas utilizadas), influye significativamente a la variación de inhibición de las bacterias, puesto que a una concentración menor de 50 % de aceite esencial se observa inhibición lenta, sin embargo a una concentración superior de 50 %, 75 % y del 100 %, aceite puro, existe mayor inhibición, lo cual sería favorable para su posterior estudio.

En la tabla 13 se observa que existe diferencia significativa al 0,05 en las concentraciones utilizadas contra las tres cepas trabajadas a nivel laboratorio observando mayor inhibición al 100 % (aceite puro) 75% y 50 % del aceite esencial.

**Tabla 13: análisis de varianza de la actividad antimicrobiana**

Variable dependiente: Actividad antimicrobiana

| Origen              | Suma de cuadrados    | Gl | Media cuadrática | F        | Sig. |
|---------------------|----------------------|----|------------------|----------|------|
| Modelo correguido   | 704,000 <sup>a</sup> | 11 | 64,00            | 192,00   | 0,00 |
| Intersección        | 5476,000             | 1  | 5476,00          | 16428,00 | 0,00 |
| Concentración       | 704,000              | 11 | 64,00            | 192,00   | 0,00 |
| Cepas               | 8,000                | 24 | 0,333            | -----    | ---  |
| Concentracion*cepas | 6188,000             | 36 | ----             | ----     | ---- |
| Error               | 712,000              | 35 | ----             | ----     | ---- |

a. R cuadrado = 0,989 (R cuadrado corregida = 0,984)

Se hace una interpretación minuciosa para su fácil entendimiento en las variables de respuesta, para confirmar la diferencia significativa existente a la variable de estudio actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña. En la tabla se detalla la fuente de variación, la suma de cuadrado, los grados de libertad (gl), las medias cuadráticas, los estadísticos F y los niveles críticos (sig.) asociado a cada estadístico F. La fila modelo corregido se refiere a todos los efectos del modelo tomado junto (el efecto de los dos factores, de la interacción y de la constante). El nivel crítico asociado al estadístico F ( $P= 0,000 < 0,05$ ), se dice



que el modelo explica una parte significativa de la variación observada en la variable dependiente (actividad antimicrobiana), el valor R cuadrado = 0,989 que se obtiene dividiendo la suma de cuadrados del modelo corregido entre el error, indica que los tres efectos incluidos en el modelo (concentración, cepa y concentración \* cepa) están explicando el 99 % de la varianza de la variable dependiente actividad antimicrobiana.

La fila de intersección es sobre la constante del modelo. Esta constante forma parte del modelo y es necesaria para obtener las estimaciones de las medias de cada casilla.

Las dos filas siguientes indican los efectos individuales de los dos factores incluidos en el modelo: concentración y cepas bacterianas.

Los niveles críticos (sig) indican que, mientras los grupos definidos por la variable concentración poseen actividad antimicrobiana significativamente diferentes (sig = 0,000 < 0,05)

Ya que existe una diferencia significativa al 5% de la actividad antimicrobiana del aceite esencial por lo cual se realizó la prueba tukey para confirmar su variación.

**Tabla 14: Pruebas de tukey para tratamientos de la actividad antimicrobiana**

Subconjuntos

| tratamiento | N | 1     | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
|-------------|---|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 10,00       | 3 | 5,667 |        |        |        |        |        |        |
| 7,00        | 3 |       | 8,333  |        |        |        |        |        |
| 11,00       | 3 |       | 8,333  |        |        |        |        |        |
| 4,00        | 3 |       | 9,667  | 9,667  |        |        |        |        |
| 8,00        | 3 |       | 10,333 | 10,333 |        |        |        |        |
| 1,00        | 3 |       |        |        | 11,667 |        |        |        |
| 5,00        | 3 |       |        |        | 11,667 |        |        |        |
| 12,00       | 3 |       |        |        | 11,667 |        |        |        |
| 9,00        | 3 |       |        |        |        | 13,667 |        |        |
| 2,00        | 3 |       |        |        |        |        | 17,667 |        |
| 6,00        | 3 |       |        |        |        |        | 17,667 |        |
| 3,00        | 3 |       |        |        |        |        |        | 21,667 |
| Sig.        |   | 1,00  | 0,229  | 0,949  | 0,229  | 1,000  | 1,000  | 1,000  |



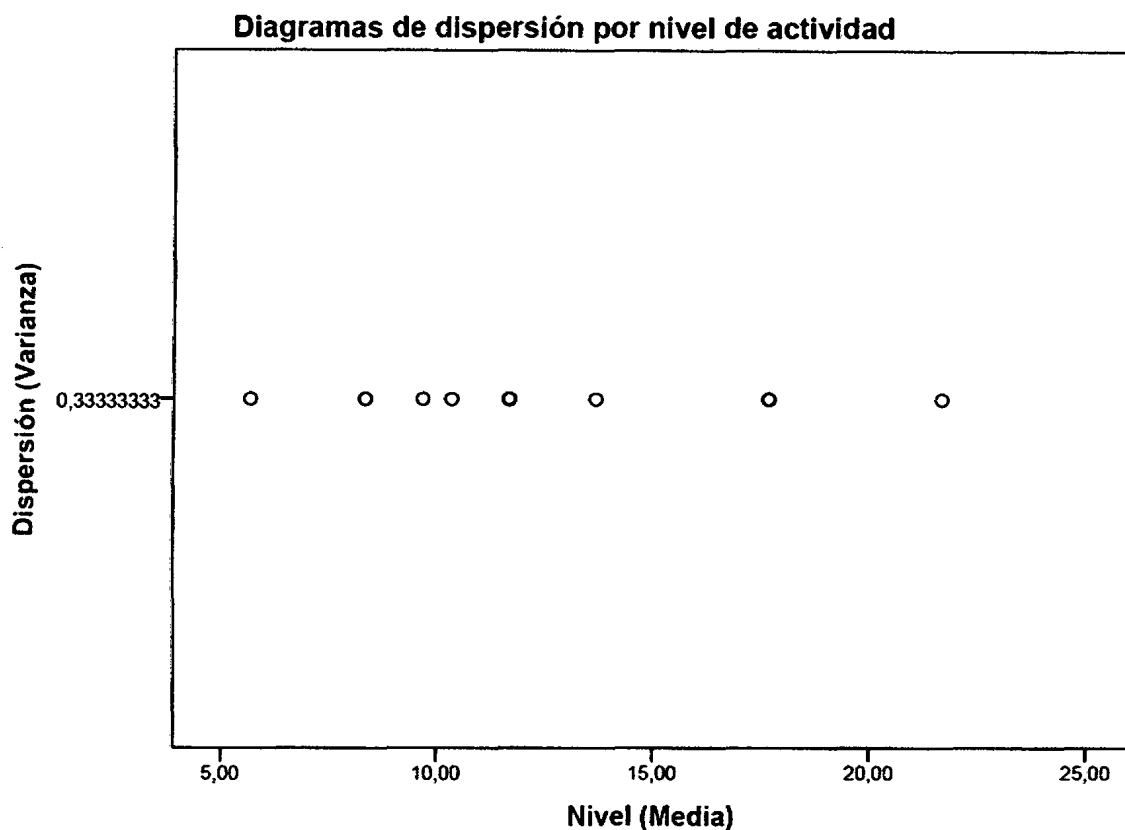
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 0,333.

b.  $\alpha = 0,05$

En la tabla 14 se observa un resumen del procedimiento de tukey. En este resumen los grupos cuyas medias no difieren entre si están agrupados en el mismo subconjunto y los grupos cuyas medias difieren forman partes de subconjuntos diferentes. Vemos que existe un primer subconjuntos de grupos homogéneos formados por el grupo de tratamiento 10, el segundo subconjunto por los tratamientos 11, 7, 4 ; el tercer subconjunto por el tratamiento 4, 8; para el cuarto subconjunto por el tratamiento 8, 1, 5, 12 así hasta llegar al subconjunto 7 por el grupo de tratamiento 3. Siendo el tratamiento 10 (con un halo de inhibición de 5,67 mm frente a la cepa bacteriana de *E. coli*) el que ocupa el primer lugar en su rango de una inferior medida de inhibición, siguiendo con el tratamiento 3 (con un halo de inhibición 21,67mm frente a la cepa bacteriana de *Bacillus c.*) el que ocupa el último lugar en su rango de una superior medida de inhibición; siendo el tratamiento 6 (con un halo de inhibición de 17,67 frente a la cepa bacteriana de *Listeria Monocytogenes* de 17,67 mm ) el que ocupa el 6 subconjunto.



**Figura 9.1: diagrama de dispersión por nivel de actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña - muña.**

En la figura 9.1 se puede observar el diagrama de dispersión de varianza el error media de 0,333 en Y y en X valores de la medida de halos de inhibición según la cepa utilizada y la dilución del aceite en dimetilsulfoxido a diferentes concentraciones.

#### **4.2. Resultados del método de Difusión en Agar**

Mediante el método de difusión en agar se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido contra las bacterias gram (+): *Listeria Monocytogenes*, *Bacillus Cereus* y la bacterias gram (-): *E. coli*, el aceite esencial de muña - muña de nombre científico *Satureja brevicalyx*.

#### **Promedio de halo de inhibición**

Resultados del promedio del halo de inhibición en milímetros frente a tres cepas bacterianas.

Tabla 15: Promedio de halos de inhibición en mm

| Producto | <i>E. coli</i> |       | <i>Listeria m.</i> |       | <i>Bacillus cereus</i> |       |
|----------|----------------|-------|--------------------|-------|------------------------|-------|
|          | PR*            | D.E** | PR*                | D.E** | PR*                    | D.E** |
| 1        | 5.67±0,57      |       | 8.33±0,33          |       | 11.67±0,67             |       |
| 2        | 7.33±0,57      |       | 10.33±0,33         |       | 13.67±0,67             |       |
| 3        | 9.67±0,57      |       | 11.67±0,33         |       | 17.67±0,67             |       |
| 4        | 11,67±0,57     |       | 17,67±0,33         |       | 21.67±0,67             |       |

D.E\*\* = Desviación estándar

PR\* = Promedio aritmético

Diluciones del aceite esencial %:

4= aceite puro , 3 = Aceite esencial al 75%

2= Aceite esencial al 50 %, 1 = Aceite esencial al 25%

En la tabla 15 se observa el promedio del halo de inhibición en milímetros frente a tres cepas bacterianas, el promedio de halo de inhibición del aceite esencial a una concentración de 100 %, es decir aceite puro, es de 21,67 mm frente a *Bacillus cereus*; 17,67 mm frente a *Listeria monocytogenes* y una actividad inhibitoria inferior de 11,67 mm frente a *E. coli*, resultó ser la especie que presentó una actividad débil frente a los microorganismos ensayados.

En la tabla 12 se observa la actividad antimicrobiana contra *Bacillus Cereus* evidenciando un halo de inhibición de 21,67 mm seguido por la cepa de *Listeria Monocytogenes* de 17,67 mm y por ultimo contra la cepa de *E.coli* con un halo de inhibición de 11,67 mm lo que se indica que dicho aceite presenta mayor actividad antimicrobiana para bacterias gram positiva (*Bacillus Cereus*, *Listeria Monocytogenes*).

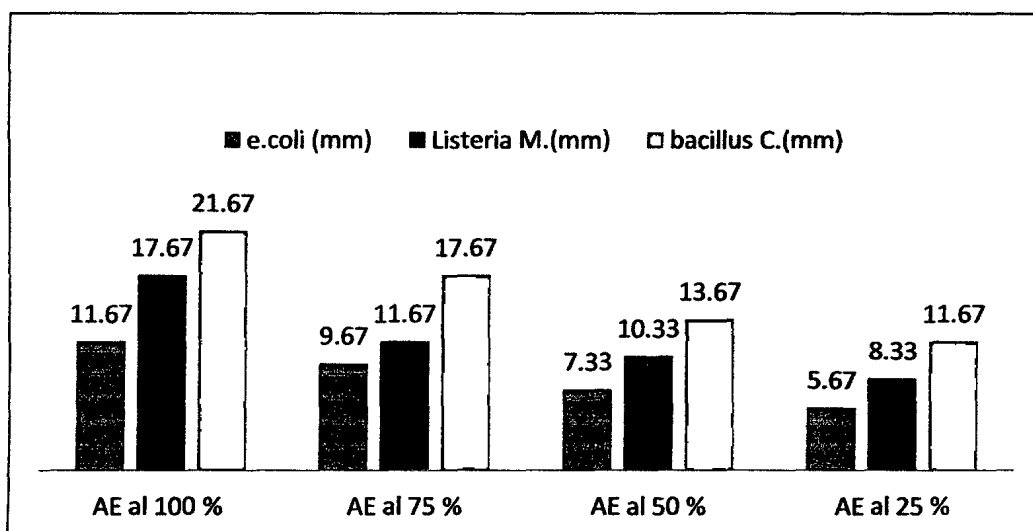


Figura 10: Promedio del halo de inhibición de las tres cepas bacterianas

AE= Aceite esencial

Diluciones del aceite esencial %:

4= aceite esencial al 100%, 3 = Aceite esencial al 75%

2= Aceite esencial al 50 %, 1 = Aceite esencial al 25%

En la figura 10 se ilustra la diferencia entre los promedios de halos de inhibición (mm.) de las diferentes diluciones del aceite de “muña – muña” sobre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *E. coli*, observándose que la mayor inhibición es con el aceite puro sin dilución y está representado en la figura con el número 4, las diluciones al 75% ,50% y 25% con dimetilsulfoxido (DMSO), que esta representado por los números 3, 2,1. Coincidiendo con los estudios de Munares, Días, Chica y Mora que trabajaron usando el aceite esencial de *M. mollis* frente a diversos microorganismos encontrando actividad antimicrobiana a todas las concentraciones.

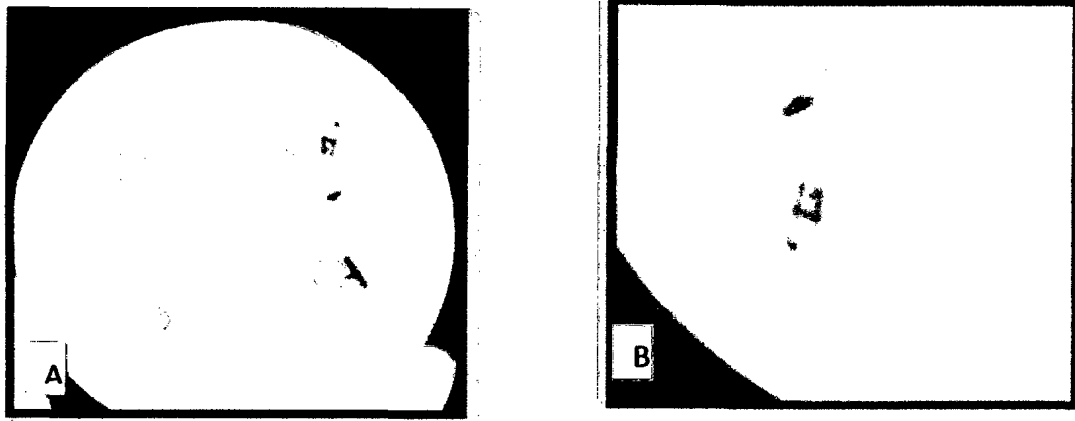


Figura 11: Halos de inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial sobre *Listeria monocytogenes*. A.- Diluciones del aceite esencial de muña – muña. B.- Halos de inhibición del aceite esencial al 100 % o puro.

Diluciones del aceite esencial %:

4= aceite esencial al 100%, 3 = Aceite esencial al 75%

2= Aceite esencial al 50 %, 1 = Aceite esencial al 25%

En la figura 11 se puede observar los halos de inhibición no tan resaltante debido a su crecimiento de desarrollo lento; se observa que a mayor concentración del aceite esencial mayor halos de inhibición, el halo de inhibición a una de aceite esencial al 25 % es de 8,33 mm, está representado por el número 1, al 50 % de aceite esencial un halo de inhibición de 10,33 mm, al 75 % de aceite esencial es de 11,67 mm y al 100% de aceite esencial, aceite puro, es de 17,67mm.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña sobre la cepa de *Listeria monocytogenes* con un halo de inhibición de 17,67 mm, estos resultados concuerdan con lo encontrado de Albado *et al.*, 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes* por la presencia de sus componentes antimicrobianos, poseen actividad antimicrobianas contra bacterias gram positivas y gram negativa con un halo de inhibición 12 - 23 mm.

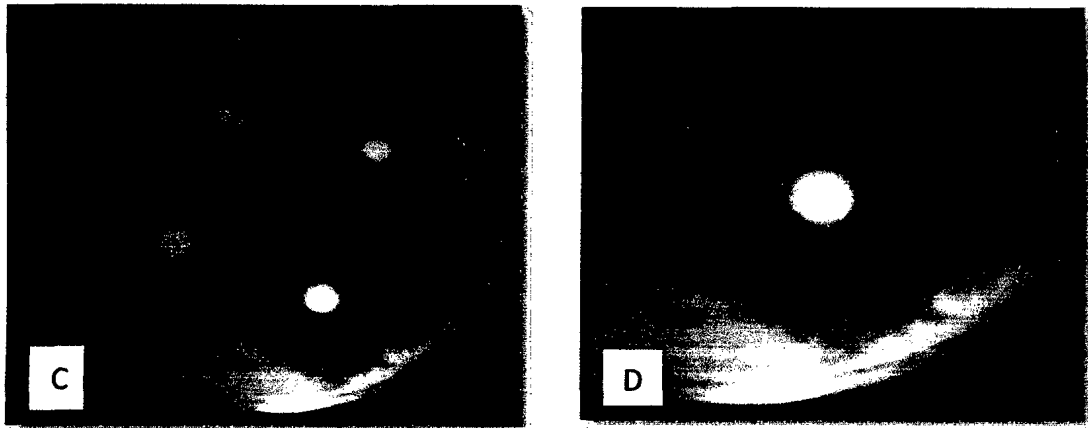


Figura 12: Halos de inhibición a diferentes diluciones de aceite esencial de muña – muña sobre la cepa de *Bacillus cereus*. C.- Diluciones del aceite esencial de muña – muña. D.- Halos de inhibición del aceite esencial al 100 % o puro.

Diluciones del aceite esencial %:

4= aceite esencial al 100%, 3 = Aceite esencial al 75%

2= Aceite esencial al 50 %, 1 = Aceite esencial al 25%

En la figura 12 se puede observar los halos de inhibición del aceite esencial de muña - muña sobre *Bacillus c.*; se observa que a mayor concentración del aceite esencial mayor halos de inhibición, el halo de inhibición a una concentración de aceite esencial al 25 % es de 11,67 mm, esta representado por el numero 1, al 50 % de aceite esencial un halo de inhibición de 13,67 mm, al 75 % de aceite esencial es de 17,67 mm y al 100% de aceite esencial, aceite puro, es de 21,67mm.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña sobre la cepa de *Bacillus c.* fue 21,67 mm, estos resultados concuerdan con lo encontrado de Albado *et al.*, 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* por la presencia de sus componentes antimicrobianos, poseen actividad antimicrobianas contra bacterias gram positivas y gram negativa con un halo de inhibición 12 - 23 mm, también estos

resultados concuerdan con lo encontrado según Gómez que demuestra la actividad antimicrobiana contra bacterias gram positiva de *Bacillus c.*, encontrando actividad en la fase de tamizaje del aceite *P. jacquemontianum* y *P. umbellatum* con un halo de inhibición de 23 mm para el aceite de *P. jacquemontianum* y 25 mm para el aceite *P. umbellatum*.

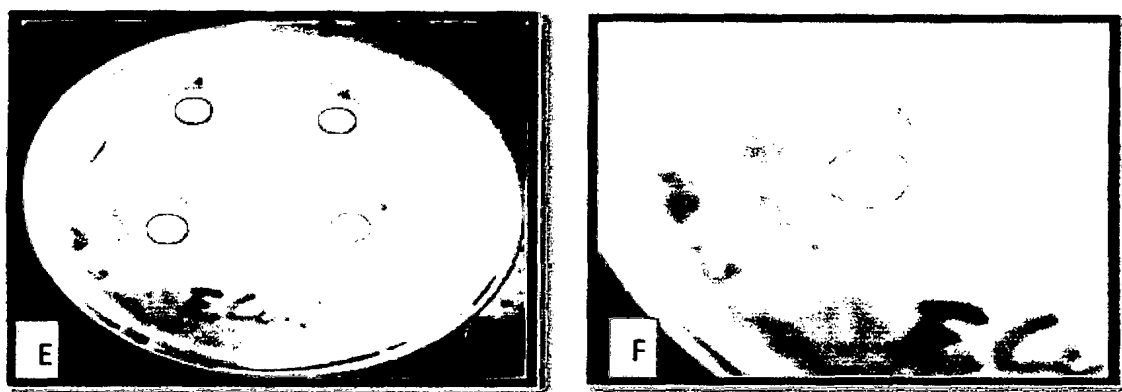


Figura 13: Halos de inhibición a diferentes concentraciones de aceite esencial sobre la cepa de *E. coli*. E.- Diluciones del aceite esencial de muña – muña. E.- Halos de inhibición del aceite esencial al 100 % o puro.

Diluciones del aceite esencial %:

4= aceite esencial al 100%, 3 = Aceite esencial al 75%

2= Aceite esencial al 50 %, 1 = Aceite esencial al 25%

En la figura 13 se puede observar la actividad antimicrobiana mediante los halos de inhibición del aceite esencial de muña - muña sobre *E. coli*; se observa que a mayor concentración del aceite esencial mayor halos de inhibición, el halo de inhibición a una concentración de aceite esencial al 25 % es de 5,67 mm, esta representado por el numero 1, al 50 % de aceite esencial un halo de inhibición de 7, 33 mm, representado por el numero 2, al 75 % de aceite esencial es de 9,67 mm y al 100% de aceite esencial, aceite puro, es de 11,67mm.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña – muña sobre la cepa de *E. coli* presento un halo de inhibición de 11,67 mm. Estos resultados concuerdan con lo demostrado por Martínez que la actividad antimicrobiana del extracto de

cúrcuma frente a la cepa de *E. coli* tiene un halo de inhibición de 14 mm, también con lo encontrado por Moreira *et al.*, 2005 ,quienes demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* contra varias cepas de *E. coli*, con halos de inhibición entre 18 y 21 mm; también de igual manera (Ramon, *et al*, 2007) demuestra la actividad antimicrobiana del aceite esencial de lippia alba en bacterias y hongos, con un halo de inhibición de 19 mm para la *E. coli*, quiere decir que es importante la composición química de los aceites esenciales, también concuerdan con lo encontrado de Albado *et al.*, 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli* por la presencia de sus componentes antimicrobianos, poseen actividad antimicrobianas contra bacterias gram positivas y gram negativa con un halo de inhibición 12 - 23 mm.

| Listeria m.         | Efectividad antibacteriana cualitativamente |                      |             |                        |                  |     |
|---------------------|---|----------------------|-------------|------------------------|------------------|-----|
|                     | Nula *                                      |                      | Sensible ** |                        | Muy sensible *** |     |
|                     | N   | %                    | N           | %                      | N                | %   |
| Aceite muña al 100% | 0   | 0                    | 0           | 0                      | 3                | 100 |
| Aceite muña al 75 % | 0   | 0                    | 3           | 100                    | 0                | 0   |
| Aceite muña al 50 % | 0   | 0                    | 3           | 100                    | 0                | 0   |
| Aceite muña al 25 % | 0   | 0                    | 3           | 100                    | 0                | 0   |
| Control +           | 0   | 0                    | 0           | 0                      | 3                | 100 |
| Control -           | 3   | 100                  | 0           | 0                      | 0                | 0   |
| *HICB menor a 8mm   |   | ** HICB de 8 a 14 mm |             | *** HICB de 14 a 20 mm |                  |     |

Tabla 16: Presencia de halo de inhibición del aceite esencial contra *Listeria monocytogenes*

En la tabla 16 se presenta la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria de *Listeria monocytogenes*. Tanto con el aceite de “muña” al 100%, 75 %, 50%, al 25 % y el control + (Tetraciclina) mostraron HICB (Halo de inhibición de crecimiento bacteriano) en la totalidad de placas. Se observa que hubo ausencia de

HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el control – (Dimetilsulfóxido) trabajando con tres repeticiones. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* epling “muña – muña” sobre la bacteria aerobia *Listeria monocytogenes* a las 24 horas; según las pautas de Duraffourd.

| Dilución            | Efectividad antibacteriana cualitativamente |                      |             |                        |                  |      |
|---------------------|---|----------------------|-------------|------------------------|------------------|------|
|                     | Nula *                                      |                      | Sensible ** |                        | Muy sensible *** |      |
|                     | N   | %                    | N           | %                      | N                | %    |
| Aceite muña al 100% | 0   | 0                    | 0           | 0                      | 3                | 100  |
| Aceite muña al 75 % | 0   | 0                    | 0           | 0                      | 3                | 100  |
| Aceite muña al 50 % | 0   | 0                    | 1           | 33.3                   | 2                | 66.7 |
| Aceite muña al 25 % | 0   | 0                    | 3           | 100                    | 0                | 0    |
| Control +           | 0   | 0                    | 0           | 0                      | 3                | 100  |
| Control -           | 3   | 100                  | 0           | 0                      | 0                | 0    |
| *HICB menor a 8mm   |   | ** HICB de 8 a 14 mm |             | *** HICB de 14 a 20 mm |                  |      |

Tabla 17: Presencia de halo de inhibición del aceite esencial de “muña- muña” contra *Bacillus cereus*.

En la tabla 17 se observa la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria de *Bacillus cereus*.. Tanto con el aceite de “muña” al 100%, 75 %, 50%, al 25 % y el control + (Tetraciclina) mostraron HICB (Halo de inhibición de crecimiento bacteriano) en la totalidad de placas. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el control – (Dimetilsulfóxido) trabajando con tres repeticiones. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* epling “muña – muña” sobre la bacteria de *Bacillus cereus* a las 24 horas; según las pautas de Duraffourd.

| Dilución  | Efectividad antibacteriana cualitativamente |      |             |      |                  |     |
|---|---|------|-------------|------|------------------|-----|
|   | Nula *                                      |      | Sensible ** |      | Muy sensible *** |     |
|   | N   | %    | N           | %    | N                | %   |
| Aceite muña al 100%   | 0   | 0    | 3           | 100  | 0                | 100 |
| Aceite muña al 75 %   | 0   | 0    | 3           | 100  | 0                | 0   |
| Aceite muña al 50 %   | 2   | 66,7 | 1           | 33,3 | 0                | 0   |
| Aceite muña al 25 %   | 3   | 100  | 0           | 0    | 0                | 0   |
| Control +   | 0   | 0    | 0           | 0    | 3                | 100 |
| Control -   | 3   | 100  | 0           | 0    | 0                | 0   |
| *HICB menor a 8mm      ** HICB de 8 a 14 mm      *** HICB de 14 a 20 mm |   |      |             |      |                  |     |

Tabla 17: Presencia de halo de inhibición del aceite esencial contra *E. coli*.

En la tabla 17 se observa la frecuencia de halos de inhibición sobre la bacteria de *E. coli* tanto con el aceite de “muña” al 100%, 75 %, 50%, al 25 % y el control + (Tetraciclina) mostraron HICB (Halo de inhibición de crecimiento bacteriano) en la totalidad de placas. Se observa que hubo ausencia de HICB en todas las placas que contenían el disco embebido con el control – (Dimetilsulfóxido) trabajando con tres repeticiones. Podemos observar la efectividad antibacteriana cualitativamente del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* epling “muña – muña” sobre la bacteria de *E. coli* a las 24 horas; según las pautas de Duraffourd.

#### 4.3. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CIM)

La CIM es la concentración más baja antibacteriana que inhibe sustancialmente el crecimiento del microorganismo detectado visualmente. Se compara el crecimiento en cada concentración de antibacteriano con el crecimiento en el tubo control de crecimiento y se califica de la siguiente manera:

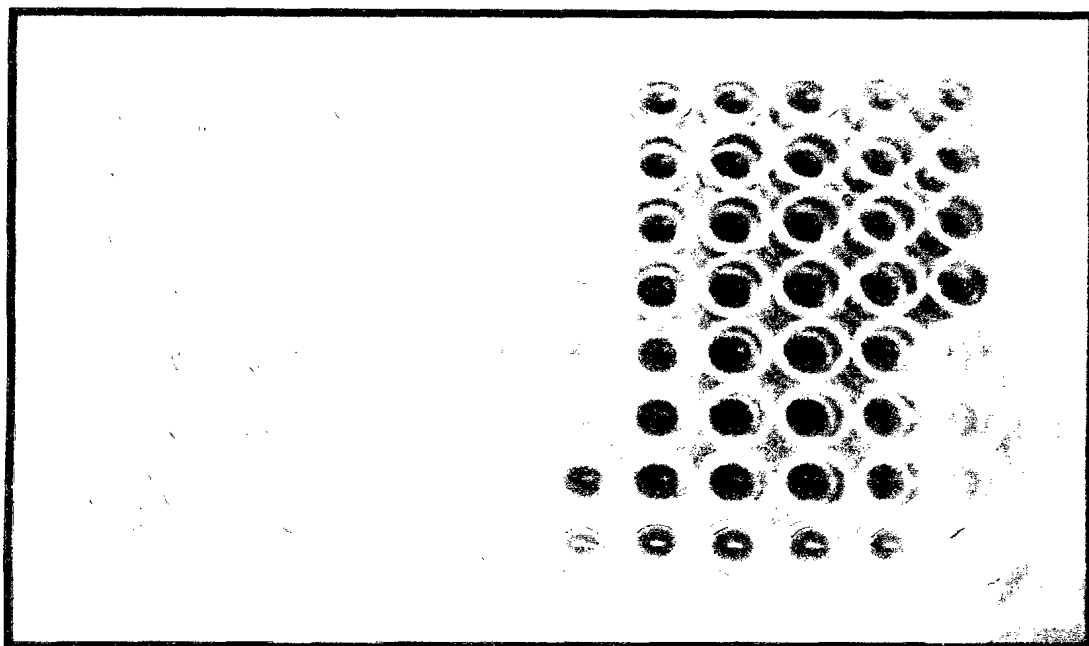


Figura 14: Concentración mínima inhibitoria (CIM) de *Listeria monocytogenes*

En la figura 14 podemos observar la concentración mínima inhibitoria (CIM) contra la *Listeria monocytogenes* utilizando aceite esencial de muña – muña diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) a diferentes concentraciones, al 5% se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 781 ppm (0.781  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), la concentración mínima inhibitoria para el 4 % es de 781 ppm (0,781  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y para la dilución del 3 % es de 938 ppm (0,938  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

La concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial muña muña sobre la cepa *Listeria monocytogenes* es CIM de 0,781  $\mu\text{l} / \text{mL}$  al 5% de concentración de aceite esencial de mua -muña, estos resultados coinciden con (Martínez J, *etal*, 2003) demuestra la concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial de mandarina variedad Dancy, la CIM para *L. monocytogenes* y *S. aureus* fue de 7%; también estos resultados concuerdan con lo encontrado de Albado et al., 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Salmonella tiphymurium*, *L. monocytogenes* con una concentración mínima inhibitoria de CIM de 0.28-1.27  $\mu\text{g} / \text{ml}$  con los aceites esenciales de ambas especies.

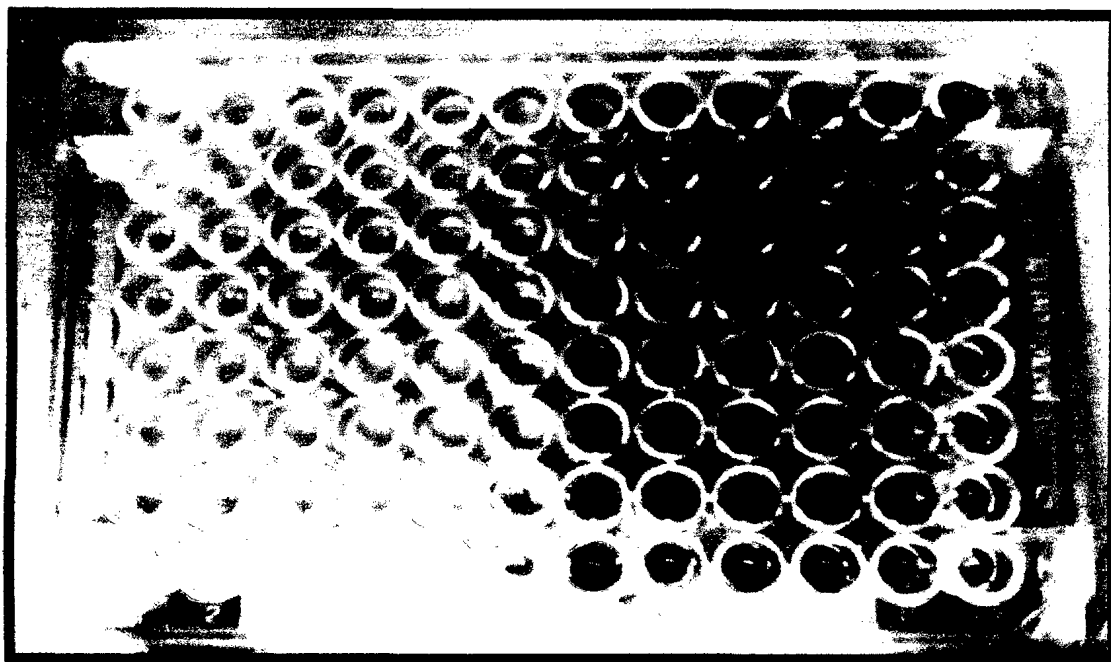


Figura 15: Concentración mínima inhibitoria (CIM) de *Echerichia coli*

En la figura 15 podemos observar la concentración mínima inhibitoria (CIM) sobre la *E. coli* utilizando 5 % de aceite esencial de muña – muña diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), que es de 1563 ppm (1,563  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), la CIM para el 4 % es de 1250 ppm (1,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y para la dilución del 3 % es de 1875 ppm (1,875  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

La concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial muña muña sobre la cepa de *E. coli* es de 1563 ppm que es 1,563  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , estos resultados concuerdan con lo demostrado por Martínez que la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto de cúrcuma sobre la cepa de *E. coli* resultó ser de 1,55  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , también estos resultados concuerdan con lo encontrado por Moreira, *et al.*, 2005, quienes evaluarón la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial sobre la cepa *E. coli* y determinarón una CIM de 0,6 mL/100 mL, también estos resultados concuerdan con lo encontrado de Albado *et al.*, 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphyurium* con una concentración mínima inhibitoria de CIM de 0.28-1.27  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , de los aceites esenciales de ambas especies.

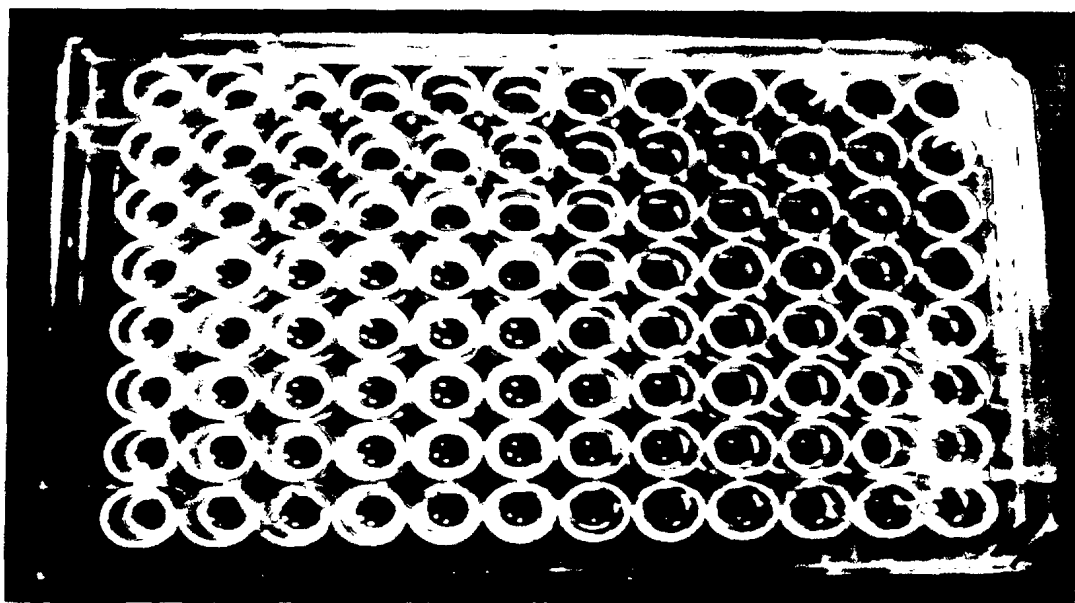


Figura 16: Concentración mínima inhibitoria (CIM) de *Bacillus cereus*

En la figura 16 podemos observar la concentración mínima inhibitoria (CIM) sobre *Bacillus cereus*. utilizando 5 %, de aceite esencial de muña – muña diluido en dimetilsulfóxido (DMSO), que es de 1563 ppm (1,563  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), la CIM para el 4 % es de 1250 ppm (1,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y para la dilución del 3 % es de 938 ppm (1,563  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

La concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial muña muña sobre la cepa *Bacillus cereus*. CIM de 1,563  $\mu\text{L} / \text{mL}$  al 5% de concentración de aceite esencial de muña- muña , es decir a las diferentes concentraciones trabajadas en porcentajes se observa la concentración mínima inhibitoria, estos resultados coinciden con (Martínez J, *et al*, 2003) demuestra la concentración mínima inhibitoria (CIM) del aceite esencial de mandarina variedad Dancy, la CIM para *Bacillus C.* fue de 9%, para *S. aureus* 7%, también estos resultados concuerdan con lo encontrado de Albado *et al.*, 2001, quienes demuestran que el aceite esencial de *O. vulgare* presenta un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, con una concentración mínima inhibitoria de CIM de 0.28-1.27  $\mu\text{g} / \text{ml}$  con los aceites esenciales de ambas especies

#### 4.4. Resultados de la concentración mínima bactericida (CBM)

La CBM es la concentración mínima bactericida que inhibe sustancialmente el crecimiento del microorganismo destruyendo a las bacterias. Se observa de la siguiente manera:

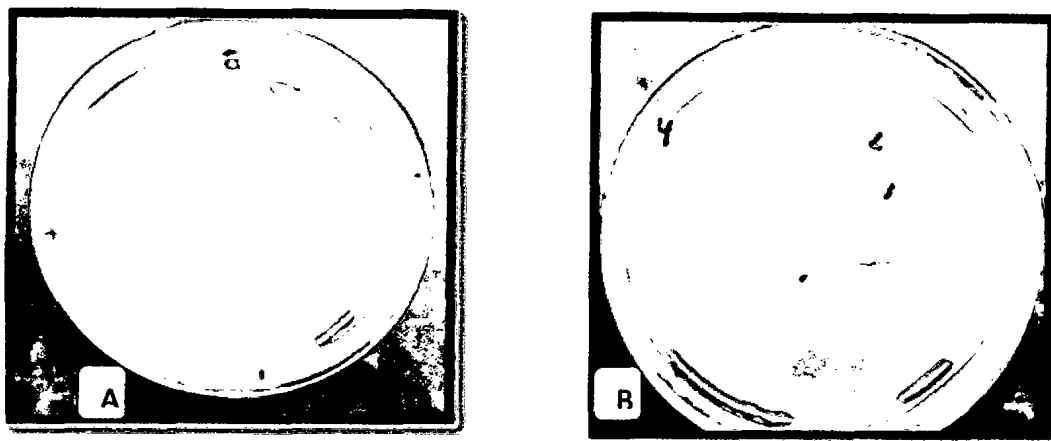


Figura 17: Concentración mínima bactericida (CBM) de la *Listeria monocytogenes* A y B.- Siembra en estrias de los pocillos considerados como CIM, observando crecimiento negativo trabajadas al 3 y 5%.

En la figura 17 se puede observar la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña- muña sobre la cepa bacteriana de *Listeria Monocytogenes* cultivada de las microplacas a partir de los pocillos que se dieron como resultado de la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima bactericida al 5 % es de 781 ppm (0,781  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), al 4 % es de 1250 ppm (1,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y al 3 % es de 938 ppm (0,938  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

La concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña - muña sobre *Listeria monocytogenes* es CBM de 0,781  $\mu\text{l} / \text{mL}$  al 5% de concentración de aceite esencial de mua -muña, estos resultados concuerdan con lo encontrado por (Martínez J, *et al*, 2003) demuestra la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de mandarina variedad Dancy, quienes demostraron la concentración mínima bactericida (CBM) contra *Listeria monocytogenes* a todas la concentraciones excepto al 1%.

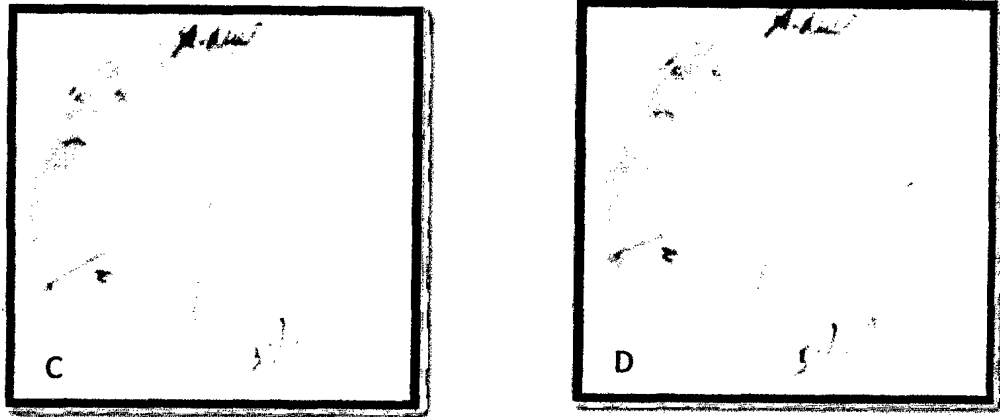


Figura 18: Concentración mínima bactericida (CBM) de *Bacillus c.* C.- Siembra en estrías de los pocillos considerados como CIM al 3 % de aceite esencial, observando crecimiento negativo. B.-La misma siembra per o trabajada al 5 %.

En la figura 18 se puede observar la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña- muña sobre la cepa bacteriana de *Bacillus Cereus* cultivada de las microplacas a partir de los pocillos que se dieron como resultado de la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima bactericida al 5 % es de 1563 ppm (1,563  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), al 4 % es de 1250 ppm (1,250  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y al 3 % es de 938 ppm (0,938  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) El aceite esencial actúa como bactericida frente a la cepa de *Bacillus cereus*.

La concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña - muña sobre *Bacillus c.* CBM de 1,563  $\mu\text{l}/ \text{mL}$  al 5% de concentración de aceite esencial de muña -muña; estos resultados concuerdan con lo encontrado por (Martínez J, *et al*, 2003) demuestra la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de mandarina variedad Dancy, quienes demostraron la concentración mínima bactericida (CBM) contra *Bacillus c.* a todas las concentraciones excepto al 1%.

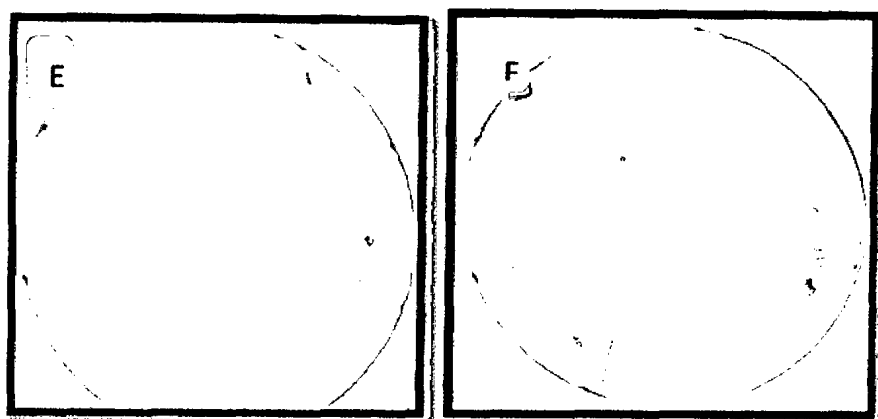


Figura 19: Concentración mínima bactericida (CBM) de *E. coli*. E.- Siembra en estrías de los pocillos considerados como CIM al 3 % de aceite esencial, observando crecimiento positivo en el primer pocillo. F.-La misma siembra pero trabajada al 5 %.

En la figura 19 se puede observar la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña- muña sobre la cepa bacteriana de *E. Coli* cultivada de las microplacas a partir de los pocillos que se dieron como resultado de la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima bactericida al 5 % es de 3125 ppm (3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), al 4 % es de 2500 ppm (2,500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y al 3 % es de 3750 ppm (3,750  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). El aceite esencial actúa como bactericida frente a la cepa de *E. coli*.

La concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña - muña sobre la cepa de *E. coli* es de 3,125  $\mu\text{l}/ \text{mL}$ ; estos resultados concuerdan con lo demostrado por Martínez que la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de cúrcuma frente a la cepa de *E. coli* es de 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$

| Cepa bacteriana               | CIM (ppm) |      |      | CBM (ppm) |      |      |
|-------------------------------|-----------|------|------|-----------|------|------|
|                               | 5%        | 4%   | 3%   | 5%        | 4%   | 3%   |
| <i>Bacillus cereus</i>        | 1563      | 1250 | 938  | 1563      | 1250 | 938  |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 781       | 781  | 938  | 781       | 781  | 938  |
| <i>E. Coli</i>                | 1563      | 1250 | 1875 | 3125      | 2500 | 3750 |

Tabla 18: Concentración mínima inhibitoria (CIM) y Concentración mínima

bactericida (CBM) para el aceite esencial probado sobre las tres cepas bacterianas.

En la tabla 18 se puede observar la concentración mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM) del aceite esencial de muña- muña sobre las cepas bacterianas cultivada en microplacas a partir de diferentes porcentajes de concentración.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

La actividad antibacteriana del aceite esencial de de muña – muña de nombre científico de *Satureja brevicalyx* epling extraído por el método de destilación con agua y vapor en un equipo de destilación de acero inoxidable, ya sea puro o diluido con dimetilsulfóxido (DMSO), existe actividad antimicrobiana y su efecto frente a las bacterias patógenas, la actividad se observó por la presencia de halos transparentes mayores de 6 mm alrededor de cada disco de papel whaman en las placas utilizadas en el ensayo.

Se concluye que el aceite esencial de muña – muña puro y a diferentes concentraciones actúa como agente bactericida frente a las cepas de *E. coli*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, es un antimicrobiano efectivo contra bacterias gram positivas y gram negativa; la sensibilidad se encuentra dentro de las diluciones propuestas.

Al ser analizados estadísticamente, los resultados de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de muña - muña fueron significativos, pese a que la efectividad del aceite esencial fue evidente en el laboratorio. Esto podría deberse a una sensibilidad intrínseca del microorganismo dentro del procedimiento en el ensayo cuando los resultados concordaron en todas las repeticiones hechas para este experimento.

De acuerdo a los resultados obtenidos del diámetro de inhibición se determino que cuando mayor es la zona de inhibición mayor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento. Entonces es probable que un halo de inhibición entre 11,67 – 21,67 mm que presenta el aceite y se encuentre en un porcentaje de concentración de 50 % al 100 % de aceite esencial.

El aceite esencial de muña – muña presenta las siguientes CIM: Para la bacteria *listeria monocytogenes* es a partir del 3 % desde 938 ppm, 5 % desde 1563 ppm; para *bacillus cereus* es a partir del 3 % desde 938 ppm, 5 % desde 781 ppm.

Se observa el comportamiento de cada una de las cepas inhibidas por el aceite esencial de muña - muña. El comportamiento de las cepas estudiadas trabajadas a diferentes concentraciones de aceite esencial para la determinación de CIM y la CBM varía de acuerdo a la estructura de la bacteria que se trabaja los valores obtenidos en el crecimiento bacteriano con respecto a las concentraciones de aceite de 5, 4 y 3% son diferentes.

Se observa que las concentraciones a las que ejercieron inhibición los aceites son similares, en cuyo caso, la CMI también correspondió a la CMB; a diferencia de los valores obtenidos la bacteria de la *E. coli* el CMB fue mayor.

Se demuestra que a la concentración utilizada en dilución con dimetil sulfoxido (DMSO) del 25% existe inhibición contra las tres cepas utilizadas, también podemos observar que el DMSO no inhibe ni altera el comportamiento del crecimiento de las cepas utilizadas.

## 5.2 Recomendaciones

- ❖ Se recomienda continuar con el estudio fitoquímico de las especies vegetales nativas de nuestra variada flora.
- ❖ Continuar la investigación del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* en otras cepas bacterianas y fúngicas.
- ❖ Realizar estudios aplicativos utilizando películas comestibles impregnadas con aceite esencial.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, Robert. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. Allured Publishing Corporation, 469 p.
2. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Decimoquinta ed. pp 344. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C. E. U.
3. Arcila, C.; Cristina, L.; Piña, G. Lecom, U.S. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. ALAN Mar.
4. Azcón, J., Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. 1ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid: 261p.
5. Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., y Fernández, G. 2001. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
6. Azcón, J., Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. 1ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid: 261p.
7. Bandoni, A. 2002. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.
8. Bauer A., et al. (1966). Suceptibilidad de antibioticos por estandarizacion de diferentes métodos. J. Clin. Pathol.
9. Burzaco V, Pérez A, Velasco N. 1992. Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas con pulegona: *Mentha pulegium* L. y *Mentha cervina* (L.) Fresen. BotComplutensis.
10. Bravo O, Hernández E, Tereschuk L, Romero A, Abdala R. 2004. *Minthostachys mollis* griseb y *Lepechinia meyenii* walp epling: actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. Revista del CIZAS.
11. Cano C. 2007. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Tesis de



- maestría para Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Lima: UNMSM.
12. Carrillo, A., Brió, S., Quindós, G. (2001). Una nueva generacion de farmacos antifungicos. Rev. Iberoam. Micol.
  13. Carhuapoma M. 2002. Plantas Medicinales Aromáticas Nativas de la Provincia de Huamanga y sus Perspectivas Económicas. UNSCH, Ayacucho.
  14. Carhuapoma Y. 2006. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”. UNMSM, Lima.
  15. Checira, G.; Lozano, Z. 1992. Estudio de la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales (Lepechina, mejorana, romero y salvia). Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.
  16. Contreras G. 1983. Actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. Tesis de bachiller para Biólogo. Lima: UNALM.
  17. Díaz K. 2005. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis de bachiller para Cirujano Dentista. Lima: UNMSM.
  18. Durán, D. 2005. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander.
  19. Diez M. 2002. Efecto antiespasmódico de la wayra muña *Satureja brevicalyx* Epl sobre intestino aislado de cobayo. UNSCH, Ayacucho.
  20. Flores G., J. Morales C., Delgado L., Gallegos I. 2005. Empaque con actividad antimicrobiana a partir de aceite esencial de orégano. Instituto Tecnológico de Durango. División de Estudios de Postgrado e Investigación.

21. Fuertes C y Munguía Y. 2000. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación IV* (1): 23-39.
22. Frazier, W. C, Westhoff D.C. 1988. “Microbiología de los alimentos”. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
23. Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de Microbiología. Tercera Edición. Barcelona; Masson S. A.; 2005
24. García, R.; Herrera F. 2007. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *allium sativum*, *allium fistulosum* y *allium* cepa. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Colombia.*
25. Güisa D y Rincón L. 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Tesis de bachiller para Microbiólogo industrial. Bogotá: PUJ.
26. Gupta, M. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda. Bogotá, Colombia.
27. Gómez Ana L. 2006. Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de piperáceas. Tesis para optar título química farmacéutica. Guatemala. Universidad nacional de Guatemala.
28. Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., y Wyllie, S. G., Warmington, J. R. 1998. Efecto del aceite de té verde frente a *E. Coli*
29. Hammer, K. A., Carson, C.F. y T.V. Riley. 1999. Actividad antimicrobiana del aceite esencial sobre tres plantas aplicado en análisis de microbiología.
30. Inga A y Guerra B. 2000. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de bachiller para Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM.

31. Jimenez, G. A. 2008. Patologías más importantes transmitidas a través de los alimentos. Tema10.
32. Martinez M. Alejandro. 2003. Aceites Esenciales, Facultad Química Farmacéutica Medellín Colombia.
33. Martínez, J., Sulbarán B., Ferrer A.; Nava R. 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. Revista de la Facultad de Agronomía. Caracas – Venezuela.
34. Miembros de la ICMSF. 2000. Microorganismos de los alimentos1. Ed. Acribia, S.A., 2<sup>a</sup> ed. U.S.A.
35. Morales A, Castañeda ML, Blanco KM, Cárdenas C, Reyes J, Kouznetsov V. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica.
36. Muñoz, L. F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 4aEd.
37. NCCLS. 1999. Instituto nacional de enfermedades infecciosas. Métodos estandarizados para la determinacion de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales. Documento m31-a.
38. NCCLS. 2005 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—tenth edition. NCCLS document M7-A10. USA
39. Norman, W. D.1998. “Elementos de Tecnología de alimentos”. 13<sup>a</sup> edición. Compañía editorial Continental S.A. de C.V. México.
40. Oblitas E. 1998. Plantas medicinales en Bolivia: farmacopea Callawaya. 2° Edición. La Paz: Editorial los amigos del libro.
41. Oussalah, M., Caillet, S., y Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J. Food
42. Palacios E, Mendoza A, Salcedo D. 2004. Efecto bactericida in vitro de *Minthostachys mollis* (muña) frente a Streptococos orales. Instituto de Investigación Estomatológica. Lima: UNMSM.

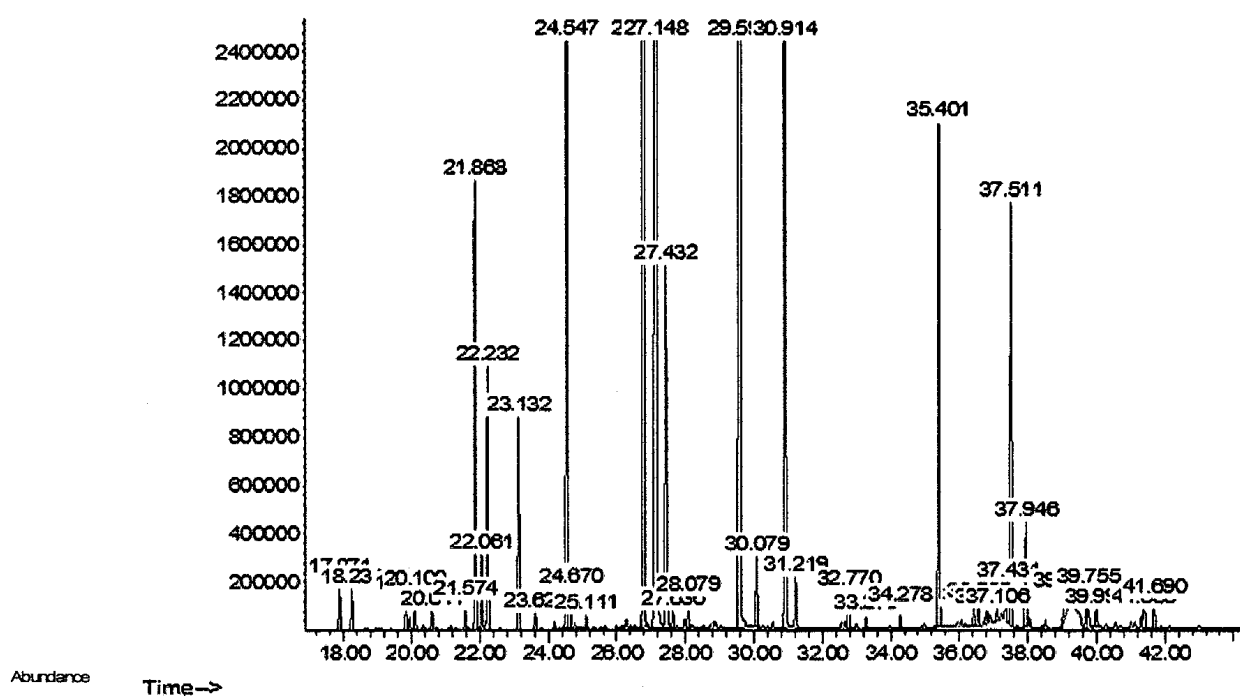


43. Pérez, A. T.F. 2006. “Efectividad de aceites de tomillo y orégano como agentes antibacterianos”. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.
44. NCCLS. 1992. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing. Document M100 - s4.
45. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica. Primera Edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial Kier.
46. Robert, O. K. 2001. Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2a Ed., p.p. 3 -18 y 175 – 200.
47. Stella, L.; Marin, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira.
48. Stashenko, E; Combariza, J.; Puertas, M. 1998. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Cromatografía, UIS.
49. Soto V. 1999. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”. UNSCH, Ayacucho.
50. Salmón L. 1983. Contribución al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* KuntGriseb "Muña" en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. Lima.
51. Segovia I., Suarez L. 2010. Composición química del aceite esencial de tagetes elíptica Smith “Chincho” y la determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica. UNMSM. Lima
52. Terradez, G. M. Análisis de componentes principales. Disponible en Internet: [www.uoc.edu.pe](http://www.uoc.edu.pe).
53. Zekaria D.2007. Los aceites esenciales, una alternativa a los Antimicrobianos. (Monografía en Internet) Laboratorios Calier.
54. Yarseny R. (2005) “Determinacion de la actividad biocida del extracto etanolico y sus particiones (hexanica, cloroformica, acetate de estilo y acuosa) de hojas de *Cornutia pyramidata* l.(Jorobté)” Universidad de San Carlos de Guatemala.



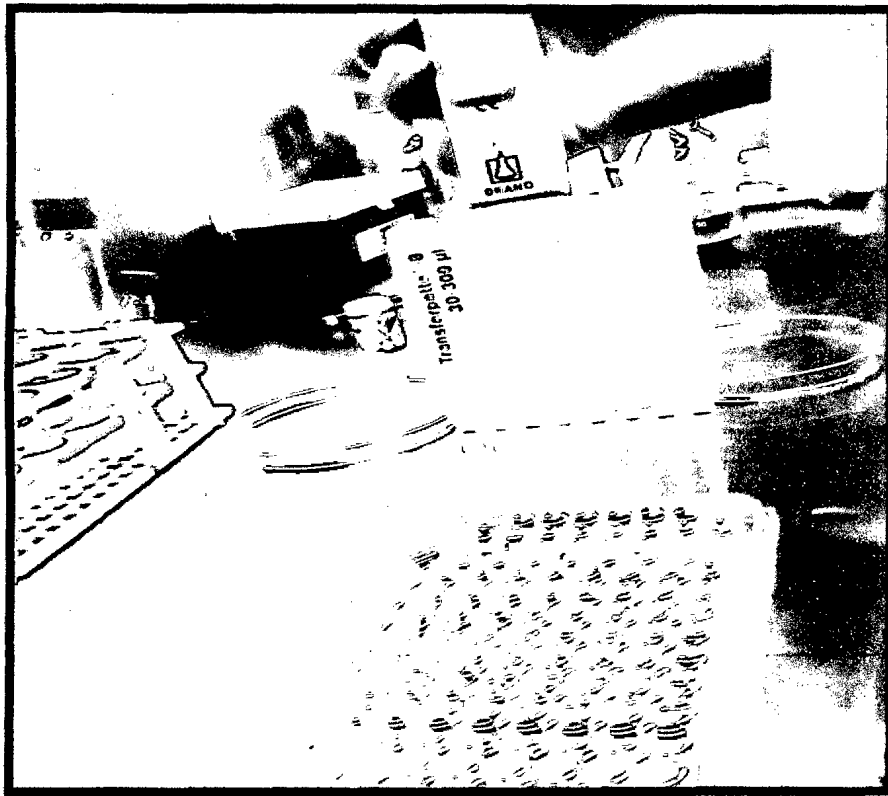
## ANEXOS I

**Figura 12.** Cromatograma del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. Los tiempos de retención de cada compuesto están definidos por un número específico para cada pico, la abundancia del compuesto está dada por la altura del pico para cada compuesto específico.

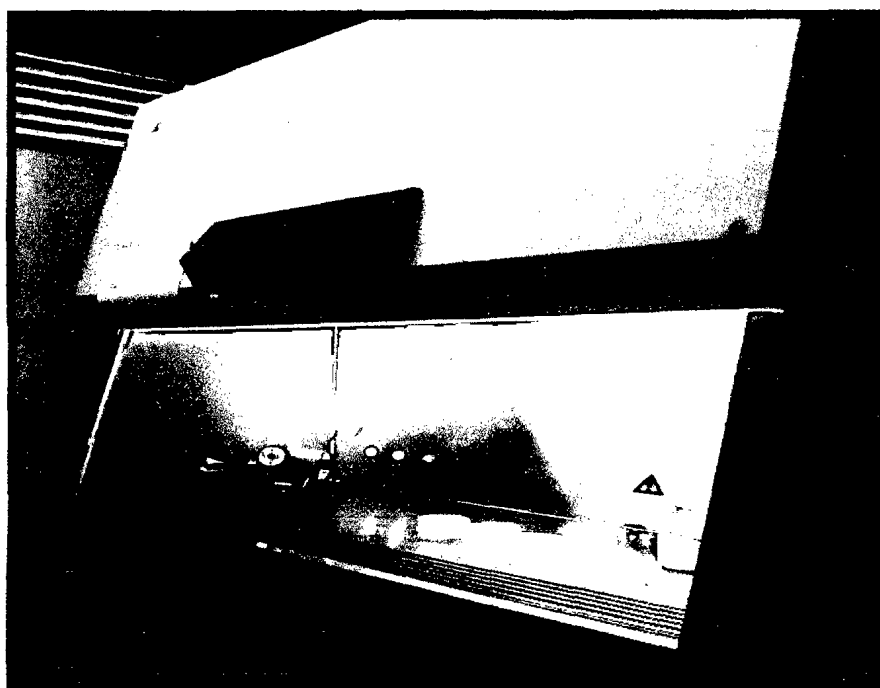


## ANEXO II

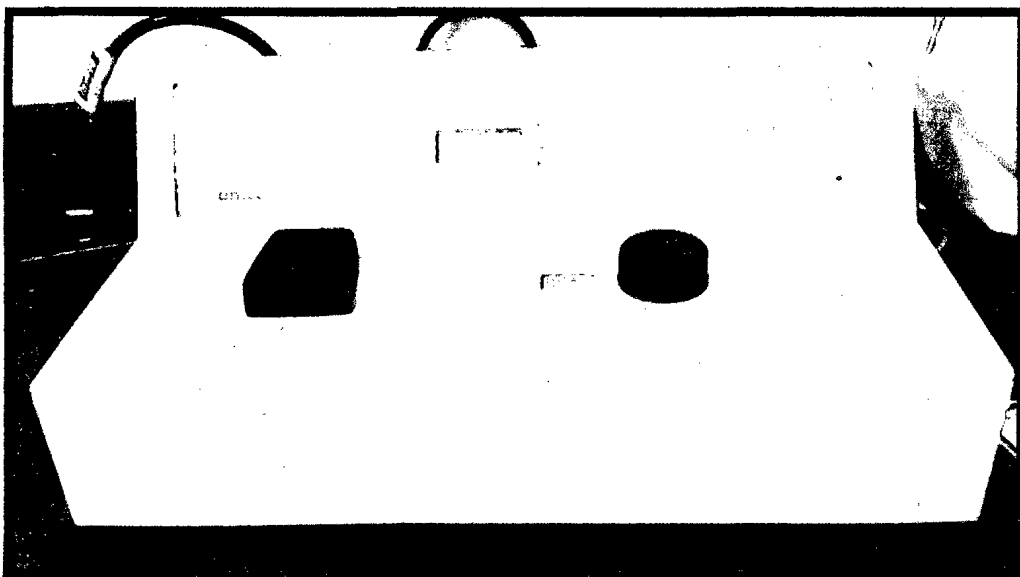
Pipeta multicanal (30 - 300  $\mu$ L) transferpette y microplacas de 96 pozillos



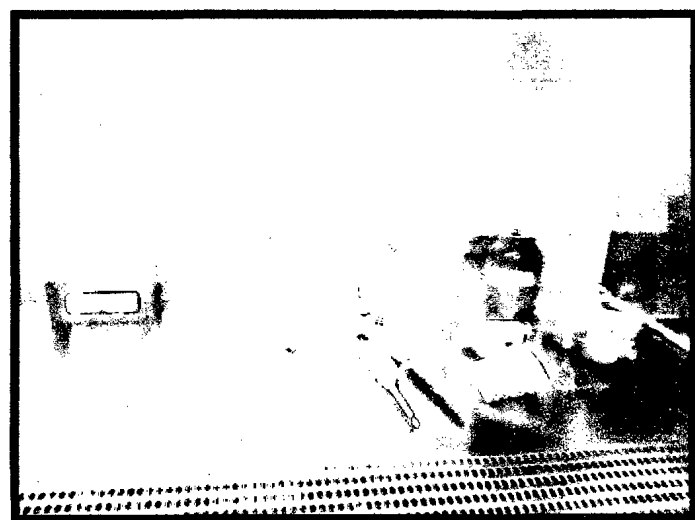
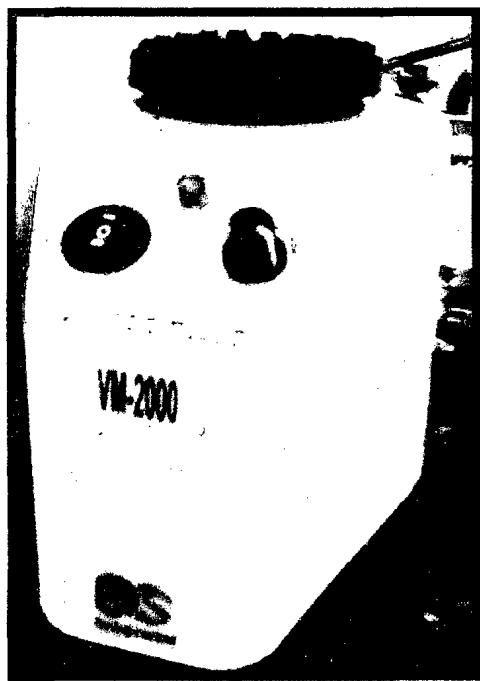
Cabina de bioseguridad de clase II



Espectrofotómetro (rango de luz visible)



Agitador Vortex 2000rpm



### ANEXOS III

#### A. Métodos de análisis físicos del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* epling “Muña - Muña”

##### a. Determinación de la densidad

Descripción del método: Según NTP 319.081:1974.

Antes de utilizar el picnómetro debe ser lavado cuidadosamente con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, luego enjuagarlo meticulosamente con agua corriente y después agua destilada. Finalmente se debe secar en la estufa, enfriado en un desecador conteniendo material deshidratante.

Pesar el picnómetro limpio y seco (W1).

Llenar el picnómetro con agua destilada recientemente hervida (libre de aire) y enfriada 2 a 3 grados por debajo de la temperatura a la cual se va determinar la gravedad específica.

Colocar la tapa del picnómetro y colocarlo en baño maría mantenida a la temperatura deseada (20 °C).

Parte del agua saldrá por el capilar de la tapa, esto permite asegurar el llenado.

Después que el picnómetro y su contenido han alcanzado su temperatura de baño, el agua que rebalsa a través de la tapa debe ser limpiado rápidamente con el papel filtro, evitando que el papel absorba parte del agua del picnómetro.

Retirar el picnómetro del baño maría y secarlo con una toallita.

Colocar la cubierta o capuchón sobre la tapa tan pronto se retire el picnómetro del baño para evitar la evaporación.

Después que el exterior del picnómetro ha sido secado, pesar el picnómetro conteniendo el agua de inmediato (W2).

Proceder de la misma manera con el aceite esencial cuya densidad específica se desea determinar.

Cálculos:



$$\text{Densidad específica} = (W3 - W1) / (W2 - W1)$$

Donde:

W1: Peso del picnómetro vacío en gramos.

W2: Peso del picnómetro mas agua destilada en gramos.

W3: Peso del picnómetro mas el aceite esencial a una temperatura de 20 ° C.

#### **b. Determinación del índice de refracción**

Descripción del método: Según NTP 319.075:1974,

Colocar el refractómetro ABBE de mesa y manual en un lugar iluminado con luz difusa o frente a una fuente de luz artificial.

Con la ayuda de un gotero colocar la muestra sobre el prisma del refractómetro.

Medir y registrar la concentración de azúcar de la muestra (°Brix), y el índice de refracción, a 20 °C de temperatura.

Lavar bien el prisma del refractómetro ABBE.

