

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO
DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE MUÑA (*Satureja brevicalyx*) FRENTE A
Escherichia coli ATCC, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*

TESIS

PRESENTADO POR:

Bachiller GRÉGORY MOISÉS RODAS TANTALLA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ABANCAY - PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL




TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO
DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE MUÑA (*Satureja brevicalyx*) FRENTE A
Escherichia coli ATCC, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae***


Presentado por el Bachiller **Grégory Moisés Rodas Tantalla**, para optar el Título de **Ingeniero Agroindustrial**, el cual fue sustentado y aprobado el 18 de diciembre del año 2018, ante el jurado evaluador conformado por:

Presidente:



Ing. Ruth Mery Ccopa Flores

Primer miembro:



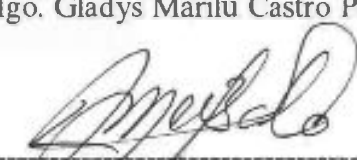
Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres

Segundo miembro:



Msc. Blgo. Gladys Marilú Castro Pérez

Asesor:



Dr. Quim Melquiades Barragan Condori

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater, la UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC.

A mis docentes catedráticos de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA.

Al Dr. Ing. Waldir Desiderio Estela Escalante; profesor, asesor y excelente investigador, quien me inculcó a través del ejemplo, optar por el camino de la investigación científica.

Al Dr. Quím. Melquiades Barragán Condori; profesor, asesor y amigo, por su siempre atento apoyo académico en el desarrollo de mi investigación.

Al Mgt. Blgo. Max Carlos Ramírez Soto; amigo y asesor, quien motivó, mi incursión en el mundo de la investigación científica.

Al M.Cs. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera; docente investigador asociado al herbario Vargas (CUZ).

Al Quím. Jorge Choquenaira Parí; Jefe del laboratorio de Análisis Cromatográfico de la UNSAAC.

Al Blgo. Darwin Pezo Ochoa, Director de Epidemiología de la Dirección Regional de Salud de Apurímac.

A la Blga. Sirley Alegría Amudio; Directora del Laboratorio Referencial en Salud Pública de la DIRESA – Apurímac.

A los miembros del jurado evaluador del presente trabajo: Ing. Ruth Mery Ccopa Flores, Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres, Blgo. Gladys Marilú Castro Pérez y Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres; por sus sugerencias para la mejora del trabajo de investigación.

A mis familiares, amigos y aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a la ejecución del presente trabajo de investigación científica.



DEDICATORIA

A mis progenitores, Moisés Rodas Enciso y Benigna Tantailla Barazorda, por dedicarme su atención, cariño y comprensión, con los cuales desarrollé virtudes que hoy me permiten alcanzar metas y objetivos.

A quienes con sabiduría de investigadores, depositaron en mí curiosidad, la pasión por el conocimiento científico.

A todos aquellos que se dignen por nutrir sus conocimientos, a través de las consideraciones distinguidas de este generoso aporte.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	iv
LICENCIA DE PUBLICACIÓN	vi
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2.1. Problema general	4
1.2.2. Problemas específicos	5
1.3. OBJETIVOS	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	6
1.5. DELIMITACIÓN	6
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1. ANTECEDENTES	8
2.2. MARCO REFERENCIAL	12
2.2.1. Microorganismos empleados en las pruebas antimicrobianas.....	12
2.2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.1.2. <i>Salmonella</i>	14
2.2.1.3. <i>Shigella</i>	16
2.2.2. Aspectos generales de la especie vegetal en estudio: <i>Satureja brevicalyx</i>	18
2.2.2.1. Taxonomía	18
2.2.2.2. Descripción botánica	18
2.2.2.3. Diversidad del género	19

2.2.2.4. Distribución geográfica	19
2.2.2.5. Propiedades y usos	19
2.2.2.6. Estudios fitoquímicos	20
2.2.2.7. Estudios farmacológicos	20
2.2.3. Aceites esenciales	20
2.2.3.1. Definición	20
2.2.3.2. Composición química.....	21
2.2.3.3. Clasificación de los aceites esenciales	22
2.2.3.4. Características fisicoquímicas de los aceites esenciales.....	23
2.2.3.5. Mecanismos de acción de los aceites esenciales	25
2.2.3.6. Factores que afectan la actividad de los aceites esenciales	26
2.2.3.7. Estudios sobre el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales ...	27
2.2.3.8. Aplicaciones de los aceites esenciales como antimicrobianos	28
2.2.4. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales	30
2.2.4.1. Cromatografía de gases	31
2.2.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	32
2.3. DEFINICIÓN DE TERMINOS	33

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	35
3.1.1. Tipo de investigación	35
3.1.2. Diseño de investigación	35
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	36
3.2.1. Población	36
3.2.2. Muestra	36
3.3. DEFINICIÓN DE VARIABLE	36
3.3.1. Variables independientes	36
3.3.2. Variable dependiente	36
3.3.3. Covariables	36
3.4. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES	37
3.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	37
3.5.1. Hipótesis general	37
3.5.2. Hipótesis específicos	37

3.6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS DE INVESTIGACIÓN	38
3.6.1. Materiales para la extracción del aceite esencial	38
3.6.2. Equipos para la extracción del aceite esencial	38
3.6.3. Materiales e insumos para la caracterización fisicoquímica del aceite	38
3.6.4. Equipos para la caracterización fisicoquímica del aceite esencial	39
3.6.5. Materiales para evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial	39
3.6.6. Equipos para evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial	40
3.6.7. Indumentaria	41
3.7. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	41
3.7.1. Lugar de investigación	41
3.7.2. Recolección de la especie vegetal	41
3.7.3. Preparación de la muestra vegetal	41
3.7.4. Identificación taxonómica de la especie vegetal	42
3.7.5. Extracción del aceite esencial	42
3.7.6. Determinación del rendimiento de extracción del aceite esencial	42
3.7.7. Determinación de las características fisicoquímicas del aceite esencial	43
3.7.7.1. Densidad relativa	43
3.7.7.2. Solubilidad en etanol	43
3.7.7.3. Índice de refracción	44
3.7.7.4. Índice de acidez	44
3.7.8. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial	44
3.7.9. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial	45
3.7.9.1. Preparación de las cepas bacterinas	45
3.7.9.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	46
3.7.9.3. Determinación de la concentración mínima bactericida	49
3.8. TRATAMIENTO DE DATOS	50
3.8.1. Recolección de datos	50
3.8.2. Análisis estadístico de datos	50

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS	51
4.1.1. Rendimiento de la extracción del aceite esencial	51
4.1.2. Características fisicoquímicas del aceite esencial	51
4.1.3. Componentes químicos mayoritarios del aceite esencial	52

4.1.4. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial	53
4.1.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	54
4.1.4.2. Determinación de la concentración mínima bactericida	56
4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	61
4.2.1. Extracción del aceite esencial.....	61
4.2.2. Caracterización fisicoquímica del aceite esencial	61
4.2.3. Efecto antibacteriano del aceite esencial	63

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES	66
5.2. RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	82
ANEXO 1. Constancia de identificación de la especie <i>Satureja brevicalyx</i>	83
ANEXO 2. Constancia de análisis cromatografico del aceite esencial	84
ANEXO 3. Cromatograma de análisis del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	86
ANEXO 4. Constancia de pruebas microbiológicas realizadas en Laboratorio.....	87
ANEXO 5. Resultados de lecturas espectrofotométricas de las microplacas.....	88
ANEXO 6. Panel fotográfico	89
ANEXO 7. Resultados del análisis estadístico.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1.	Diseño del efecto antibacteriano del aceite esencial por microdilución	35
Tabla 2.	Operacionalización de variables	37
Tabla 3.	Preparación de concentraciones del aceite esencial	46
Tabla 4.	Características fisicoquímicas del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	52
Tabla 5.	Componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> según las librerías NIST v 0.5 a.L.	53
Tabla 6.	Promedio de lecturas espectrofotométricas de las placas de microdilución luego de los ensayos del efecto antibacteriano de los tratamientos del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> sobre las bacterias sometidas	55
Tabla 7.	Resumen de las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> obtenidas mediante el lector de microplacas	56
Tabla 8.	Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del aceite de <i>Satureja brevicalyx</i>	57

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Microscopia electrónica de <i>Escherichia coli</i>	13
Figura 2.	Microscopia electrónica de <i>Salmonella</i>	14
Figura 3.	Microscopia electrónica de <i>Shigella</i>	16
Figura 4.	Esquema de un cromatógrafo de gases	31
Figura 5.	Bloques principales de un GC-MS	32
Figura 6.	Esquema de preparación de las concentraciones del aceite esencial	47
Figura 7.	Aceite esencial obtenido de hojas secas de <i>Satureja brevicalyx</i>	51
Figura 8.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	54
Figura 9.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> sobre <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella dysenteriae</i>	55
Figura 10.	Efecto bactericida del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella dysenteriae</i>	57
Figura 11.	Análisis de varianza de las absorbancias resultantes, por cada especie	58
Figura 12.	Análisis de varianza de las CMI's resultantes, con respecto a cada especie ...	59
Figura 13.	Análisis de varianza de las absorbancias con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	59
Figura 14.	Análisis de varianza de las absorbancias con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de <i>Shigella dysenteriae</i>	60
Figura 15.	Análisis de varianza de las absorbancias con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de <i>Salmonella typhi</i>	60
Figura 16.	Cromatograma de los componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> analizados por cromatografía de gases.....	86
Figura 17.	<i>Satureja brevicalyx</i> (Epling) Harley & Granda.....	89

Figura 18. Recolección de ramas de <i>Satureja brevicalyx</i> en campo	89
Figura 19. Destilación del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	90
Figura 20. Resultados de la solubilidad del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	90
Figura 21. Determinación del índice de refracción del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	91
Figura 22. Ingreso de muestras del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> al cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas para el análisis de sus componentes químicos.....	91
Figura 23. Analizando los componentes químicos del aceite esencial de <i>S. brevicalyx</i> mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas. ...	92
Figura 24. Diluciones dobles de Caldo Mueller Hinton para ensayos de dilución en microplacas	92
Figura 25. Adición de Caldo Mueller Hinton a cada pocillo de la microplaca para la prueba antibacteriana por el método de microdilución	93
Figura 26. Adición de inoculos bacterianos para la prueba del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i>	93
Figura 27. Placas de microdilución ensayadas ingresando a incubador	94
Figura 28. Lectura de placas de microdilución mediante lector ELISA	94
Figura 29. Analisis de varianza del diseño de bloques completos al azar	95
Figura 30. Analisis de varianza de las absorbancias con respecto a los bloques	95
Figura 31. Analisis de varianza con respecto a las cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922	96
Figura 32. Analisis de varianza con respecto a las cepas de <i>Salmonella typhi</i>	96
Figura 33. Analisis de varianza con respecto a las cepas de <i>Shigella dysenteriae</i>	97

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Significado	Abreviatura/Símbolo
Aceite esencial	AE
Aceites esenciales	AEs
Altamente significativo	**
Análisis de varianza	ANOVA
Caldo Mueller Hinton	CMH
Coefficiente de determinación ajustado	R^2_{aj}
Coefficiente de determinación	R^2
Coefficiente de variabilidad	CV
Cuadrado medio	CM
Concentración mínima inhibitoria	CMI
Concentración mínima bactericida	CMB
Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	GC/MS
Detector selectivo de masas	MSD
Dirección Regional de Salud	DIRESA
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	ELISA
Fase estacionaria	f.e.
Grados centígrados	°C
Grados de libertad	GL
Gramos	g
Gramos por mililitro	g/mL
Organización Internacional de Normalización	ISO
Kilogramo	Kg
Materia prima	MP
Mililitros	mL

Litro	L
Partes por millón	ppm
Nanometros	nm
No significativo	NS
Número de repeticiones	n
Metro	m
Microgramos	µg
Microgramos por mililitro	µg/mL
Organización Mundial de Salud	OMS
Partes por millón	ppm
Porcentaje de rendimiento del aceite esencial	%RAE
Presión	P
Segundo	s
Significancia	Sig
Significativo	*
Suma de cuadrados	SC
Temperatura	T
Tiempo	t
Unidad formadora de colonias	UFC
Universal Transversal de Mercator	UTM
Unidad de masa atómica	uma ó u
Valor calculado de F	Fo
Valor de P obtenido en software estadístico	p-valor
Valor estadísticamente significativo	$p \leq 0.05$
Proporción volumen-volumen	(v/v)
Proporción peso-volumen	(p/v)

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO
DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE MUÑA (*Satureja brevicalyx*) FRENTE A
Escherichia coli ATCC, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la disminución de la calidad nutricional de los alimentos, la intoxicación alimentaria, el deterioro de los alimentos y otras enfermedades relacionadas con los alimentos son causados principalmente por un grupo de patógenos transmitidos por los alimentos. Los conservantes sintéticos y los métodos físicos están siendo utilizados por diversas industrias alimentarias para evitar la contaminación y preservar los alimentos de estos patógenos nocivos. Sin embargo, muchas de las técnicas y productos químicos aplicados son ineficaces que provocan problemas de salud y efectos secundarios, que afectan la seguridad de los alimentos y la de los consumidores, ⁽¹⁾ más aun cuando los patógenos van adquiriendo mayor resistencia a los conservantes sintéticos, que en numerosos informes reportaron ser los responsables de padecimientos cancerígenos y teratogénicos debido a la toxicidad residual que les caracteriza. ⁽²⁾ Por tanto, el aumento de conciencia entre los consumidores con respecto al uso de productos naturales en la conservación de alimentos viene obligando a las industrias de alimentos a buscar conservantes naturales alternativos como fuente de sustancias bioactivas potenciales para su uso en el procesamiento y conservación de alimentos, al tiempo que aumentan la vida útil de los alimentos; ⁽³⁾ por ser éste, el método de inhibición del crecimiento microbiano más apropiado para los alimentos. ⁽⁴⁾

La búsqueda de mayor conocimiento sobre los componentes bioactivos de las plantas aromáticas, ha despertado el interés para plantear como objetivo; extraer, caracterizar y evaluar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) frente a patógenos de interés alimentario; siendo este, un estudio pionero para obtener mayor conocimiento sobre las propiedades antimicrobianas de plantas aromáticas que podrían ser aplicados para la conservación de los alimentos.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue extraer, caracterizar y evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas secas de *Satureja brevicalyx* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*. Las hojas fueron recolectadas a una altitud de 3,910 metros del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay, departamento de Apurímac. El aceite esencial fue extraído mediante destilación por arrastre con vapor de agua, luego caracterizado mediante ensayos fisicoquímicos y analizados su composición química por cromatografía de gases y detectado por espectrometría de masas (GC-MS). El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* fue evaluado por microdilución en caldo, resultando ser más sensible *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Shigella dysenteriae* con una CMI y CMB de 200 µg/mL para ambas especies bacterianas y con respecto a *Salmonella typhi* con una CMI de 800 µg/mL y CMB de 1600 µg/mL, dichos valores responden principalmente a la acción sinérgica que ejercieron los monoterpenos oxigenados como pulegona (55.78%), mentona (10.57%), timol (6.71%), linalol (4.28%), isopulegona (3.38%), eucaliptol (1.68%) y terpineol acetate (1.53%); que representan el 86.09% de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *S. brevicalyx*, los cuales le otorgaron una densidad de 0.925 g/mL a 20 °C, índice de acidez 0.102, índice de refracción 1.4859 y una solubilidad al 80% de etanol. Estos resultados demuestran que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* tiene alta actividad biológica frente a patógenos de interés alimentario, que podría ser utilizado para mejorar la inocuidad y tiempo de vida útil de productos alimenticios.

PALABRAS CLAVE: Muña, *Satureja brevicalyx*, aceite esencial, efecto antibacteriano, microdilución en caldo, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*.

ABSTRACT

The aim of the present study was to extract, characterize and evaluate the antibacterial effect of the essential oil of dried leaves of *Satureja brevicalyx* against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae*. The leaves were collected at an altitude of 3,910 meters from the district of Curahuasi, province of Abancay, department of Apurimac. The essential oil was extracted by steam distillation, then characterized by physical tests and analyzed for its chemical composition by gas chromatography and detected by mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial effect of the essential oil of *Satureja brevicalyx* was evaluated by microdilution in broth, being more sensitive *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Shigella dysenteriae* with a CMI and CMB of 200 $\mu\text{g/mL}$, for both bacterial species and with respect to *Salmonella typhi* with a CMI of 800 $\mu\text{g/mL}$ and CMB of 1600 $\mu\text{g/mL}$, these values respond mainly to the synergistic action exerted by oxygenated monoterpenes such as pulegone (55.78%), menthone (10.57%), thymol (6.71%), linalool (4.28%), isopulegone (3.38%), eucalyptol (1.68%) and terpineol acetate (1.53%); which represent 86.09% of the major components of the essential oil of *Satureja brevicalyx*, which gave it a density of 0.925g/mL at 20 ° C, an acid number 0.102, a refractive index of 1.4859 and an 80% solubility of ethanol. These results show that the essential oil of *Satureja brevicalyx* has high biological activity against pathogens of food interest, which could be used to improve the safety and shelf life of food products.

KEYWORDS: Muña, *Satureja brevicalyx*, essential oil, antibacterial effect, microdilution in broth, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En la industria de alimentos, las bacterias patógenas ocasionan pérdidas económicas, no solo porque deterioran productos, sino que además son difíciles de eliminarlos, en consecuencia son los causantes de enfermedades infecciosas en los consumidores. Una fuente de contagio con bacterias patógenas es, a través del consumo de alimentos con poca estabilidad microbiológica, y para evitar dicho contagio, se vienen aplicando conservantes sintéticos como benzoatos, nitritos, sorbatos, sulfitos, entre otros; a fin de garantizar la inocuidad de los alimentos procesados, de los cuales numerosos informes responsabilizan al consumo de estos alimentos como los causantes de intoxicaciones y enfermedades degenerativas, otros los consideran responsables de ser cancerígenos y teratógenos por el alto grado de toxicidad residual que poseen.

A pesar de la situación, son exiguos los hallazgos de agentes antimicrobianos de origen natural como sustitutos a los tradicionalmente usados; por lo cual es limitada la adición de conservantes naturales sobre alimentos procesados, que luego de ser obtenidos corren el riesgo de una posible contaminación microbiológica, y con ello provocaría un daño a la salud de los consumidores.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema general

¿Cuáles serán sus características fisicoquímicas y a qué concentraciones del aceite esencial extraído a partir de hojas de muña presentará efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*?

1.2.2. Problemas específicos

¿Cuáles serán sus características fisicoquímicas del aceite esencial de hojas de muña extraído por el método de arrastre por vapor de agua?

¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de hojas de muña frente al crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*?

¿Cuál es la concentración mínima bactericida del aceite esencial de hojas de muña frente al crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Extraer, caracterizar y evaluar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) extraído por el método de arrastre por vapor de agua.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria a la cual el aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) ejerce inhibición sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.
- Determinar la concentración mínima bactericida del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) frente al crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Ciertamente las plantas aromáticas poseen un amplio y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus sistemas de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Se conoce que estas especies además de impartir sabor pueden utilizarse para el control de microorganismos patógenos en productos alimenticios, de tal forma que su aplicación podría emplearse como alternativa a los conservantes sintéticos, más aun, cuando los consumidores actuales demandan productos alimenticios más seguros, naturales y saludables, asimismo por su capacidad para evitar la alteración de las propiedades organolépticas de los alimentos, de igual forma por su notable implicancia en la prevención de enfermedades degenerativas originadas por el consumo de alimentos elaborados con antimicrobianos sintéticos, Además de vernos motivado por sus bondades fitoterapéuticas y por haberse comprobado científicamente sus principios activos antimicrobianos en innumerables aplicaciones para el tratamiento de diversas enfermedades tanto orgánicas, nutricionales e infecciosas.

El aceite esencial de muña, tiene propiedades antibacterianas y antimicóticas comprobadas por el campo de la farmacia, la medicina y la odontología, siendo exiguo su estudio en el campo alimentario. Motivo por el cual, resulta necesario evaluar la actividad antibacteriana de esta sustancia que fue extraída de las hojas secas de una de las especies que habitan en nuestra localidad, frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*, previo a unas posibles aplicaciones como conservante natural de alimentos procesados, así como para el control de microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

1.5. DELIMITACIONES

Si bien, el estudio fue desarrollado con el objetivo de extraer, caracterizar y evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) frente a

bacterias patógenas transmitidas por alimentos. Resulta necesario aclarar que dicho estudio, estuvo limitado a estudiar por una parte la caracterización fisicoquímica del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) extraído por el método de arrastre por vapor de agua, a fin de determinar las cualidades físicas principales del aceite esencial y a la vez dilucidar el tipo y cantidad de componentes químicos presentes en el aceite esencial de muña, y por otra parte evaluar su efecto antibacteriano a bajas concentraciones por el método de microdilución en placa, a través de ensayos in vitro.

Sin embargo, es necesario mencionar que aún desconocemos los mecanismos de acción por los cuales las bajas concentraciones del aceite esencial de muña lograron inactivar las unidades celulares de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* durante el crecimiento y desarrollo in vitro de estas cepas, debido a que en nuestro medio, no contamos con laboratorios que estén implementados con los recursos tecnológicos necesarios para desarrollar este tipo de análisis y ensayos experimentales.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

El empleo de sustancias esenciales naturales con fines terapéuticos, se registra desde tiempos muy remotos, basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales transmitidos de generación en generación. Hoy en día, los aceites esenciales de diversas plantas cubren un amplio espectro de aplicaciones por sus efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos, debido a que poseen principios activos (metabolitos)⁽¹⁹⁶⁾ que actúan como agentes antibacterianos o antifúngicos,⁽¹⁹⁷⁾ los que se extraen a partir de sus hojas mediante métodos científicamente validados.⁽¹⁹⁸⁾ *Minthostachys mollis* y *Satureja brevicalyx* son especies conocidas como “muña”, estas son plantas nativas que habitan los diferentes pisos ecológicos de esta parte de la sierra sur del Perú, a la vez son conocidas por sus propiedades digestivas, antiinflamatorias, antisépticas, analgésicas, antiespasmódicas, antieméticas y antidiarreicas. Además son utilizados como condimentos en la cocina y en la preservación de algunos productos agrícolas, como la papa almacenada del ataque de insectos.⁽¹⁹⁹⁾

Contreras G. (1983) estudió de forma cualitativa la Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas, como trabajo de tesis para optar el título de biólogo. Con el que se llegó a la conclusión, de que el aceite esencial de muña tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*; resultando *Shigella dysenteriae* la más sensible al aceite esencial de muña.⁽²⁰⁰⁾

Salmón L. (1994) estudió la actividad de la muña, en su trabajo titulado Contribución al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* KuntGriseb “muña” en los aspectos fotoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. Concluyendo no haber obtenido halos de inhibición a ninguna de las concentraciones y en ninguna de las cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; por lo que, no pudo determinar su actividad antimicrobiana.⁽²⁰¹⁾

Inga y Guerra (2000), demostraron el efecto de las propiedades bacteriostáticas y bactericidas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. Cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. Sonoei* MC, *E. Coli* ATCC 25922 y *K.*

Pneumoniae ATCC 10031. Además de la acción fungistático y fungicida para *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus niger*.⁽²⁰²⁾

Díaz K. (2005) demostró que el aceite esencial de muña tiene propiedades antibacterianas *in vitro* contra bacterias orales estandarizadas: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomicetenumitans* y *Actinomices sp*. Los cuales fueron evaluados por el método de difusión en agar con discos, donde se determinó que la cepa más sensible ante el aceite esencial fue *Fusobacterium nucleatum* con 20,13 mm de inhibición, seguida por *Actinobacillus actinomicetenumitans* con 18,42 mm y la menos sensible *Actinomices sp* con 11 mm.⁽²⁰³⁾

En el estudio de **Guiza y Rincón (2007)**, se determinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, llegándose a determinar actividad antibacteriana nula frente a *Listeria monocytogenes*.⁽²⁰⁴⁾

Carpio A. (2008) Realizo un estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral, encontrando resultados positivos para 24 extractos de 27 de estas plantas, de los cuales cuatro aceites esenciales tuvieron mayor efecto antimicrobiano, incluyéndose dentro de ellos la *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.⁽²⁰⁵⁾

Cano y col., (2008) determinaron la actividad antimicótica *IN VITRO* de los metabolitos de las hojas del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, los cuales mostraron halos de inhibición de 30 mm a una concentración de 100% y de 35 mm al 50% frente a *Candida albicans*. Asimismo mediante la prueba de difusión en agar no se observó crecimiento fúngico en todo el diámetro de las placas con aceite esencial de muña a concentraciones de 50 y 100% para *T. tonsurans*, *M. canis* y *T. mentagrophytes*.⁽²⁰⁶⁾

Chavez y col., (2008) realizaron un estudio del Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*, del que se comprobó el efecto antibacteriano del aceite frente a *E. coli* a una concentración del 75% además se demostró que los componentes más importantes que brinda la propiedad antibacteriana al orégano son el Carvacrol y Timol, quienes tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular, causando el incremento de la permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleótidos y aminoácidos, etc.⁽²⁰⁷⁾

Carhuapoma y col., (2009) estudiaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Ruyaq muña” el cual tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana del mencionado aceite frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, para ello, se tuvo que determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI) y su concentración mínima bactericida (CMB) las que fueron obtenidas por el método de dilución en microplacas, resultando tener mayor porcentaje de inhibición frente a *Helicobacter pylori*, seguido de *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de comparar valores de inhibición contra tres antibióticos utilizados como estándares; los efectos positivos de actividad bactericida se deben posiblemente a que los constituyentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, como el timol, acetato de timol, metileugenol, pulegona, mentona, limoneno, linalol, entre otros, actuaron en sinergismo con los antibióticos estándares.⁽¹⁸²⁾

Azaña I. (2010) demostró la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” tanto cuantitativamente como cualitativamente en su concentración pura y en sus diluciones del 50% y 25% frente a bacterias prevalentes en lesiones periapicales crónicas de origen endodóntico: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* de los cuales se obtuvieron notables halos de inhibición, en las diluciones del 50% y 25% pero sobre todo en la concentración pura del aceite esencial.⁽²⁰⁸⁾

Castaño y col., (2010) Evaluó la actividad bactericida y determino la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico y del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre microorganismos de interés alimentario: *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *L. plantarum*, además de haber comparado la actividad antimicrobiana del extracto y el aceite con la de algunos conservantes sintéticos convencionales. Habiéndose obtenido mayor efecto antimicrobiano tanto el extracto etanólico como el aceite de romero, en comparación con los conservantes sintéticos usados como control positivo.⁽¹⁸³⁾

Huari G. (2014) Evaluó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (muña) sobre *Streptococcus mutans*, mediante el método cualitativo de difusión de disco en placa del cual concluyo que al 100% de concentración de aceite esencial de muña consiguió un halo inhibitorio promedio de 10.79 mm, al 50% un halo

inhibitorio promedio de 7.6 mm y al 25% de cinco milímetros halo tamaño del disco de sensibilidad, siendo igual o similar que el control negativo (DMSO).⁽²⁰⁹⁾

Reyes J, López M, y Palou E. (2016) Evaluaron la actividad antimicrobiana de mezclas binarias de aceites esenciales de mostaza (*Brassica nigra*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) contra tres bacterias patógenas comúnmente relacionadas con enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Enteritidis*. En dicho estudio, el aceite esencial de mostaza evaluado individualmente mostró ser altamente eficaz (Concentración Mínima Inhibitoria, CMI<0.10% vol/vol) contra las tres bacterias estudiadas, en comparación con los aceites de tomillo (CMI=0.12% vol/vol) y orégano mexicano (CMI=0.40% vol/vol).⁽²¹⁰⁾

Saharkhiz M. y col., (2016) Evaluaron la composición química y actividad antimicrobiana de aceites esenciales de tres especies de *Satureja spp* contra microorganismos causantes de infecciones transmitidas por los alimentos mediante el método de microdilución, donde se pudo determinar que los tres aceites esenciales inhibieron completamente el crecimiento de hongos ensayados a concentraciones inferiores a 0.062 µl/ml. Además los aceites mostraron actividades bacteriostáticas y bactericidas significativas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en concentraciones que oscilaban entre 0,031-1 µl / ml.⁽²¹¹⁾

Mazarei, Z., y Rafati, H. (2018) Determinaron el efecto antibacteriano a una concentración mínima inhibitoria y bactericidas del aceite esencial de *Satureja khuzestanica* puro y sus nanoemulsiones contra *Escherichia coli* PTCC 1339, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella enterica* PTCC 1639 utilizando un método de diluciones en serie, con ensayos en microplacas de 96 pocillos.⁽¹⁹⁵⁾

Sobre el aceite esencial de muña se han realizado numerosos estudios desde su extracción, caracterización, elucidación y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica, hasta su aplicación en la medicina, farmacología y estomatología. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el efecto bioactivo de sus componentes químicos (metabolitos) frente a bacterias patógenas que actúan como agentes causantes de enfermedades transmitidas a través del consumo de alimentos y que tienen mucha importancia en la industria de alimentos.

2.2. MARCO REFERENCIAL

2.2.1. Microorganismos empleados en las pruebas antimicrobianas

Las cepas microbianas obtenidas de casos clínicos se emplean rutinariamente para la elección del antimicrobiano eficaz durante el tratamiento de enfermedades infecciosas. ⁽⁵⁾ La prueba permite observar la resistencia que ejerce los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas frente a los antimicrobianos de uso común. Los microorganismos que se aíslan son identificados para conocer la subdivisión de la especie microbiana, lo cual es de interés en el ámbito epidemiológico y patológico, sobre todo para conocer el origen de un brote de la misma especie. ⁽⁶⁾

Las bacterias, hongos y levaduras son generalmente los microorganismos más empleados en el estudio y determinación de nuevos antimicrobianos, muchos de ellos presentan características que pueden verse modificados a nivel fisiológico y bioquímico en un ambiente diferente a su medio óptimo con la finalidad de adaptarse al nuevo medio. Esta capacidad de adaptación se consigue por la generación de mutantes, que se logra a través de la información que pasa por los genes de las células microbianas. ⁽⁷⁾ Así también la exposición a los antibióticos en concentraciones bajas, hace que aquellas pocas bacterias que adquirieron resistencia se desarrollen preferentemente, que aquellas que no la adquirieron, ⁽⁸⁾ lo cual se debe a que estas elaboran sustancias antagónicas a partir del antimicrobiano y aún más importante, estas entran a un proceso de selección natural de las cepas que surgen de una especie originalmente susceptible volviéndose permanentemente resistente. ^{(9) (10) (11)}

La sobrevivencia de células microbianas permite que puedan colonizarse en los alimentos ocasionando un riesgo de contraer enfermedades infecciosas luego de consumirlo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades transmitidas por alimentos son las principales causas de enfermedad en la población mundial. ⁽¹²⁾ La sobrevivencia de los microorganismos puede permitir también tener una mayor patogenicidad para el hombre y disminuir la capacidad bacteriostática o bactericida de los compuestos que contrarresten. Algunos factores participan muy evidentemente en ese incremento, son cambios genéticos que se traducen en el incremento de la virulencia, nuevos patrones en los hábitos y

costumbres alimentarias de la población, cambios en los sistemas y las tecnologías aplicadas en la producción y distribución de los alimentos, entre otras. A continuación se describe las características principales de los microorganismos patógenos sobre los que se realizaron los ensayos experimentales del estudio.

2.2.1.1. *Escherichia coli*

Es uno de los microorganismos pertenecientes a las células procariotas, considerada una bacteria Gram negativa, bacilo alargado, no formadora de esporas, capaz de fermentar lactosa y glucosa. Esta bacteria, en medio Agar MacConkey (AMC) forma colonias esféricas color rosa, de consistencia mucosa, lisa y blanda, con un pequeño borde al centro.

Escherichia coli forma parte de la flora normal bacteriana de los intestinos del humano y de algunos animales, por lo que es considerado un patógeno alimenticio importante, que causa muchas enfermedades fatales en humanos y animales.^{(13) (14)} *Escherichia coli* tiene la capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos.⁽¹⁵⁾ Es el agente indicador de contaminación fecal en agua y alimentos, relacionado con la aparición de síntomas o enfermedades gastrointestinales.^{(16) (17) (18) (19)}

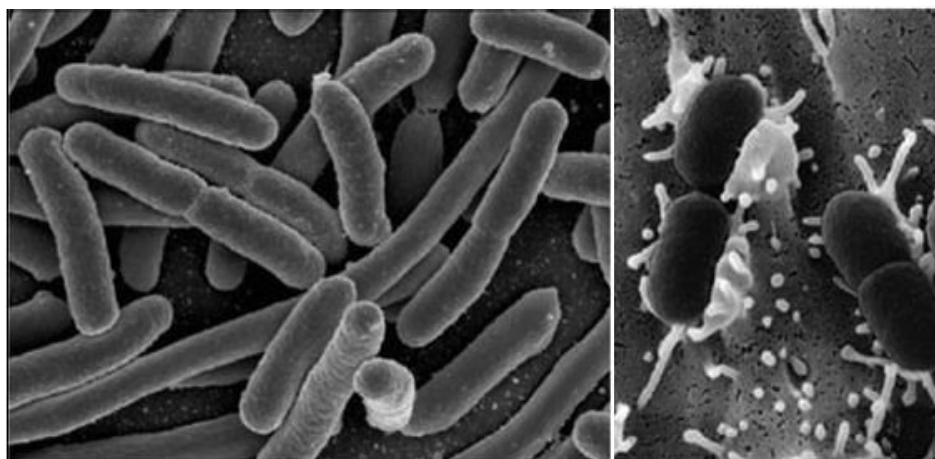


Figura 1. Microscopia electrónica de *Escherichia coli* enteropatógenas. En el lado derecho se observa bacterias *Escherichia coli* invadiendo la mucosa del intestino.⁽¹⁹²⁾

Las infecciones entéricas provocadas por esta bacteria no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua o alimentos.⁽²⁰⁾

Actualmente, se reconoce seis variantes de *E. coli* patógeno intestinal que fueron relacionadas con ETAs, las que por su capacidad de originar enfermedades diarreicas en el hombre y en animales, son consideradas las principales causantes de mortalidad infantil en el mundo. Por lo que fueron clasificados en grupos específicos basados en sus propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos O:H diferentes en: *E. coli* Enteropatógeno (EPEC), *E. coli* Enterotoxigenico (ETEC), *E. coli* Enteroinvasor (EIEC), *E. coli* de Adherencia Difusa (DAEC), *E. coli* Entero Agregativa (EaggEC) y *E. coli* Enterohemorrágico (O157:H7;EHEC).⁽²¹⁾

2.2.1.2. *Salmonella*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo con flagelos peritricos y que no desarrollan capsula ni esporas, perteneciente a la familia de las enterobacterias. La mayoría de las especies de este género no fermentan la lactosa y son móviles, son anaerobios facultativos, contienen endotoxinas, generalmente son termolábiles, resisten la congelación y algunos agentes químicos. Pueden crecer a pH bajos y son generalmente sensibles a altas concentraciones de sal. Son capaces de proliferar en diversos ecosistemas, como en la producción de alimentos e instalaciones de procesamiento.⁽²²⁾ Poseen rica composición antigénica que emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos.⁽²³⁾

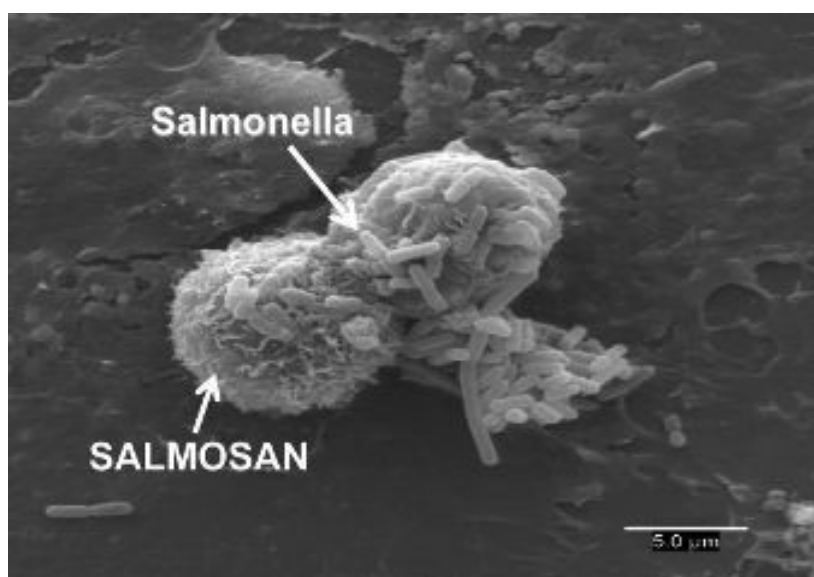


Figura 2. Microscopia electrónica de *Salmonella typhimurium* afectado por la acción de Salmosan® para impedir la adhesión en tejido intestinal.⁽²⁴⁾

En los últimos años la aplicación de técnicas moleculares, basadas en análisis y reacciones de material genético, ha dado lugar a una reclasificación de los serovares en un nuevo esquema de subespecies. Por lo que se conocen dos especies dentro del género *Salmonella*; *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*.⁽²⁵⁾ La primera está compuesta por seis subespecies, siendo la subespecie (I) la que se aísla con mayor frecuencia del hombre y los animales de sangre caliente.⁽²⁶⁾ La segunda *S. bongori* se sitúa en el grupo V.⁽²⁷⁾ Hay más de 2,435 serovariedades o serotipos de *Salmonella*⁽²⁸⁾ la mayoría pertenecientes a la subespecie I, en la que se encuentra *Salmonella Typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* que son patógenas y las más frecuentes en nuestro medio.

Salmonella spp, es considerada uno de los mayores problemas de la industria de los alimentos, debido a que afecta su inocuidad, incrementando el riesgo de ocasionar infecciones alimentarias en los consumidores.⁽²⁹⁾ Las principales fuentes de infección en el ser humano son las aves de corral, los huevos, los productos lácteos y alimentos preparados o manipulados inapropiadamente. Este patógeno causa una infección en humanos caracterizada por gastroenteritis, zoonosis que se transmite por la ingestión de alimentos o agua contaminada por la heces de un animal o una persona infectada,^{(30) (31)} la cual se manifiesta en diarrea, vómitos, fiebre, calambre abdominal y dolores de cabeza siendo considerada una pandemia de distribución mundial.⁽³²⁾

La incidencia de esta enfermedad en nuestro país, ha ido en aumento en la última década. Actualmente es la enfermedad que afecta a todas las edades de la vida, pero con mayor incidencia a lactantes y niños de corta edad.^{(33) (34) (35)} El aumento de resistencias en *Salmonella* se está incrementando debido al mal uso de antibióticos en la práctica médica y veterinaria.^{(36) (37) (38) (39) (40)}

Los factores de patogenicidad de *Salmonella* incluyen: la habilidad para invadir células, poseer una cubierta completa de lipo-polisacárido (LPS), capacidad para replicarse intracelularmente y posibilidad de producción de toxinas. En el mecanismo de patogenicidad se conoce que son

necesarios plásmidos de elevado peso molecular que se asocian con la virulencia.⁽⁴¹⁾

Estudios epidemiológicos indican que las aves constituyen un importante reservorio. Algunos serotipos tienen poca especificidad de huésped y pueden aislarse del tracto intestinal de animales de sangre fría. Otros serotipos muestran elevada especificidad de huésped como: *S. typhi* en humanos, *S. typhimurium* en ratones, *S. gallinarum* en aves de corral, *S. dublin* en bovinos, *S. anatum* en patos, *S. choleraesuis* en porcinos y *S. abortusovis* en ovinos.⁽⁴²⁾

2.2.1.3. *Shigella*

Es una bacteria bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, está estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas ambas son taxonómicamente indistinguibles a nivel de especie, no fermenta la lactosa con excepción de algunas cepas de *S. sonnei*, es inmóvil, no produce ácido sulfhídrico (H₂S) tampoco lisina descarboxilasa, utiliza acetato como fuente de carbono y la producción de gas a partir de la glucosa solo se observa en algunas cepas de *S. flexneri*, que las diferencia de *Salmonella*. Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas. Son más sensibles a condiciones desfavorables que *Salmonella* y *E. coli*, su viabilidad se ve comprometida frente a ácidos, sales biliares, desecación y desinfectantes. Aún así pueden sobrevivir a temperatura ambiente durante meses.⁽⁴³⁾



Figura 3. Microscopia electrónica de *Shigella* adheriéndose en el tejido intestinal.⁽⁴⁴⁾

Todas las especies de este género presentan antígeno O, termoestable y pueden o no poseer antígeno K, termolábil. Este último no interviene en la serotipificación, pero puede interferir en la determinación antígeno O. De acuerdo a ello se clasifican por serogrupos, a su vez cada serogrupo puede subdividirse, en tipos, en base a variantes del antígenos O. Algunas especies pueden diferenciarse en serovares.

Su clasificación se realizó en base a sus antígenos somáticos designados como A (*S. dysenteriae*), B (*S. flexneri*), C (*S. boydii*) y D (*S. sonnei*), estos cuatro serogrupos incluyen 10, 8, 18 y 01 serotipos, respectivamente. ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾

Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa bacteriana de disentería. El ser humano es el único reservorio conocido de este agente y con mayor frecuencia causa infecciones intestinales en los niños, son comunes los brotes en condiciones de hacinamiento y en casos de deficiencia de la higiene personal, se distingue por poseer una dosis infectiva menor a 200 microorganismos, ⁽⁴⁷⁾ muy baja con respecto a las *Salmonellas* que es de 10^5 a 10^8 microorganismos. ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁴⁹⁾

Las Shigellas son invasivas y penetran a través de la mucosa intestinal, algunas cepas producen toxinas poderosas; sin embargo, incluso estas cepas precisan invadir la mucosa para determinar la enfermedad. ⁽⁵⁰⁾

La shigelosis es una disentería bacteriana, la mayoría de personas infectadas con *Shigella* presentan diarrea, fiebre y calambres estomacales, toma del estado general, cefalea intensa y en ocasiones síntomas neurológicos a partir de 24 a 48 horas después de su exposición a la bacteria; la diarrea es a menudo sanguinolenta. Es común que la shigelosis desaparezca en 5 a 7 días. En algunas personas, especialmente en los niños de corta edad y los ancianos, la diarrea puede ser tan grave que el paciente requiere ser hospitalizado. ⁽⁵¹⁾ Una infección aguda con fiebre elevada también puede ir acompañada de ataques o convulsiones en niños menores de 02 años. Algunas personas infectadas pueden no tener ningún síntoma. ⁽⁵²⁾ El único reservorio importante es el hombre.

Shigella está distribuido en todo el mundo, sus especies varían de una región a otra, las más frecuentes en países subdesarrollados son *S. dysenteriae* y *S. Flexneri*, y en países desarrollados es *S. sonnei*.⁽⁵³⁾

La transmisión es fecal-oral directa o indirecta de un portador. La infección puede surgir después de ingerir 10 a 100 células. Los principales transmisores son personas que no se lavan las manos ni se limpian las uñas minuciosamente después de la defecación, de esta manera diseminan la infección por contacto físico directo o indirecto al contaminar los alimentos. También las moscas pueden transportar microorganismos a un alimento no refrigerado en el cual se multiplican hasta constituir un inóculo infectante. Una persona infectada puede contaminar el alimento o el agua.⁽⁵⁴⁾

2.2.2. Aspectos generales de la especie vegetal en estudio (*Satureja brevicalyx*)

2.2.2.1. Taxonomía

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist⁽⁵⁵⁾ ⁽⁵⁶⁾, la especie se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
Sub- CLASE	: Asteridae
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
GÉNERO	: Clinopodium
SINONIMO	: Satureja
ESPECIE	: <i>Satureja brevicalyx</i> Epling

Sinonimia vulgar: “urqu muña”, “wayra muña”, “muña”, “inca muña”, “salqa muña”, “cjunumuña”, “konoc” y “oregano de los incas”.⁽⁵⁷⁾

2.2.2.2. Descripción botánica

La especie es de porte arbustiva perennifolia, erguida de 1 a 1.5 metros 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; androceo con estambres didínamos; gineceo con ovario súpero, estilo apical y estigma simple. Florece en primavera y verano. ⁽⁵⁸⁾

2.2.2.3. Biodiversidad del género

El género *Satureja* cuenta con unas 200 especies en el mundo, todas estas especies son de regiones templadas y tropicales de ambos emisferios de la tierra. En el Perú se han identificado unas 26 especies, de las cuales 20 son endémicas. La *Satureja brevicalyx* es una especie endémica de las regiones altoandinas del sur del Perú. ⁽⁵⁹⁾

2.2.2.4. Distribución geográfica

La *Satureja brevicalyx* crece en la parte sur andina del Perú (Apurímac, Ayacucho, Cusco y Puno) entre los 3,300 a 3,800 metros de altitud, de preferencia podemos encontrarla en laderas de suelos areno-arcillosos y pedregosos. ⁽⁵⁹⁾

2.2.2.5. Propiedades y usos

a) Propiedades

Estudios basados en la etnomedicina andina, señalan que esta especie es usada para resolver problemas gastrointestinales y para la corrección de desórdenes menstruales. Asimismo, es valorada por sus propiedades digestivas contra cólicos, diarreas, gastritis y antiespasmódicas; también se usa como analgésico para dolores musculares y tortícolis. Actualmente, vienen desarrollando estudios para controlar las infecciones de la piel (dermatomicosis). ⁽⁶⁰⁾

b) Usos

Según informaciones revisadas, mencionan que familias de esta especie fueron tomadas en consideración desde la época precolombina, cuando nuestros antepasados realizaban faenas agrícolas orientadas a la protección fitosanitaria, a través de siembras asociadas y empleo de plantas para preservar del daño por enfermedades o plagas. ⁽⁶¹⁾ Desde entonces, la “muña” tiene múltiples aplicaciones, una de ellas, es su actuación como preservante natural en el manejo postcosecha de tubérculos (papa, ocas, etc.) ⁽⁶²⁾ y cereales (maíz) la que es aplicada, mediante una técnica de protección directa

durante su almacenamiento; con lo cual se logra controlar la germinación, además de inhibir y repeler insectos. ^{(63) (64) (65) (66)}

2.2.2.6. Estudios fitoquímicos

En el extracto hidroalcohólico de *Satureja brevicalyx* se pudo evidenciar metabolitos como: resinas, azúcares reductores, catequinas, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides y aceite esencial. ⁽⁶⁷⁾

2.2.2.7. Estudios farmacológicos

Los escasos estudios de tipo experimental orientados a la evaluación farmacológica de *Satureja brevicalyx* fueron desarrollados por Soto en 1999, quien determinó la actividad anti-inflamatoria y analgésica del extracto hidroalcohólico de *S. brevicalyx*, ⁽⁶⁷⁾ del mismo modo, Díez en el 2002, determinó la actividad antiespasmódica de infusión acuosa al 5% de hojas y sumidades floridas de *S. brevicalyx* sobre el intestino aislado de cobayo, ⁽⁶⁸⁾ y finalmente Palomino en el 2005, estudió el efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de hojas de *S. brevicalyx*. ⁽⁶⁹⁾

2.2.3. Aceites esenciales

2.2.3.1. Definición

Los aceites esenciales son el producto volátil obtenido de fuente vegetal mediante destilación, ya sea por vapor de agua o por inmersión de un solvente. Sus constituyentes fotoquímicos tienen predominio volátil y odorífero, de compleja composición química, los cuales se originan a partir de los tejidos secretores, almacenándose en pelos glandulares, cavidades esquizógenas o lisígenas, como parte del metabolismo secundario de las plantas. ^{(70) (71)} La biosíntesis de estos metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas y a periodos de estrés, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, ataque de microorganismos, entre otros. ^{(72) (73)}

2.2.3.2. Composición química

Como parte del complicado metabolismo de las plantas, los AEs abarcan una gama muy variada de constituyentes, ⁽⁷⁴⁾ que pueden ser básicamente agrupados en dos fracciones, una fracción volátil que constituye aproximadamente del 90% al 95% del total del aceite, conteniendo hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados (aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres), quienes transfieren aromas a los AEs que los caracterizan; y una fracción no volátil que constituye del cinco al diez por ciento del aceite, conteniendo hidrocarburos lineales, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, flavonoides, ⁽⁷⁵⁾ a medida que avanza el conocimiento de su composición se conocen una heterogénea y variada cantidad de compuestos heterocíclicos. ⁽⁷⁶⁾ ⁽⁷⁷⁾

Una planta puede generar una gran variedad de mezclas de sustancias aromáticas, lo cual depende de diversos factores, algunos intrínsecos de la especie vegetal y otros dependientes de su medio o de los procesos extractivos empleados, en definitiva son los que les confieren la unicidad a la composición química. ⁽⁷⁸⁾ Por tanto, siendo los AEs parte del metabolismo de una planta, su composición química está en constante cambio, modificándose las proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según la parte empleada (hojas, tallos, raíces, flores y frutos), en el momento de su desarrollo o durante el día. ⁽⁷⁰⁾ ⁽⁷²⁾ ⁽⁷⁶⁾

El valor comercial y el uso del AE depende básicamente de su composición química, la cual está condicionada por diversos factores tales como la edad de la planta y su estado fenológico, las condiciones geobotánicas (tipo de suelo, clima, altitud, latitud, intensidad lumínica, pluviosidad) y agrícolas de su cultivo (abonos, fertilizantes y pesticidas), la época de recolección y partes de la planta (raíz, tallos, hojas, semillas), el método de extracción, su duración y la temperatura empleada, el estado y procedencia de la planta (material fresco, seco, fermentado, tipo de tratamiento postcosecha). ⁽⁷⁹⁾ Más aún, debe tenerse en cuenta que dada su normalmente compleja composición, presentan una significativa

probabilidad de sufrir modificaciones, ya sea por reacciones entre sus propios constituyentes, o, entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del material en el cual se almacenan, etc.).⁽⁷⁰⁾

Actualmente se han analizado más de tres mil AEs de un gran número de especies botánicas. Más de doscientos AEs tienen un valor comercial y se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria (alimentos, jabones, ambientadores, perfumes, cosméticos, licores, insecticidas, fármacos, etc.). Es evidente que un AE está en permanente cambio, no solamente mientras forma parte del metabolismo de la planta, sino también después de extraído, lo cual permite la obtención de distintos productos aromáticos, y con grandes diferencias en cuanto a sus características físico-químicas y organolépticas.

2.2.3.3. Clasificación de los aceites esenciales

La naturaleza química que las compone, los clasifica de acuerdo a sus componentes mayoritarios en los siguientes grupos.

a) Terpenos

Este grupo está conformado principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, también denominados isoprenoides, teniendo en cuenta que el isopreno es su precursor biológico, habitualmente los podemos hallar en forma de hidrocarburos o bien pueden estar oxigenados con diversos tipos de funcionalización como: alcoholes, cetonas, aldehidos, éteres, ésteres, epóxidos, peróxidos, etc. Los que a la vez pueden dividirse en: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}), según el número de unidades de isopreno que los conforma.^{(80) (81)}

- **Monoterpenos**

Se les denomina aceites esenciales monoterpenos a los que en abundancia poseen fracciones monoterpenicas en cuyas estructuradas cuentan con diez átomos de carbono, como los de función aldehído que se hallan distribuidos ampliamente en

hierbabuena, albahaca, salvia, etc; todas ellas con valiosas propiedades aromáticas, quienes además determinan el índice de calidad en la valoración de los aceites esenciales, muchos de ellos experimentan cierre de anillo produciendo ácidos cíclicos insaturados. Los principales monoterpenos responsables del aroma son los alcoholes y aldehidos. ^{(82) (83)}

- **Sesquiterpenos**

Los aceites esenciales sesquiterpenos son los que están compuestas por el mayor porcentaje de fracciones sesquiterpénicas, en cuyas estructuras tienen quince átomos de carbono, estos además poseen propiedades débiles y menos volátiles, con densidades aproximadas a 0.9 g/mL y con viscosidades mayores que los monoterpenos. Los que podemos extraerlos de la copaiba, el pino, el junípero, etc. ⁽⁸⁴⁾

b) Aromáticos

Este grupo engloba a los compuestos alifáticos y aromáticos no terpenoides como los fenilpropanoides, compuestos nitrogenados y azufrados.

- **Fenilpropanoides**

Son aquellos aceites esenciales con abundantes fracciones fenilpropanicas, que se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales (anis, clavo, canela, etc.) cuyas fracciones están caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de tres carbonos y derivados biosintéticos del ácido Shikímico como los aminoácidos aromáticos y ciertos polifenoles. ^{(85) (86)}

2.2.3.4. Características fisicoquímicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales en condiciones normales son líquidos volátiles, unos más y otros menos densos que el agua, poseen aromas fuertes y penetrantes propios de sus componentes orgánicos, incoloros o amarillentos translúcidos, de elevado índice de refracción, solubles en disolventes orgánicos como alcohol, éter, cloroformo e insolubles en agua, dejan manchas sobre el papel que luego desaparece. ⁽⁸⁷⁾

a) Densidad

La densidad y/o peso específico de los aceites esenciales varía entre 0.852 y 1.172, la mayoría son más livianos que el agua. El principio en que se basa es en determinar la masa de una unidad de volumen de AE, expresada en g/mL, a una temperatura dada (20°C). La temperatura se ha de controlar exactamente ya que la densidad de estas sustancias varía aproximadamente 0.00068 unidades por grado. La picnometría es el método de mayor aplicación para medir la densidad de los líquidos, en la cual, la temperatura no debe diferir de la de referencia en más de cinco grados centígrados.⁽⁸⁸⁾

b) Índice de refracción

El índice de refracción de una sustancia es el cociente entre la velocidad de un rayo de luz en el aire y la velocidad de la luz a través de la sustancia, también expresado como la relación entre los senos de los ángulos de incidencia y de refracción, esto tiende a disminuir ligeramente cuando aumenta el peso molecular. Si la radiación incidente pasa sobre un medio menos denso, la relación será menor que uno. Este parámetro es importante para la identificación de una sustancia y la detección de impurezas. La temperatura de lectura es de 20°C (no debe sobrepasar en +/- 2 °C a la temperatura de referencia). La refractometría es la técnica que mide directamente el índice de refracción.⁽⁸⁹⁾

c) Índice de acidez

Este índice nos indica el número de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) necesario para neutralizar los ácidos grasos libres de un gramo de AE. Un índice alto indica la presencia de una cantidad elevada de ácidos grasos libres en aceites y grasas que se forman por hidrólisis de los triglicéridos, posibilitando evaluar el grado de pureza.⁽⁹⁰⁾

d) Solubilidad en etanol

Usualmente los aceites esenciales son sólo ligeramente solubles en agua y miscibles en etanol. La determinación del número de volúmenes de

etanol diluido a una graduación dada, que se requieren para la completa solubilización de un volumen de esencia, es una ayuda rápida en la evaluación de su calidad; AEs ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en etanol diluido que los aceites en cuya composición predominan los hidrocarburos terpénicos. Se determina la solubilidad según la ISO 875 (1981) a 20 °C.⁽⁹¹⁾

2.2.3.5. Mecanismos de acción de aceites esenciales sobre los microorganismos.

Determinar los mecanismos de acción de los AEs sobre los microorganismos es una labor muy compleja, por lo que, hasta hoy, no han sido del todo entendidos y explicados.⁽⁹²⁾ Puesto que la acción antimicrobiana de un determinado AE depende principalmente de los grupos bioactivos que las componen, así como del tipo de microorganismo sobre el que se experimentan, pues ellos están íntimamente relacionados con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos, por ello que la mayoría de AEs tiene poderoso efecto sobre las bacterias Gram-positivas.^{(93) (94) (95)}

La compleja composición de los AEs permite evidenciar diferentes tipos de especificidad respecto a los sitios activos en la célula microbiana. Algunos afectan las funciones metabólicas, como la respiración, la producción de toxinas o ácidos.⁽⁹⁶⁾

Luqman y col. (2007) reportan que la inactivación microbiana de los aceites esenciales es ocasionado por daño en la pared celular de los microorganismos, desórdenes en la membrana citoplasmática, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, coagulación de los contenidos celulares o alteraciones en el flujo de electrones, en el flujo de contenido celular y en el transporte activo.⁽⁹⁷⁾

Davidson y Branen (1993) indicaron que el modo de acción de los compuestos fenólicos es inactivar enzimas metabólicas, inhibir la síntesis de proteínas y reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético.⁽⁹⁸⁾ Además, **Elgayyar y col. (2001)** señala que la actividad antimicrobiana de los AEs actúan sobre las proteínas que se

encuentran en la membrana citoplasmática. Las enzimas ATPasas que se encuentran localizadas en dicha membrana pueden ser alcanzadas por las moléculas lipídicas, viéndose afectada la producción de energía y la síntesis de componentes estructurales.⁽⁹⁹⁾

Se han realizados varios estudios evidenciando el efecto bactericida de los aceites esenciales; sin embargo, su actividad varia, en vista de que sus componentes son diferentes.⁽¹⁰⁰⁾

Una característica importante de los componentes de los AEs son su hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando la estructura de estos y haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares.⁽¹⁰¹⁾

Burt y col. (2007), señalaron que al exponer las células a concentraciones subletales de agentes antimicrobianos naturales como carvacrol y timol, hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados.⁽¹⁰²⁾

2.2.3.6. Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

Son varios los factores que intervienen cuando uno experimenta la actividad antimicrobiana de los AEs, pues el grado de inhibición depende del tipo de microorganismo, del tipo de sustrato, de las variaciones en la composición de la planta, especias o fruto, de las diferencias geográficas en las zonas de cultivo, entre otros.⁽¹⁰³⁾

López-Malo (1995), menciona que el espectro de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende en gran medida del tipo de microorganismo a inhibir, puesto que los microorganismos difieren en su resistencia. Además, cuando el aceite esencial es adicionado como insumo a un alimento, este puede interactuar aumentando o disminuyendo la capacidad antimicrobiana y la eficacia del aceite esencial.⁽¹⁰⁴⁾

Asimismo algunos factores intrínsecos y extrínsecos están asociados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en los alimentos. Estos

incluyen temperatura, composición de la atmósfera, pH, potencial de óxido-reducción y actividad de agua, entre otros. En los casos cuando la muestra que contiene aceite esencial es expuesta a la atmósfera, las condiciones deben ser cuidadosamente controladas para obtener resultados significativos, del mismo modo, el número inicial de microorganismos debe ser consistente para que los resultados sean reproducibles. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación, esta debe ser la óptima de crecimiento del microorganismo a evaluar, ya que en la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa el efecto antimicrobiano del aceite. Además es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no. ⁽¹⁰⁵⁾

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales se ve favorecida por valores de pH bajos; ello se atribuye al incremento de la solubilidad y la estabilidad de estos compuestos. Asimismo **Juven y col. (1994)**, menciona que a valores de pH bajos las moléculas de compuestos fenólicos, como el timol, se encuentran mayormente unidas, presentándose regiones hidrofóbicas en las proteínas y disolviéndose mejor la fase de lípidos de la membrana. ⁽¹⁰⁶⁾

2.2.3.7. Estudios sobre el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales.

Varios autores evaluaron el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales extraídos de plantas y especias, dentro de ellos **Ismael y Pierson (1990)** observaron que los aceites de clavo, tomillo, pimienta, orégano y canela previnieron la germinación de *Clostridium botulinum*. ⁽¹⁰⁷⁾ Mientras que **Aureli y col. (1992)** probaron la actividad antimicrobiana de estos mismos aceites esenciales en sistemas modelo, para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, determinando que los constituyentes más activos fueron timol, aldehído cinámico, eugenol y carvacrol. ⁽¹⁰⁸⁾

Juven y col. (1994), observaron que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de ciertos aceites esenciales, sensibiliza la membrana celular de *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, provocando la saturación de los sitios activos, de tal forma que se generó un daño irreversible, seguido del colapso de las bacterias. ⁽¹⁰⁶⁾

Faleiro y col. (2003), determinaron que el aceite esencial de tomillo, inhibió el crecimiento de *Proteus mirabilis*, luego hallaron similiares acciones entre 1,8 cineol y linalol, contra *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*.⁽¹⁰⁹⁾

Radudiene y col. (2005), hallaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano contra *Fusarium avenaceum*, *Paecilomyces varioti*, *Rhizopus stolonifer*, *Scopulariopsis brevicaulis*; y fueron resistentes *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Aureobasidium pullulans* y *Acremonium furcatum*.⁽¹¹⁰⁾

Luqman y col. (2007), observaron el efecto antibacteriano del AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Mycobacterium smegmatis*, sobre este ultimo presento menor actividad.⁽⁹⁷⁾

Carhuapoma YM. (2007), determinó que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* posee un efecto anti-*Helicobacter pylori*, con una concentración mínima inhibitoria de 1.00 g/mL y con una concentración mínima bactericida de 2.00 g/mL.⁽¹¹¹⁾

2.2.3.8. Aplicaciones de los aceites esenciales como antimicrobianos

Actualmente, los consumidores requieren que los productos que consumen sean elaborados con sustancias naturales. En este sentido, los AEs de hierbas están siendo muy valorados. A continuación se comentan algunos estudios en los que se adicionaron AEs como agentes antimicrobianos a diversos alimentos.

La adición de 0.8 % (v/p) de AE de orégano permitió una reducción inicial de 2-3 ciclos logarítmicos de la población bacteriana presentes en muestras de carne, almacenadas en atmósfera modificada y empacadas al vacío; además se observó que a condiciones normales de almacenamiento la inhibición del crecimiento bacteriano fue menor.⁽¹¹²⁾

Asimismo, **Skandamis y Nychas (2001)**, lograron disminuir el crecimiento de la población bacteriana presente en carne molida y almacenada en condiciones de atmósfera modificada a concentraciones de 0.5 % y 1% del AE de orégano. ⁽¹¹³⁾

Ghafi y col. (2007), observaron que el aceite esencial de orégano tiene efecto sinérgico favorable con la bacteriocina producida por *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28, en el control de *L. monocytogenes* presente en carne de cerdo, durante el almacenamiento a 4°C, resultando ser útil para mejorar la estabilidad microbiológica de productos carnicos. ⁽¹¹⁴⁾

Por otra parte, **Mejlhoim O. y Dalgaard P. (2002)**, evaluaron nueve AEs para prolongar el tiempo de vida útil de filetes de bacalao envasados en atmósfera modificada. Estos autores concluyeron que los AEs de orégano y canela presentaron mayor inhibición del crecimiento de *Pseudomona phosphoreum*, e incrementaron el tiempo de vida útil de los filetes de 11 días a 26 días, a 2 °C, seguidos de los aceites esenciales de limón, tomillo, clavo, laurel, mejorana, salvia y albahaca. ⁽¹¹⁵⁾

También, se ha estudiado el efecto bacteriostático de los AEs de orégano y canela en productos envasados sin esterilizar, del que se logró demostrar sus efectos antimicrobianos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. ⁽¹¹⁶⁾

Por su capacidad de extender la vida de anaquel de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos, los AEs fueron incluidos en la formulación de películas comestibles, para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos. ⁽¹¹⁷⁾

Los AEs también fueron aplicados a productos de panificación, de los cuales la canela, el clavo de olor, el laurel, el limón y el tomillo, demostraron tener actividad antifúngica frente a hongos comunes que causan deterioro; Aunque la combinación de estos AEs con el envasado en atmósferas modificadas resulta ser una mejor alternativa. ⁽¹¹⁸⁾

Eissa y col. (2008), evaluaron el efecto inhibitorio de cinco AEs extraídos de hojas de limón, albahaca, romero, salvia y clavo de olor, contra la

actividad de la enzima polifenoloxidasa, del pardeamiento enzimático, del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. Ochraceus* y su producción de micotoxinas en muestras de jugo de manzana. Los mejores resultados de inhibición se encontraron con los AEs de limón, clavo y romero, cuando se adicionaron en dosis de 0.05, 0.2 y 0.9 por ciento respectivamente. Además incrementó el tiempo de vida útil del jugo en cuatro semanas, a 4 °C de almacenamiento. ⁽¹¹⁹⁾

Gould (1996), menciona que las concentraciones que se requieren para lograr un efecto antimicrobiano de los AEs, son considerablemente más altas en alimentos que en medios de cultivo; lo cual alteraría el sabor de los alimentos, por lo que sugiere reforzar la efectividad de los AEs con combinaciones sinérgicas y factores; el cual permita reducir y hallar las concentraciones necesarias de AEs. ⁽¹²⁰⁾

Vega y López (2009), concluyeron que la mayoría de los AEs se ven limitados a aplicarse, por el hecho de que las concentraciones a las que se logra un efecto antimicrobiano importante, alterarían el sabor de los alimentos aditivados con estos; y en muchos casos tales alteraciones no suelen ser agradables. Por lo que recomendaron profundizar en el conocimiento de los factores extrínsecos e intrínsecos asociados con el uso de AEs en alimentos, así como en la combinación de estos con otras formas de conservación. ⁽¹²¹⁾

2.2.4. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la cromatografía se define como un método físico de separación en el cual los componentes, para ser separados, se distribuyen entre dos fases, de las cuales una es estacionaria, mientras que la otra, fase móvil, se mueve en una dirección definida. ⁽¹²²⁾ Según el estado físico de la fase móvil, se puede hacer una clasificación en cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC). Es posible encontrar una subclasificación de acuerdo con el estado físico de la fase estacionaria. ⁽¹²³⁾

2.2.4.1. Cromatografía de gases

Actualmente, los métodos modernos de análisis de AEs están fundamentados básicamente en la Cromatografía de Gases usando detectores convencionales, principalmente detectores de ionización en flama (FID) y selectivo de masas (MSD).^{(124) (125)} En esta técnica los analitos se eluyen por el flujo de una fase móvil de gas inerte y deben tener puntos de ebullición menores que 350°C y no descomponerse por debajo de esta temperatura; estas muestras pueden ser gases, líquidos o sólidos.

Las muestras de compuestos volátiles extraídos de plantas que son complejas, requieren métodos de separación de alta resolución; como cromatografía de gases, porque es la técnica de separación más apropiada.^{(123) (126)}

Con el propósito de realizar una identificación de los diferentes compuestos, se emplean los índices de retención de Kovàts experimentales, los cuales se utilizan para determinar la retención de un compuesto, comparándolo con los tiempos de retención de n-alcenos, analizados bajo las mismas condiciones operacionales.^{(124) (127) (128) (129)}

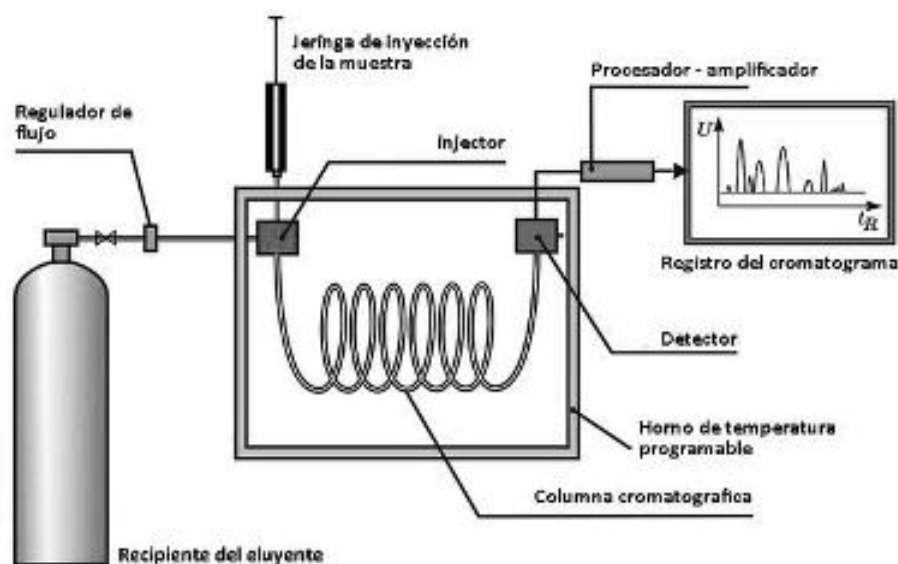


Figura 4. Esquema de un Cromatógrafo de Gases.⁽¹³⁰⁾

El proceso cromatográfico inicia cuando la muestra en fase vapor o disuelta en un solvente se introduce al inyector (200 - 300 °C), por medio de una jeringa. Los componentes de la muestra se vaporizan

inmediatamente y entran a la columna guiados por el flujo de gas de arrastre a través de un liner del inyector. Cada componente de la muestra interactúa con la fase estacionaria (f.e.) de la columna de manera diferente y viaja a lo largo de ella con una velocidad que depende del grado de su interacción con la fase estacionaria, de la velocidad del gas de arrastre y de la temperatura del horno.

Cada vez que un componente eluye de la columna, el detector genera una señal eléctrica la cual se amplifica y se registra en función del tiempo transcurrido, desde la inyección de la muestra hasta su detección, para dar origen al respectivo registro gráfico ilustrado a través de un cromatograma.

(122) (131)

2.2.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para la plena identificación de los compuestos presentes en una mezcla compleja de sustancias volátiles, es conveniente acoplar la cromatografía de gases con una técnica espectroscópica, como la espectrometría de masas, que es considerada uno de los instrumentos de análisis químico más funcional e importante. Un sistema cromatográfico consta de suministro de gases y controladores de flujo, inyector, horno, columna, detector y sistema de datos. (Véase Figura 5)

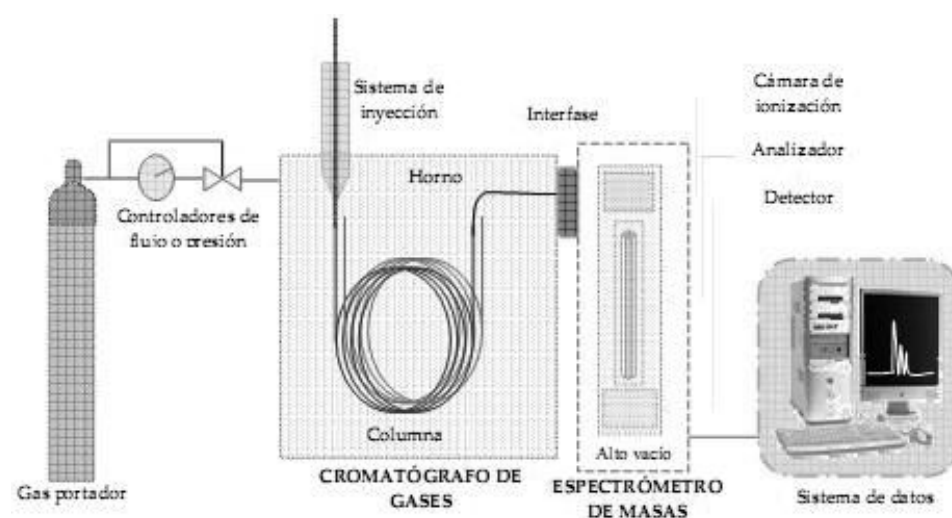


Figura 5. Bloques principales de un GC-MS.

La eficiencia de esta técnica en la identificación de los compuestos químicos de los AEs, la cual se manifiesta a través de los múltiples

estudios realizados.^{(132) (133) (134) (135)} Es así, como los analitos se separan en el cromatógrafo e ingresan al detector de masas que proporciona el espectro, conjunto de las señales producidas por las especies generadas durante la ionización y la fragmentación de cada sustancia. Los constituyentes del aceite se identifican en base a patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas.^{(122) (124) (136)}

La GC-MS permite realizar en una sola operación un análisis cualitativo y cuantitativo, para muestras del orden de 1µL, obteniendo proporciones en las muestras que se encuentran los componentes, y cuando se disponen de sustancias patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra.^{(137) (138)}

La cromatografía multidimensional se ha convertido en una nueva, pero infortunadamente aún costosa, posibilidad para el análisis de los AEs;⁽¹³⁹⁾ en columnas cromatográficas con fases estacionarias quirales se pueden distinguir de isómeros ópticos.^{(140) (141)}

2.3. DEFINICIÓN DE TERMINOS

Aceite esencial.- Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas, que provienen de las plantas, que dan ciertas características a flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Químicamente están formados por monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos.

Agente etiológico.- Microorganismo patógeno causante de una infección o intoxicación alimentaria en el hombre.

Cepa bacteriana.- Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento, por tanto, tienen fenotipo y genotipo definidos.

Colonia.- Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).- Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación.

Concentración Mínima Bactericida (CMB).- Se considera a la menor concentración de un antibiótico frente a la cual los microorganismos inhibidos no podrán volver a multiplicarse aunque sean separados del compuesto antibacteriano.

Disco de sensibilidad.- Discos de papel impregnados con concentraciones diferentes de algún antimicrobiano, los cuales son usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los compuestos mediante el método de difusión en placa.

Efecto antibacteriano.- Cualidad de un fármaco o agente químico que tiene la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas que se desarrollan en un medio dado, al actuar sobre ellas directa o indirectamente.

Escala de Mc. Farland.- Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.

Principio activo.- Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga.

Inóculo.- Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo microbiológico.

CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

Es de tipo experimental, debido a que la prueba del efecto antibacteriano por dilución en microplaca se realizó mediante la manipulación de la variable independiente representado por las concentraciones mínimas del aceite esencial diluidas en caldo Mueller Hinton, a la que se inocularon células bacterianas y las pruebas contaron con dos grupos de control, uno de crecimiento (CC) representado por 100 μ L de CMH con 50 μ L de inóculo y 50 μ L de DMSO y otro grupo control esterilidad (CE) representado por 100 μ L de CMH con 50 μ L de agua destilada y 50 μ L de concentraciones mínimas del aceite esencial; donde el grupo experimental fue representado por una solución de 100 μ L de CMH con 50 μ L de inóculo por cada pocillo, a las que se aplicaron 50 μ L de cada una de las concentraciones mínimas del aceite esencial para poner a prueba su efecto antibacteriano.

3.1.2. Diseño de investigación

La prueba del efecto antibacteriano se realizó mediante un Diseño de Bloques Completos, donde cada tratamiento fue asignado convenientemente dentro de cada bloque en igual número para todos los tratamientos. Cada bloque fue representado por una especie bacteriana, y cada tratamiento contó con 03 repeticiones, habiendo analizado un total de 30 unidades experimentales por cada bloque, los cuales se ilustran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño del efecto antibacteriano del aceite esencial por dilución en microplaca

Bloques	Tratamientos (μ g/ml)									
	C ₁ =1,600	C ₂ =800	C ₃ =400	C ₄ =200	C ₅ =100	C ₆ =50	C ₇ =25	C ₈ =12.5	C ₉ =6.25	C ₁₀ =3.12
<i>E. coli</i> ATCC 25922	C ₁ , R ₁	C ₂ , R ₁	C ₃ , R ₁	C ₄ , R ₁	C ₅ , R ₁	C ₆ , R ₁	C ₇ , R ₁	C ₈ , R ₁	C ₉ , R ₁	C ₁₀ , R ₁
	C ₁ , R ₂	C ₂ , R ₂	C ₃ , R ₂	C ₄ , R ₂	C ₅ , R ₂	C ₆ , R ₂	C ₇ , R ₂	C ₈ , R ₂	C ₉ , R ₂	C ₁₀ , R ₂
	C ₁ , R ₃	C ₂ , R ₃	C ₃ , R ₃	C ₄ , R ₃	C ₅ , R ₃	C ₆ , R ₃	C ₇ , R ₃	C ₈ , R ₃	C ₉ , R ₃	C ₁₀ , R ₃
<i>Salmonella</i> <i>typhi</i>	C ₁ , R ₁	C ₂ , R ₁	C ₃ , R ₁	C ₄ , R ₁	C ₅ , R ₁	C ₆ , R ₁	C ₇ , R ₁	C ₈ , R ₁	C ₉ , R ₁	C ₁₀ , R ₁
	C ₁ , R ₂	C ₂ , R ₂	C ₃ , R ₂	C ₄ , R ₂	C ₅ , R ₂	C ₆ , R ₂	C ₇ , R ₂	C ₈ , R ₂	C ₉ , R ₂	C ₁₀ , R ₂
	C ₁ , R ₃	C ₂ , R ₃	C ₃ , R ₃	C ₄ , R ₃	C ₅ , R ₃	C ₆ , R ₃	C ₇ , R ₃	C ₈ , R ₃	C ₉ , R ₃	C ₁₀ , R ₃
<i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i>	C ₁ , R ₁	C ₂ , R ₁	C ₃ , R ₁	C ₄ , R ₁	C ₅ , R ₁	C ₆ , R ₁	C ₇ , R ₁	C ₈ , R ₁	C ₉ , R ₁	C ₁₀ , R ₁
	C ₁ , R ₂	C ₂ , R ₂	C ₃ , R ₂	C ₄ , R ₂	C ₅ , R ₂	C ₆ , R ₂	C ₇ , R ₂	C ₈ , R ₂	C ₉ , R ₂	C ₁₀ , R ₂
	C ₁ , R ₃	C ₂ , R ₃	C ₃ , R ₃	C ₄ , R ₃	C ₅ , R ₃	C ₆ , R ₃	C ₇ , R ₃	C ₈ , R ₃	C ₉ , R ₃	C ₁₀ , R ₃

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

La población vegetal fue la muña especie *Satureja brevicalyx*, la cual se recolecto de campo mediante el muestreo no probabilístico a partir de ramas frescas en estado de madurez. Por otra parte, la población biológica, se determino de forma conveniente a bacterias que frecuentemente se transmiten a través de los alimentos, por lo mismo que su presencia en agua y alimentos, los cataloga como indicadores de contaminación, y consecuentemente por el impacto que ocasionan estas especies en la salud pública.

3.2.2. Muestra

La cantidad de muestra vegetativa para la extracción del aceite esencial fue 10.0 Kg. de hojas secas de *Satureja brevicalyx* y la muestra biológica considerada para los ensayos experimental fueron cepas latentes de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud – Lima, a través del Área de Parasitología del Laboratorio Referencial de Salud Pública de la DIRESA – Apurímac.

3.3. DEFINICIÓN DE VARIABLES

3.3.1. Variable independiente.

Son variable independiente las concentraciones minimas del aceite esencial de hojas de muña, representado por las 10 concentraciones diluidas con DMSO, y teniendo como indicador la concentración mínima inhibitoria y bactericida.

3.3.2. Variable dependiente.

Es la varible dependiente o de respuesta el efecto antibacteriano in vitro, representado por pocillos con escazo o nulo incremento de turbidez, donde fueron puestos a prueba las concentraciones del AE con los inoculos bacterianos en caldo Mueller Hinton.

3.3.3. Covariable.

Cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.

3.4. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

Tabla 2. Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADOR	INDICE
Independiente: Concentraciones mínimas del aceite esencial de hojas secas de <i>Satureja brevicalyx</i> .	Concentración Mínima Inhibitoria	1.52, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 (µg/ml)
	Concentración Mínima Bactericida	1.52, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 (µg/ml)
Dependiente: Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas secas de <i>Satureja brevicalyx</i> .	Escaza turbidez en pocillos	Resultados de absorbancia medidos de 425 a 560 nanometros
Covariable: Cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella typhi</i> y <i>Shigella dysenteriae</i> .	Crecimiento visible de cepas bacterianas	Unidad Formadora de Colonias (UFC)

3.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

3.5.1. Hipótesis general.

En condiciones de laboratorio, las concentraciones mínimas del aceite esencial de hojas de muña extraído mediante arrastre por vapor de agua, presentan efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*, debido a sus componentes bioactivos y características fisicoquímicas que posee.

3.5.2. Hipótesis específicos.

- Aceite esencial extraído a partir de hojas de muña por el método de arrastre por vapor de agua posee características fisicoquímicas potenciales para su aplicación como antibacteriano.
- Concentraciones mínimas de aceite esencial de hojas de muña inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.
- Concentraciones mínimas de aceite esencial de hojas de muña eliminan el crecimiento y desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*.

3.6. MATERIALES, INSUMOS Y EQUIPOS DE INVESTIGACIÓN

3.6.1. Materiales para la extracción del aceite esencial

- Hojas de Muña (*Satureja brevicalyx*), Curahuasi – Abancay – Apurímac.
- Balanza digital M&D, modelo KD-TACD-30, capacidad máxima 10 Kg.
- Balanza analítica, marca OHAUS (Adventurer™), capacidad máxima 210 g.
- Balanza digital, marca OHAUS, capacidad máxima 3000 g.
- Balón de gas licuado de uso domestico, capacidad 10 Kg.
- Jarra de plástico milimetrada, capacidad máxima 1000 mL.
- Envase de vidrio con tapa rosca color ambar de 500 mL.
- Pera de decantación, capacidad máxima de 250 mL.
- Vaso de precipitado, capacidad máxima de 500 mL.
- Matraz, capacidad máxima de 200 mL.
- Botellas de plástico de 3.0 Litros.
- Soporte universal.

3.6.2. Equipos para la extracción del aceite esencial

- Destilador de arrastre con vapor de agua de acero inoxidable con capacidad para destilar de 1.0 a 10.00 kilogramos de materia vegetal.
- Estufa, marca MEMMERT, modelo 200-800, rango (30°C ~ 250°C).
- Refrigeradora domestica, marca Samsung, Korea.
- Autoclave, capacidad de 5.0 Litros.
- Destilador de agua.

3.6.3. Materiales e insumos para la caracterización fisicoquímica del AE

- Picnómetro aforado a un volumen de 10 mL, marca Boeco, Germany.
- Bureta de 10 ml, marca GIARDINO MC, Italia.
- Vaso de precipitado de 100 mL, marca GIARDINO MC, Italia.

- Tubos de ensayo de 10 ml, marca GIARDINO MC, Italia.
- Etanol a 96°.
- Rojo de fenol.
- Hidroxido de potasio etanolico al 0,1 N.

3.6.4. Equipos para la caracterización fisicoquímica del aceite esencial

- Balanza analítica OHAUS (Adventurer™), capacidad máxima 210 g.
- Refractometro digital Reichert AR200, Estados Unidos.
- Equipo de titulación Acido-Base
- Cromatógrafo de Gases AGILENT TECHNOLOGIES, Serie 6890N, Estados Unidos.
- Espectrómetro de Masas AGILENT TECHNOLOGIES, Serie 5975B Estados Unidos.

3.6.5. Materiales para evaluar el efecto antibacteriano

Material biológico

- Cepas enteropatógenas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* provenientes del Instituto Nacional de Salud INS Lima – Perú.

Medios de cultivo

- Agar tripticasa soya, MERCK®, Alemania.
- Agar Mac Conkey, MERCK®, Alemania.
- Agar SS *Salmonella-Shigella*, MERCK®, Alemania.
- Agar Mueller Hinton, CONDA PRONADISA, España.
- Caldo Mueller Hinton, MERCK®, Alemania.

Insumos

- Alcohol etílico de 96°.
- Agua destilada estéril, Hospital Guillermo Diaz de la Vega – Abancay.
- Dimetilsulfoxido FISHER SCIENTIFIC, USA.

Materiales de vidrio y otros

- Hisopos esteriles para siembra de microorganismos.
- Placas Petri, con dimensiones de 100 x 15 mm, PYREX®, USA.
- Tubos con tapa rosca, de 10.0 mL, No. 9825 PYREX®, USA.
- Pipetas volumétricas de 1.0, 5 y 10 mL GIARDINO MC, Italia.
- Microplacas de fondo plano, 96 pozos de 200 μ L/pozo, GREINER BIO-ONE, Alemania.
- Cobertura de microplacas de 96 pozos, FALCON Labware®, USA.
- Puntas de 100 y 1,000 μ L para micropipetas.
- Caja porta puntas autoclavable, capacidad 96 puntas.
- Envases de 500 mL con tapa rosca autoclavable, BOECO, Alemania.
- Envases de 100 mL con tapa rosca autoclavable, SCHOTT, Alemania.
- Probetas volumétricas de 50 mL y 200 mL BOECO, Alemania.
- Propipeta, marca MARIENFELD, Alemania.
- Gradillas para 48 tubos de ensayo de 10 mL.
- Marcador de laboratorio.
- Mechero Bunsen.
- Cronómetro.

3.6.6. Equipos para la evaluación del efecto antimicrobiano

- Autoclave, marca LOYAL KEY FT11120, capacidad 120 litros, China.
- Balanza analítica. SARTORIUS Entris®, capacidad de 320 g. Alemania.
- Camara de calor y secado Classic Line, BINDER, modelo E28, Alemania.
- Espectrofotómetro, UV-VIS 6405 JENWAY, Reyno Unido.
- Estufa de incubación, MEMMERT, Alemania.
- Cabina de bioseguridad BIOAIR S@femate 1.2. visión, Italia.
- Micropipeta de 10 – 100 μ L, BOECO, Alemania.

- Micropipeta de 100 – 1,000 μ L, DRAGONLAB, Beijing - China.
- Micropipeta multicanal (08 canales), de 50 – 300 μ L, DRAGONLAB, China.
- Lector de microplaca ELISA, HUMAN Humareader Single Plus, Alemania.

3.6.7. Indumentaria

- Gorro para cirujano 3M, China.
- Mascarilla quirúrgica 3M NIOSH 1860 N95, China.
- Bata de laboratorio de Algodón, largo tres-cuartos hombre, Perú.
- Guantes quirúrgicos de latex NEOMEDIC LIMITED, Reino Unido.

3.7. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.7.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación fue desarrollado, en los laboratorios de Cromatografía de la Facultad de Ciencias Químicas y Físicas de la UNSAAC, Laboratorios de Química y Biotecnología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA y Laboratorio Referencial de Salud Pública de la Dirección Regional de Salud Apurímac.

3.7.2. Recolección de la especie vegetal

La muestra de muña fue recolectada a partir de una población vegetal en estado de madurez, ubicada a 13.00 km al nor-este de la ciudad de Abancay a una altitud de 3,910 metros, entre las laderas pedregosas de los cerros del anexo de Trancapata, sector de la comunidad Luis de la Puente Useda del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay, departamento de Apurímac. Las ramas fueron cortadas con la ayuda de una hoz, a unos 10 centímetros por encima de la superficie, durante el mes de junio del 2015. ⁽¹⁴²⁾

3.7.3. Preparación de la muestra vegetal

La muestra recolectada de muña (*Satureja brevicalyx*), fué trasladada a la localidad de Tamburco, donde fué tendido bajo un área de 28.00 m² con exposición al aire libre y bajo condiciones atmosféricas del lugar. En estas condiciones permaneció aproximadamente dos semanas, periodo en el cual alcanzó un secado íntegro de

hojas y ramas, las que facilitó la separación de las hojas y posteriormente su selección.⁽¹⁴³⁾

3.7.4. Identificación taxonómica de la especie vegetal

De la muestra recolectada de *Satureja brevicalyx* se separaron tres ramas herborizadas, con las cuales se solicitó al Herbario Vargas (CUZ) de la Facultad de Biología de la UNSAAC para ser diagnosticada por el Msc. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera, quien utilizando muestras del Herbario y bibliografía especializada, identificó la especie en estudio según el Grupo Filogenico de las Angiospermas (APG III – 2009) del Missouri Botanical Garden.

3.7.5. Extracción del aceite esencial

Las hojas secas seleccionadas fueron transportadas al Laboratorio de Operaciones de la Dirección Regional de Producción Apurímac, lugar donde se realizó la extracción del aceite esencial, a partir de 12 Kg de hojas secas de muestra mediante un destilador de acero inoxidable con diseño para destilación por arrastre con vapor de agua. El producto destilado (Agua y AE) se procedió a separar con una pera de decantación para conseguir un ceite esencial puro y finalmente se almacenó en un envase de vidrio color ambar a 4 °C. Cabe aclarar que el método del destilado fue convenientemente aplicado por su sencillez y bajo costo, pese a requerir largos periodos de tiempo y obtener bajos rendimientos.^{(144) (145) (146) (147)}

3.7.6. Determinación del rendimiento de extracción del aceite esencial

El porcentaje de rendimiento del aceite esencial (%RAE) se realizo mediante el método gravimétrico-volumétrico, con el siguiente modelo.⁽⁷⁰⁾

$$\%RAE = \frac{Vol. AE (mL) * \delta_{20^{\circ}C} \left(\frac{g}{mL}\right)}{Pmuestra (g)} * 100$$

Donde:

Vol. AE : Volumen de aceite esencial obtenido en mililitros

Pmuestra : Peso de la muestra a destilar en gramos

$\delta_{20^{\circ}C}$: Densidad relativa del aceite esencial de muña a 20°C

3.7.7. Determinación de las características fisicoquímicas del aceite esencial

Las constantes fisicoquímicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* fueron determinadas por métodos instrumentales como: Densidad por picnometría, solubilidad con solvente organico, indice de refracción por refractometría e indice de acidez por titulación, tal como a continuación se describe.

3.7.7.1. Densidad relativa

Para determinar la densidad se utilizó la norma ISO 279 (1998) que implico el uso de un picnómetro aforado a un volumen fijo y una balanza analítica de alta sensibilidad. Donde primeramente se pesó el picnómetro vacío, luego con el agua destilada y finalmente con el aceite esencial, una vez obtenido los pesos, se procedió a calcular la densidad mediante el siguiente modelo.⁽¹⁴⁸⁾

$$\delta_{20^{\circ}C} = \frac{P'' - P}{P' - P} * D$$

Donde:

P: Peso en gramos del picnómetro vacío

P': Peso en gramos del picnómetro con agua a 20°C

P'': Peso en gramos del picnómetro con AE

D: Densidad del agua a 20 °C (0.9982 g/mL)

3.7.7.2. Solubilidad en etanol

La solubilidad en etanol del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* fue determinado mediante la norma ISO 875 (1999), que consistió en la aforación de mezclas de etanol diluido en proporciones (v/v), empezando por las de mayor y desendiendo de cinco en cinco según la graduación dada "G" para experimentar la solubilidad sobre 1 mL de la muestra pura contenida en una probeta de 10 mL. Cada una de las graduaciones se añadieron en proporciones pequeñas sirviéndose de una bureta hasta que se lograsé conseguir una dilución clara, de donde se anotó la cantidad de alcohol utilizado y luego se continuó añadiendo hasta completar los 10 mL por cada dilución. Finalmente el grado de solubilidad del AE le correspondió a la inmediata disolución alcohólica superior "G + 5".⁽¹⁴⁹⁾

3.7.7.3. Índice de refracción

El índice de refracción fue determinado mediante el refractómetro Reichert AR200 Digital, para el cual se depositó una gota de aceite esencial en el prisma del equipo, luego se esperó algunos segundos para observar el resultado valorado a través del lector digital. ⁽¹⁵⁰⁾

3.7.7.4. Índice de acidez

La determinación del índice de acidez, se realizó por la técnica de titulación Acido-Base según la ISO 1242 (1999), ⁽¹⁵¹⁾ para lo cual primeramente se pesó un gramo del aceite esencial en un vaso de precipitado de 100 mL, enseguida se agregó 5 mL de etanol, con 0.13g del indicador rojo de fenol, ambos fueron bien homogenizados con el aceite y luego sobre esta solución se procedió a titular gota por gota con hidróxido de potasio etanólico al 0,1N, sirviéndose de una bureta, hasta lograr el primer cambio de coloración púrpura persistente, el cual se apuntó el volumen gastado de la solución patrón, para finalmente reemplazarlo en el siguiente modelo:

$$\% \text{ acidez} = \frac{Vg(\text{NaOH}) * N(\text{NaOH}) * \text{peq}}{V(\text{muestra}) * 1000} * 100$$

Donde:

Vg: Volumen gastado de Hidróxido de Sodio

N: Normalidad del Hidróxido de Sodio

peq: Peso equivalente de la fracción ácida que predomina en la sustancia

Vm: Volumen de la muestra.

3.7.8. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial

Una muestra del AE de *Satureja brevicalyx* fue transportada al laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias Químicas y Físicas de la UNSAAC, Lugar donde dicha muestra fué sometida a un análisis estructural de sus componentes químicos, mediante el Cromatógrafo de Gases de Serie 6890N con un inyector del tipo “split splitless”, acoplado a un Espectrómetro de Masas de Serie 5975B, ambos provenientes de la firma Agilent Technologies. El espectrómetro de masas trabajó en modo scan de adquisición a 70eV. Para ello se utilizó un analizador cuadrupolar a 150°C de temperatura del cuadrupolo, el detector trabajó

en un rango de masas de hasta 400 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 250°C y 230°C respectivamente. El volumen de inyección de la muestra a analizar fue de 1 µL a una concentración de 1000 ppm, la misma que se elucidó mediante una columna capilar Agilent 19091S-433, modelo HP-5MS de 30 metros de largo, 0.25 mm de diámetro interno, 0.39 mm de diámetro externo y 0.25 µm de espesor de la fase estacionaria. La temperatura del horno fue programada inicialmente a 60°C (2 minutos isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 180°C a razón de 3°C por minuto, otra rampa de 1°C por minuto desde 180°C hasta 250°C donde finalmente permaneció durante cinco minutos isotérmicos. Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante de 1mL/minuto. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de las señales del espectro de masas y los tiempos de retención de cada componente a identificar mediante el uso combinado de los datos compilados en las librerías NIST 05a.L y Flavor 2.L. así mismo los parámetros del detector selectivo de masas (MSD), incluyeron un rango de masas de 40 a 350 uma. El equipo realizó todo el análisis en un período de 41 minutos.

3.7.9. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial

3.7.9.1. Preparación de cepas bacterianas

Las cepas empleadas en la evaluación del efecto antibacteriano del AE de *Satureja brevicalyx* pertenecen a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud a través del Laboratorio Referencial en Salud Pública de la DIRESA de Apurímac, lugar donde se desarrolló las pruebas experimentales del efecto antibacteriano bajo condiciones de bioseguridad que requieren las especies:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella typhi*
- *Shigella dysenteriae*

Dichas cepas fueron reactivadas según los protocolos establecidos por el INS, y luego confirmadas por el método de diferenciación bioquímica, seguidamente fueron replicados para su conservación, en viales inclinados con medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína (TSA) a 4 °C.

3.7.9.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron obtenidos por el método de microdilución en caldo, para lo cual se empleó una placa de microtitulación para cultivos celulares de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas) de fondo plano y con capacidad aproximada de 300 μ L/pocillo. El procedimiento metodológico se detalla a continuación.

A. Preparación de diluciones seriadas del AE.

Inicialmente se preparó una solución madre a una concentración de 3,200 μ g/mL de AE de *Satureja brevicalex* diluido con Dimetilsulfoxido (DMSO) en una fiola de 25 mL, luego a partir de la solución madre se prepararon una serie de diez diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, las que comprendían entre 1,600 y 3.12 ppm, todas a volúmenes suficientes para experimentar ensayos sobre cinco placas de antimicrobianos, dicha preparación se realizo según el método estandarizado para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos insolubles en agua propuestos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), lo cual detallamos en la Tabla 3 y Figura 6.

Tabla 3
Preparación de concentraciones del aceite esencial diluido con DMSO

Tubo	Concentración (μ g/mL)	Transferir (mL)	A un tubo con DMSO (mL)	Concentración resultante (μ g/mL)	Tubo
n° 2	1,600	0.50	0.50	800	n° 3
n° 2	1,600	0.25	0.75	400	n° 4
n° 2	1,600	0.25	1.75	200	n° 5
n° 5	200	0.50	0.50	100	n° 6
n° 5	200	0.25	0.75	50	n° 7
n° 5	200	0.25	1.75	25	n° 8
n° 8	25	0.50	0.50	12.5	n° 9
n° 8	25	0.25	0.75	6.25	n° 10
n° 8	25	0.25	1.75	3.12	n° 11

DMSO: Dimetil sulfóxido

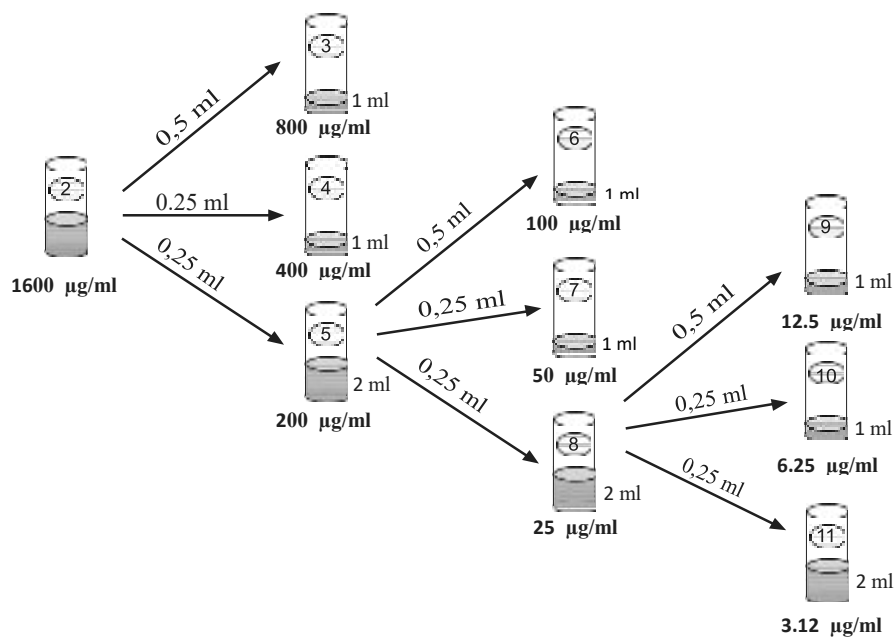


Figura 6. Esquema de preparación de las concentraciones del aceite esencial diluido con Dimetilsulfoxido. ⁽¹⁹³⁾

B. Preparación del medio de cultivo.

En un matraz de 200 mL fue preparado 60mL de caldo Mueller Hinton a doble concentración. En seguida fueron transferidos 4.95 mL del medio diluido a 10 tubos con tapa rosca y 5 mL de medio diluido a dos tubos más, finalmente los 12 tubos contenidos con el medio de cultivo fueron autoclavados a 121 °C durante 15 minutos, para permitirnos garantizar la esterilidad del medio durante los ensayos de dilución en microplaca, tal como se observa en la Figura 24, (Ver anexos).

C. Preparación de antibacteriano con medio de cultivo.

A cada uno de los 10 tubos que contienen 4.95 mL de caldo Mueller Hinton a doble concentración, se le fueron transferidos 50µL de las diluciones seriadas del antibacteriano en prueba (AE + DMSO), las que fueron rotuladas correspondientemente a medida que se les adicionaban las 10 diluciones del antibacteriano en prueba.

D. Preparación del inóculo.

La preparación del inóculo para los ensayos de dilución en microplaca se inicio con la reactivación de las cepas que fueron previamente replicadas sobre viales con Agar Tripticasa Soya (TSA) y estas tomadas

para replicarlas sobre agares diferenciados según cada especie bacteriana, las que fueron incubadas durante 18 horas, tiempo óptimo para alcanzar la fase de crecimiento exponencial de cada especie y en seguida tomar con un asa de siembra esteril colonias marcadas para suspenderlas en DMSO agitándolas hasta conseguir una turbidez aproximada a la escala de Mcfarlan (1.5×10^8 UFC/ml), valor que fue establecido con la ayuda del Espectrofotómetro, UV-VIS 6405 JENWAY, para luego con la ayuda de una micropipeta de un canal inocular 100 μ L de suspensión bacteriana a las microplacas en preparación, tal como se observa en la Figura 26.

E. Llenado de las placas.

De cada uno de los 10 tubos que contienen Caldo Mueller Hinton con concentración diferentes de Aceite Esencial de muña, se transfirieron 100 μ L a los pocillos de la placa de microdilución, comenzando del pocillo A1, B1, C1 y D1 hasta los pocillos A10, B10, C10 y D10, cada concentración depositado en cada columna por triplicado desde la columna 1 hasta la columna 10 por triplicado, en seguida a los mismos pocillos se inocularon con 100 μ L de la suspensión bacteriana que se prepararon a una escala Mcfarland, según la columna a la cual corresponda, tal como se observa en las Figuras 25 y 26.

Los pocillos de la columna 11 de la microplaca, fue llenada por triplicado con 100 μ L de medio líquido Caldo Mueller Hinton preparado a doble concentración mas la adición de 100 μ L de agua esteril que se utilizó para preparar las suspensiones bacterianas. Todo ello, a fin de hacerle el control de esterilidad al medio de cultivo, como al agua utilizada en la preparación de la suspensión bacterina.

Los pocillos de la columna 12 de la microplaca, fue llenada por triplicado con 100 μ L de medio líquido Caldo Mueller Hinton preparado a doble concentración, mas la adición de 100 μ L de suspensiones bacterianas, según las cepa que fueron puestas a prueba. Todo ello, a fin de controlar el crecimiento de cada cepa bacteriana en los ensayos realizados.

F. Incubación de las placas.

Una vez concluido los ensayos se hermetizo cada placa con sus respectivas tapas para garantizar la seguridad de las pruebas de microdilución, seguidamente se procedio a trasladar las placas de microdilución al incubador MEMMERT, en las que fueron sometidas a 37°C durante 24 horas, tal como se observa en la Figura 27 del apartado de Anexos, y como recomienda el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) de los Estados Unidos de America.

G. Lectura de los resultados.

Una vez concluido el periodo de incubación, se procedió a dar lectura a las placas de microdilución con lector ELISA, a una longitud de onda de 350 nanometros, la misma medida que se usó para el ajuste de la escala Mcfarland, la lectura de placas de microdilución se observa en la Figura 28 de la sección de los anexos.

3.7.9.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Las concentraciones mínimas bactericidas se obtuvieron mediante la técnica de siembra en superficie de agar, para lo cual primeramente se tomó los resultados obtenidos de las microplacas puestas a prueba, puntualmente sobre a aquellos pocillos donde se observa visiblemente un crecimiento nulo ó escaso incremento de turbides, de los que se fueron tomando alícuotas de 20µl, a fin de realizar repiques sobre placas petri con agar Mueller Hinton, divididas en secciones iguales y codificadas con un lapicero marcador, para finalmente incubarlas a 37°C durante 24 horas; toda ellas con la finalidad de confirmar que las unidades analizadas se encuentren en un estado bacteriostático o muerte celular del 99.9% UFC por efecto de uno o varios de los mecanismos de acción que ocasionó una de las concentraciones mínimas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, y con ello demostrar el efecto bactericida de la menor concentración del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, mas allá, de que la concentración mínima inhibitoria nos haya confirmado el efecto bacterioestatico de la menor concentración.

3.8. TRATAMIENTO DE DATOS

3.8.1. Recolección de datos

Los datos obtenidos a partir de la extracción y caracterización del AE de muña fueron recabados de forma manual a través de la observación visual, con la aclaración de que el análisis químico por GC/MS arrojó el resultado sistematizado en formato virtual e impreso. Para el caso de la concentración mínima inhibitoria que se determinó a través de la ausencia del incremento de turbidez en los pocillos de la placa de microdilución, fueron obtenidos dichos datos en formato impreso, y para la concentración mínima bactericida se recabó los datos de forma manual y visual.

3.8.2. Análisis estadístico de datos

El análisis de datos se realizó con el software estadístico INFOSTAT V.10 con los datos obtenidos de la turbidez (lectura espectrofotométrica), a los que se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y con sus medias aritméticas de cada uno de los tres bloques, se realizó la prueba de Tukey o comparaciones múltiples, lo cual permitió comprobar las diferencias entre las medias, a un 95% de nivel de confianza.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1.1. Rendimiento de la extracción del aceite esencial

Como resultado de la extracción del aceite esencial a partir de hojas secas de muña, por el método de arrastre por vapor de agua, se obtuvo con un rendimiento de 1.23% v/p. lo cual indica que, de 10.0 kilogramos de hojas seca de *Satureja brevicalyx* se logró obtener 133.30 mililitros de aceite esencial puro, cantidad que fue suficiente para su caracterización fisicoquímica y realizar la evaluación del efecto antibacteriano mediante las pruebas y ensayos experimentales.



Figura 7. Aceite esencial obtenido de hojas secas de *Satureja brevicalyx*. Laboratorio de Química, EAPIA - UNAMBA.

4.1.2. Características fisicoquímicas del aceite esencial

Las principales características fisicoquímicas del aceite esencial de hojas de muña (*Satureja brevicalyx*) extraído por el método de arrastre por vapor de agua, fueron determinados a una temperatura promedio de 20 ± 2 °C, del cual su extracción resultó tener un rendimiento bajo, siendo más denso que el agua e inmiscible, translúcido y relativamente ácido. Los cuales se aprecian en la Tabla 4.

Tabla 4
Características fisicoquímicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*

Características fisicoquímicas	Valores
Densidad relativa (20°C)	0.925 g/mL \pm 0.002
Solubilidad en etanol al 80%	8.32 mL \pm 0.03
Indice de Acidez (20°C)	0.102 \pm 0.013
Indice de Refracción (18°C)	1.4859 \pm 0.0252

Datos expresados en media \pm SD, n=3, p \leq 0.05

4.1.3. Componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*

Se identificaron 20 componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* al 97.5% de la muestra analizada por Cromatografía de Gases e identificada por Espectrofotometría de Masas, los cuales se identificaron de acuerdo a la medición del tiempo de retención que se registraron cada componente en la columna capilar del cromatógrafo, con los cuales se obtuvieron los denominados índices de retención, para luego identificar cada componente de acuerdo a los espectros de masas, con el apoyo de una base de datos de patrones químicos proporcionada por la librería NIST v 0.5 aL. Los componentes y sus valores se ilustran detalladamente en la Tabla 5 y en el Anexo 3 del presente documento.

Como componentes mayoritarios del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* destacan los monoterpenos oxigenados con el 86.09%, dentro de ellos la pulegona que representa el 55.78%, la mentona representa el 10.57%, el timol representa el 6.71%, linalol el 4.28%, la isopulegona el 3.38%, el eucaliptol el 1.68% y el terpineol acetate que representa el 1.53%. El resto de los componentes de este grupo se hallan en porcentajes por debajo del 1.0%.

Seguidamente predomina el grupo de hidrocarburos sesquiterpénicos (8.13%), entre los cuales destaca el β -cariofileno con 3.15%, el biciclogermacreno con 3.13%, el α -cadineno con 1.44% y el Germacreno D con 0.41%. El grupo de los hidrocarburos monoterpénicos fueron obtenidos con solo el 2.89%, del cual el 1.90% representa al p-cimeno, el 0.40% representa al limoneno y el 0.59% representa al γ -terpineno.

Tabla 5
Componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*
según la librería NIST v 0.5 a.L. Laboratorio de Cromatografía - UNSAAC.

Pico	IR (min.)	Compuesto	Fórmula	Contenido relativo (%)
1	5.127	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	0.18
2	6.155	Sabineno	C ₁₀ H ₁₆	0.21
3	7.681	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	1.90
4	7.817	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	0.40
5	7.922	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.68
6	8.848	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	0.59
7	10.371	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	4.28
8	12.540	Isomentona	C ₁₀ H ₁₈ O	0.58
9	12.967	Mentona	C ₁₀ H ₁₈ O	10.57
10	13.458	Isopulegona	C ₁₀ H ₁₆ O	3.38
11	14.096	α -terpenol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.76
12	16.215	Pulegona	C ₁₀ H ₁₆ O	55.78
13	18.549	Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	6.71
14	18.955	p-thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.31
15	20.617	Eucarvone	C ₁₀ H ₁₄ O	0.51
16	20.993	Terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1.53
17	23.970	β -cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	3.15
18	27.239	Biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	3.13
19	27.962	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	0.41
20	28.364	α -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	1.44

IR: Índice de retención en la columna capilar HP-5MS de 30 metros de largo, 250.00 μ m diámetro nominal, 0.25 μ m de espesor de la película nominal y a una presión constante de 9.0 PSI.

4.1.4. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial

Como prueba preliminar del efecto antibacteriano del aceite esencial, se realizó la detección de la capacidad inhibitoria a bajas concentraciones del aceite esencial de muña (*Satureja brevicalyx*) mediante el método de difusión en disco, con lo cual se demostró el potencial efecto antibacteriano del aceite esencial. Resultados que dieron apertura a la determinación del rango de concentraciones mínimas que se aplicaron en las pruebas finales del efecto antibacteriano evaluado por el método de microdilución en placa.

4.1.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

En la figura 8, se observan los resultados expresados en una placa de microdilución, sobre la que se puso a prueba el efecto inhibitorio de las concentraciones del AE de *Satureja brevicalyx* frente a los inoculos de *Escherichia coli* ATCC 25922. Dicho efecto se ven reproducidos a través de la presencia de pocillos con medio liquido (CMH) de color amarillo traslucido, indicandonos la anulación del crecimiento celular de *E. coli*, y en los pocillos que muestran una ligera opacidad entre uno y otro pocillo, nos indica crecimiento celular de *E. coli* ATCC 25922, dejando en claro que el menor tratamiento aplicado en el pocillo donde se observa que no hubo cambio de color luego de incubado a 37°C durante 24 horas tuvo efecto positivo, a dicho tratamiento se le atribuye el hallazgo de la concentración mínima inhibitoria del AE de *Satureja brevicalyx*, y con ello habiéndose logrado inhibir el crecimiento de las células bacterianas sometidas a pruebas del efecto antibacteriano.

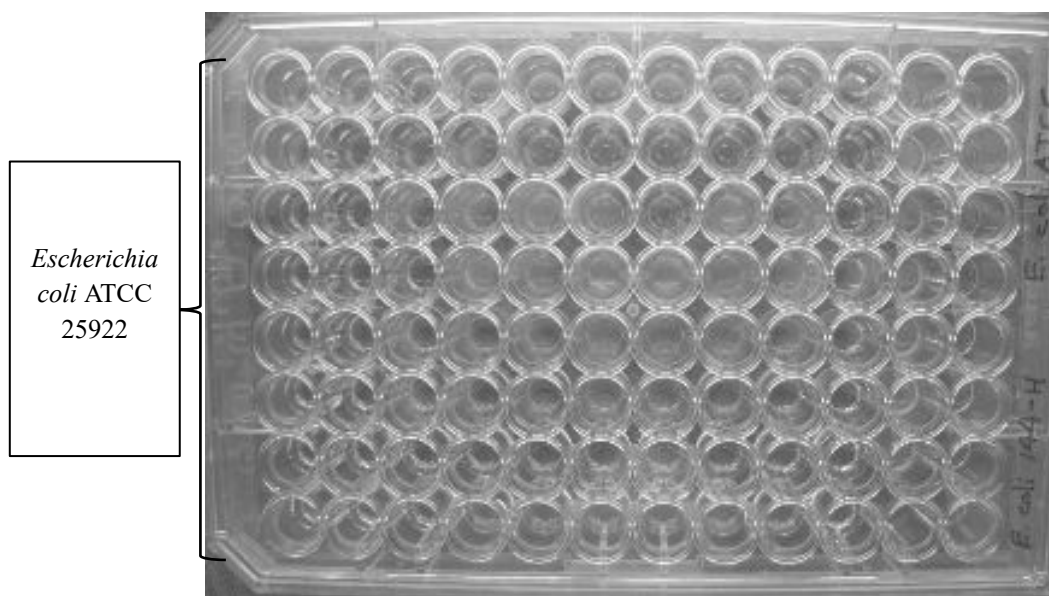


Figura 8. Determinación de la CMI del AE de *Satureja brevicalyx* sobre *E. coli* ATCC 25922. Lab. Referencial de Salud Pública, DIRESA - Apurímac.

En la Figura 9, se observa el efecto inhibitor de las concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* frente a los inoculos de las cepas de *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*, donde también se observó una variación ligera de color, que corresponde a un incremento de turbidez en los pocillos que se ensayó, y en aquellos pocillos donde no ocurrió incremento de turbidez, se puede explicar que esto ocurrió debido

al efecto inhibitorio que presentó la menor concentración del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, lo cual confirma dicho efecto inhibitorio de las concentraciones mínimas de aceite esencial sobre el crecimiento de las células bacterianas puestas a prueba.

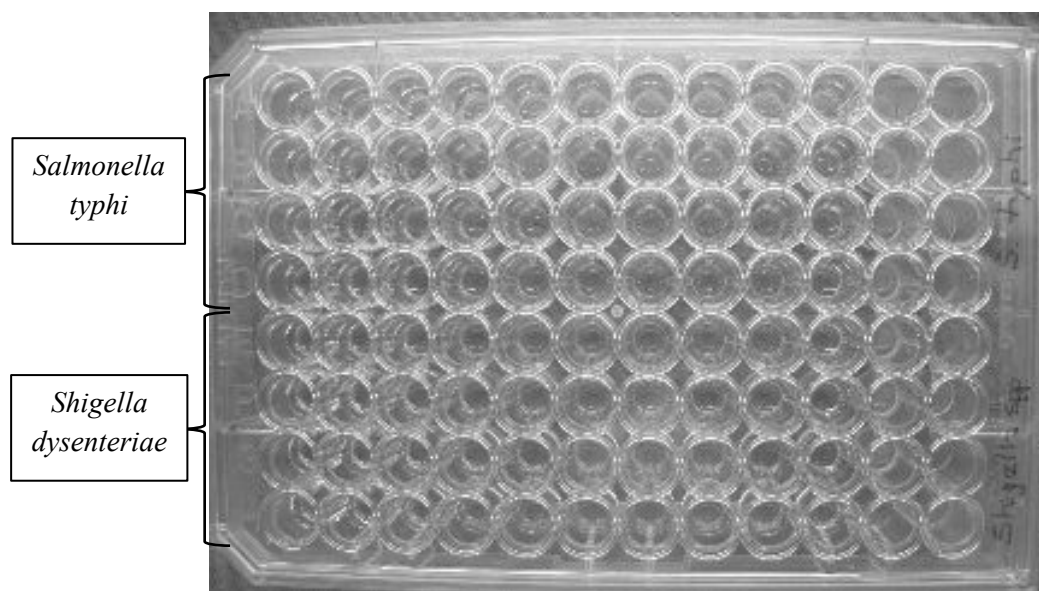


Figura 9. Determinación de la CMI del AE de *Satureja brevicalyx* sobre *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*. Laboratorio Referencial de Salud Pública, DIRESA - Apurímac.

En la Tabla 6, se muestran los promedios de los resultados de las lecturas de las placas de microdilución obtenidos mediante el lector ELISA (Ver Anexos), donde se muestra la relación de absorbancias obtenidas por el lector de microplacas, datos que corresponden a la reducción de absorbancia por el efecto de los tratamientos del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* para cada una de las especies bacterianas en estudio.

Tabla 6
Promedio de lecturas espectrofotométricas de las placas de microdilución luego de los ensayos del efecto antibacteriano de los tratamientos del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* sobre las bacterias sometidas.

Bacteria	Concentraciones de aceite esencial de <i>Satureja brevicalyx</i> ($\mu\text{g/mL}$)									
	1600	800	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12
E. Coli	0.076	0.078	0.079	0.075	0.078	0.078	0.082	0.080	0.081	0.086
S. Typhi	0.077	0.079	0.082	0.079	0.081	0.081	0.085	0.084	0.091	0.087
S. dysenteriae	0.076	0.077	0.077	0.074	0.078	0.079	0.078	0.082	0.088	0.085

Datos expresados en media \pm SD, n = 4, p \leq 0.05.

Con los resultados que se observan en la Tabla 6, podríamos explicar que los promedios mas bajos obtenidos por cada bloque, corresponden a los valores de los tratamientos con los que se obtuvieron las CMIs. Para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Shigella dysenteriae* se consiguió una absorbancia de 0.075 y 0.074 respectivamente, logrando sus CMIs con un tratamiento de 200 ug/mL para ambas especies, y con respecto al bloque representado por *Salmonella typhi* se logró una absorbancia de 0.077 con el tratamiento de 1,600 ug/mL siendo este el valor de su CMI, dicho tratamiento corresponde al valor mas alto de las concentración del aceite esencial diluido con Dimetilsulfoxido, valores que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7.

Resumen de las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* obtenidas mediante el lector de microplacas, en el Laboratorio del Banco de Sangre del Hospital Guillermo Diaz de la Vega.

Contraciones de aceite esencial (ug/mL)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
50	-	-	-
200	CMI	-	CMI
1,600	-	CMI	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

4.1.4.2. Determinación de la concentración mínima bactericida

En la Figura 10, se puede apreciar el efecto bactericida que ocasionó los tratamientos representados por las menores concentración del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, luego de incubado resiembras de alicuotas provenientes de los pocillos donde no ocurrió incremento visible de turbidez (inhibición del crecimiento de células bacterianas).

Por lo cual, podemos afirmar que en aquellas fracciones de las placas Petri donde muestra visiblemente un crecimiento nulo de unidades formadoras de colonias (UFC), nos confirma la muerte de las células bacterianas, los cuales fueron causados por efecto de los tratamientos aplicados a las microplacas al inicio de las pruebas para conocer el efecto antibacteriano, dichos tratamientos corresponden a las concentraciones más bajas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, los cuales los representamos como las concentraciones mínimas bactericidas.

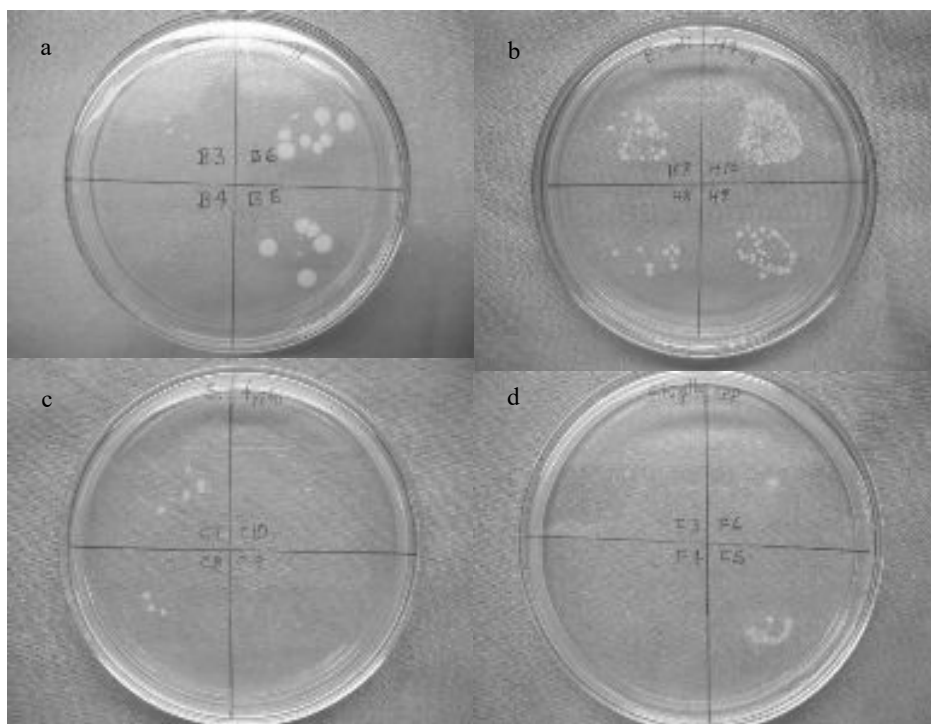


Figura 10. Efecto bactericida del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. a) y b) frente a *E. coli* ATCC 25922, c) Frente a *Salmonella typhi*, d) Frente a *Shigella dysenteriae*.

El efecto antibacteriano del AE de *Satureja brevicalyx* fue evaluado según la sección 3.4.7 del presente documento, dichos procedimientos permitieron determinar satisfactoriamente la CMI y CMB del AE de *Satureja brevicalyx* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae*, resultados que se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8.
Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del aceite de *Satureja brevicalyx*

Concentraciones de AE de <i>Satureja brevicalyx</i> (µg/ml)	Bacterias indicadoras de contaminación alimentaria		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
3.12	-	-	-
6.25	-	-	-
12.5	-	-	-
25	-	-	-
50	-	-	-
100	-	-	-
200	CMI - CMB	-	CMI - CMB
400	-	-	-
800	-	CMI	-
1,600	-	CMB	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria, **CMB:** Concentración mínima bactericida.

En la Tabla 8, se observa que los tratamientos 1 y 4 que corresponden a las concentraciones de 1,600 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ de aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, tuvieron un efecto satisfactorio, obteniéndose con la primera la CMI y con la segunda la CMB frente las cepas de *E. coli* ATCC 25922, resultados que corresponden al bloque 1. Para el segundo bloque representado por las cepas de *Salmonella typhi*, se obtuvo la CMI y CMB para los tratamientos 1 y 4 que corresponden a las concentraciones 1,600 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para el tercer bloque representado por las cepas de *Shigella dysenteriae*, se logró obtener tanto la CMI, como la CMB con el tratamiento de 200 $\mu\text{g/mL}$. Resultados que demuestran claramente el efecto biológico de los principios activos que posee el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* frente a cepas de interes alimentario.

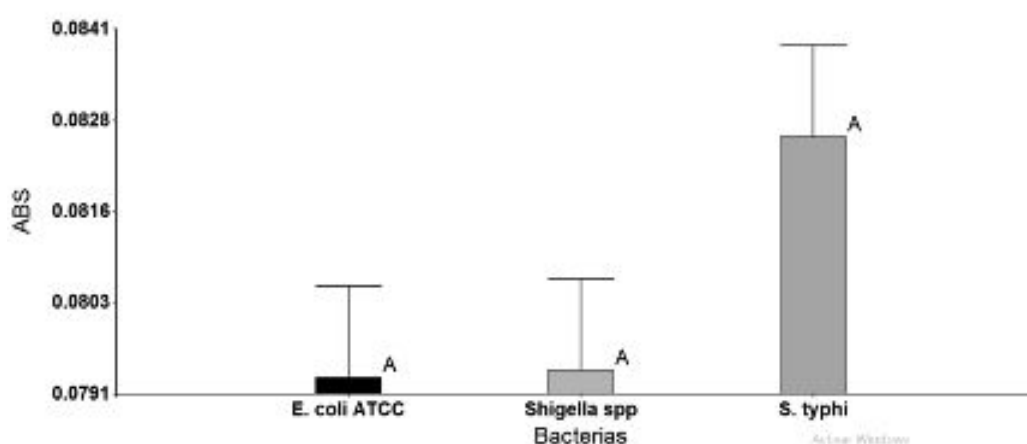


Figura 11. Análisis de varianza de las absorbancias resultantes por cada especie de bacterias.

En cuanto a los resultados de absorbancia podemos mencionar que a diferentes tratamientos representados por las concentraciones mínimas del aceite esencial, que fueron aplicados para inhibir suspensiones de bacterias enteropatógenas, en la Figura 11 se puede observar que la menor absorbancia presenta el *E. coli* ATCC 25922, lo cual indica que en forma general que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* tiene más especificidad para la inhibición de esta bacteria, teniendo similar efecto sobre *Shigella dysenteriae* y no ocurriendo lo mismo frente a *Salmonella typhi*, pero además no existiendo diferencia significativa de inhibición entre las tres bacterias.

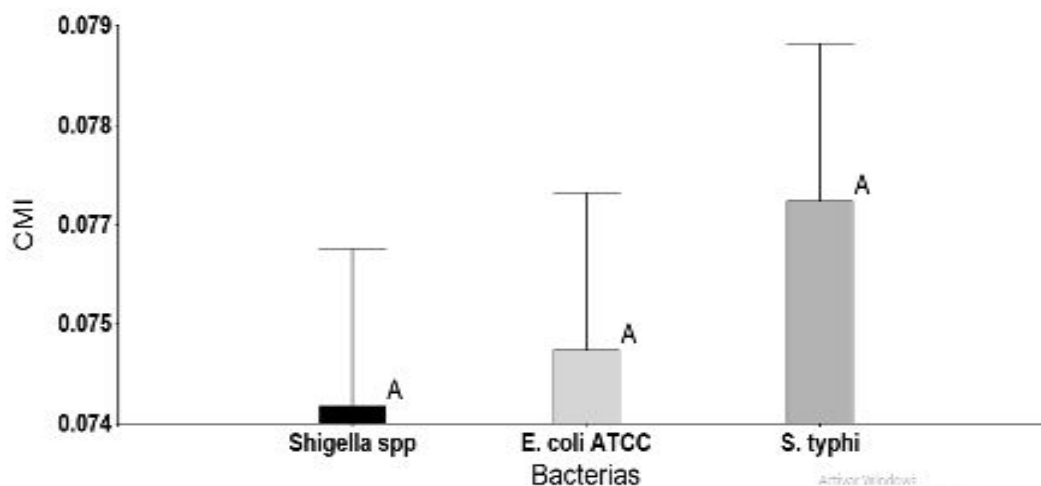


Figura 12. Analisis de varianza de las CMI's resultantes con respecto a cada especie bacteriana.

En la Figura 12, se puede observar la CMI's de las bacterias a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, a la vez observamos que no existe diferencia significativa entre sus inhibiciones de cada una de las bacterias, lo cual da a entender que todas las diluciones a una determinada concentración presentan capacidad para inhibir las especies bacterianas.

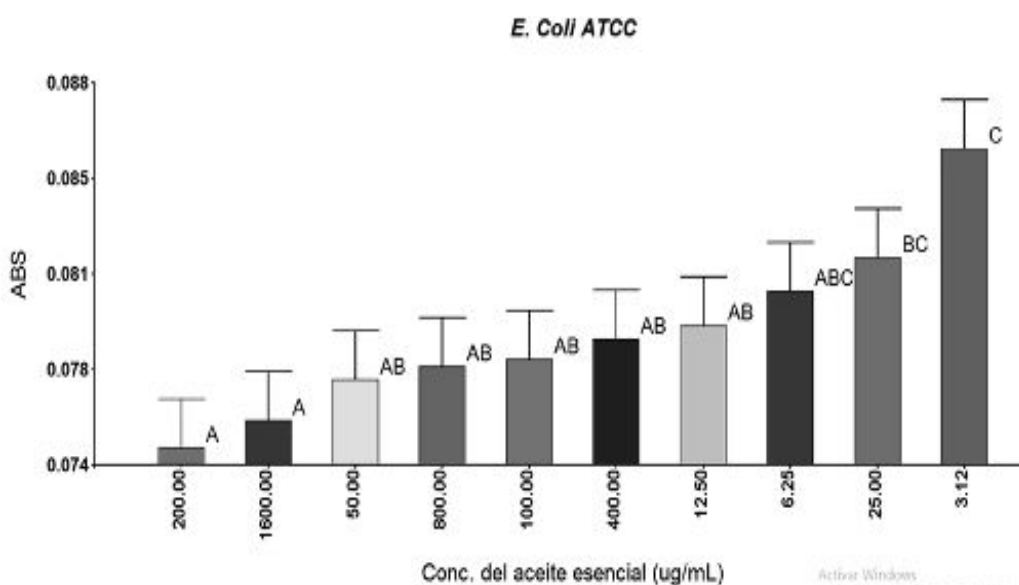


Figura 13. Analisis de varianza de las absorbancias con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la Figura 13, se puede observar que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* a una concentración de 200 ug/mL de tratamiento aplicado, fue la que más inhibió a las cepas de *E. coli* ATCC 25922 correspondiendo el menor valor de absorbancia, además posee diferencia significativa con las demás concentraciones especialmente con la concentración de 3.12 ug/mL.

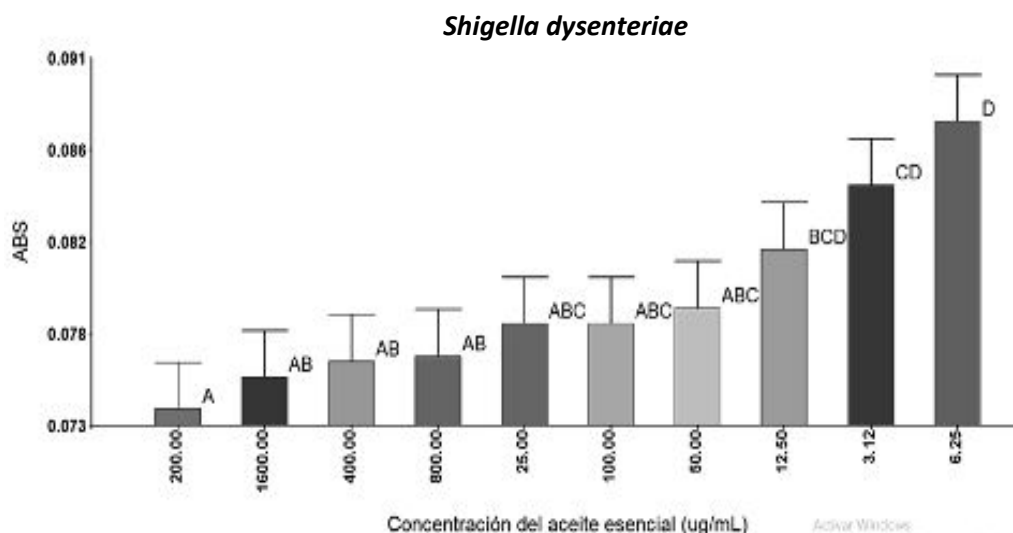


Figura 14. Analisis de varianza de absorbancia con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de *Shigella dysenteriae*.

En la Figura 14, se puede observar que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* a una concentración de 200 ug/mL de tratamiento aplicado, fue la que más inhibió a las cepas de *Shigella dysenteriae*, además dichos resultados posee diferencia significativa con respecto a los de mas tratamientos, especialmente con el tratamiento que corresponde a una concentración de 6.25 ug/mL.

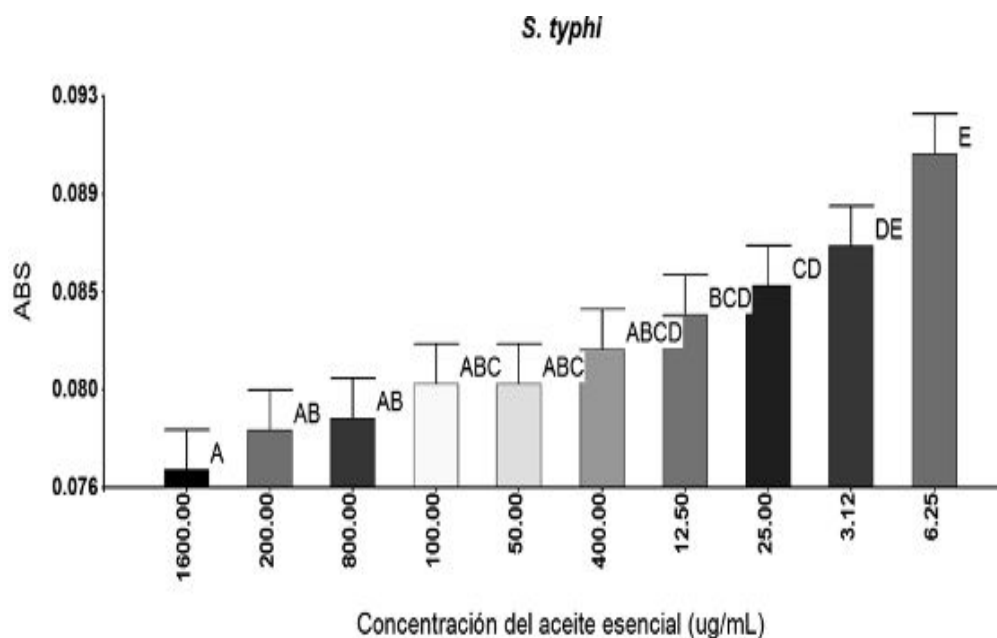


Figura 15. Analisis de varianza de las absorbancias con respecto a los tratamientos aplicados sobre las cepas de *Salmonella typhi*.

En la Figura 15, se observa que el tratamiento de 1600 ug/mL de concentración de aceite esencial de *Satureja brevicalyx* es la que más inhibe a *Salmonella typhi*, además de presentar diferencia significativa con las demás concentraciones especialmente con la concentración de 6.25 ug/mL.

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como parte inicial del estudio se recolecto muestras de *Satureja brevicalyx* del sector de Trancapata, distrito de Curahuasi (Abancay), basándonos en los estudios de Cano, Carhuapoma, Ricaldi ⁽¹⁵²⁾ y Huamani, ⁽¹⁵³⁾ dichos estudios concluyeron indicando que las muestras estuvieron conformadas por sustancias oxigenadas aromáticas, siendo los de mayores atributos aquellos aceites extraídos de las especies provenientes de los departamentos del sur de nuestro país, esto con respecto a sus cualidades fisicoquímicas que aquellos aceites extraídos de especies similares pero de otros lugares.

4.2.1. Extracción de aceite esencial

La extracción del aceite esencial se obtuvo con un rendimiento de 1.23% v/p. resultando ser un valor significativamente alto y cercano al resultado de 1.80% v/p obtenido por Carhuapoma Y. (2007), lo cual indica que, de 10.0 kilogramos de hojas seca de muña se pudo obtener 133.3 mililitros de aceite esencial puro, aclarando que los valores de rendimiento de extracción mayor o igual al 1.0% de aceite esencial, las categorizan a las especies aromáticas en excepcionalmente interesantes y promisorias. Habiéndose obtenido un valor significativamente alto por el método de arrastre con vapor de agua empleado.

4.2.2. Caracterización fisicoquímica del aceite esencial

De los resultados de la tabla 4 Características fisicoquímicas del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, podemos mencionar que dichos valores como la densidad relativa (0.925 g/mL) e índice de refracción (1.4859), se aproximan a los obtenidos por Carhuapoma Y. (2007) densidad relativa (0.9047 g/mL) e índice de refracción (1.475) del AE de *Satureja brevicalyx*. Debido a que ambas fuentes vegetales provinieron de condiciones geobotánicas y geoclimáticas similares.

En el presente estudio se logró identificar un total de 20 compuestos químicos por GC/MS que estarían proporcionando una alta bioactividad antimicrobiana actuando en sinergismo, de los cuales destacan la pulegona (55.78%), la mentona (10.57%), el timol (6.71%) y el linalol (4.28%), como los principales componentes bioactivos que se encontraron en alta concentración, siendo los tres primeros, monoterpenos oxigenados y reconocidos como marcadores químicos del género *Satureja*. ⁽¹⁵⁵⁾

Destacando a la pulegona como el componente mayoritario que posee grupo funcional cetónico, es principal pero no exclusivamente de la familia labiadas, es un potente antiséptico y biocida, pero reduce su proporción de este componente a temperaturas iguales o mayores a los 80°C, ⁽¹⁵⁶⁾ por otra parte favorece el parto y la expulsión de la placenta, ⁽¹⁵⁷⁾ a la vez demostro ser tóxico en la aplicación de dosis elevadas, ⁽¹⁵⁸⁾ ⁽¹⁵⁹⁾ llegando a metabolizar en el hígado a menthofuran, este es un metabolito altamente reactivo que se une irreversiblemente a los componentes de las células hepáticas en las que tiene lugar el metabolismo, que afecta al hígado. ⁽¹⁶⁰⁾ ⁽¹⁶¹⁾ ⁽¹⁶²⁾ También tiene efecto sedante, analgésico y disminuye la motilidad gastrointestinal. ⁽¹⁶³⁾

De esa forma Nassiff y *col* (2004), señalan que la pulegona por encima de 0.065g/250ml podría ocasionar aborto en mujeres embarazadas, ⁽¹⁵⁷⁾ también puede permitir la formación de epóxido de pulegona, este grupo químico es muy inestable, tiene mucha tensión angular y puede abrirse con facilidad frente a proteínas y ácidos nucleicos del organismo humano, con la posibilidad de generar mutaciones. ⁽¹⁶⁴⁾ Razón por la cual, el Comité de Expertos de la Organización Internacional Flavor Industry, recomiendan que la presencia de pulegona en productos alimenticios acabados, se limita a un máximo de 250 ppm en golosinas y de 20 pm en comidas y bebidas. ⁽¹⁶⁵⁾

La mentona, posee grupo funcional cetónico, se le relaciona con las propiedades antiespasmódica, carminativa y estomacal; ⁽¹⁶⁶⁾ a la vez es considerado un potencial pesticida orgánico que es aplicado como insumo para la formulación de productos pesticidas. ⁽¹⁶⁷⁾

El linalol, posee grupo funcional alcohol, con atributos de olor floral con un toque mentolado lo cual le ha conferido cierto valor para el uso de productos aromatizados, debido a ello fue considerado para la formulación de productos como jabones, detergentes, champus y lociones, considerado también antimicrobiano moderado, estomacal y carminativo. ⁽¹⁶⁸⁾

El timol es un monoterpeneo y su isómero es el carvacrol, ambos son componentes químicos principales de especies como el tomillo y oregano respectivamente, también lo encontramos en altas concentraciones en los aceites de *Clinopodium vulgare* ⁽¹⁶⁹⁾ y en bajas concentraciones en los AEs de *Clinopodium gilliesii*. ⁽¹⁷⁰⁾ El timol es conocido por sus propiedades desinfectantes y fungicidas que le otorgan

valor comercial, sobre todo por su sabor agradable se emplea en pastas dentales, enjuagues bucales y productos desinfectantes. El resto de los metabolitos estarían actuando en sinergismo con los componentes mayoritarios, por lo cual estos reforzarían la actividad biológica del AE de *Satureja brevicalyx*; además tres de los componentes mayoritarios hallados en el presente estudio, son considerados los más potentes antimicrobianos que poseen los aceites esenciales.^{(171) (172)}

Varios estudios incluyendo el presente, revelan que los AEs del género *Satureja* ó *Clinopodium* contienen porcentajes mayoritarios de componentes químicos del grupo de los monoterpenos oxigenados como pulegona, mentona, timol, carvacrol y linalol;^{(173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (145)} cuyos componentes predominan en varias de las especies del Perú.⁽¹⁸⁰⁾ Recientemente, algunos investigadores los reconocen como los componentes principales de los AEs que exhiben actividades antimicrobianas potenciales.⁽¹⁸¹⁾

4.2.3. Efecto antibacteriano del aceite esencial *Satureja brevicalyx*

Según se observa en la Tabla 4, el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* diluido a bajas concentraciones, inhibió notablemente el crecimiento de bacterias patógenas que frecuentemente ocasionan enfermedades transmitidas por alimentos, cuyo efecto sería producido principalmente por la acción sinérgica de los monoterpenos oxigenados mayoritarios presentes en el AE extraído de la especie proveniente de nuestra localidad.

La inhibición de *E. coli* 25922 se consiguió a una concentración de 100 µg/ml, mientras que para *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* fue a concentraciones de 6.25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente, estos dos últimos resultados se aproximan a los obtenidos por Carhuapoma y col. (2009), quienes determinaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* con una CMI de 4 µg/ml para *Salmonella typhi* como para *Shigella dysenteriae*.⁽¹⁸²⁾

Castaño y col. (2010), consiguieron la inhibición de *E.coli* con AE de *Rosmarinus officinalis* a una CMI de 4,096 ppm, mientras que para *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei* fue a 512 ppm, resultados que al comparar con los obtenidos, nos permite valorar la superioridad que posee el AE de *Satureja brevicalyx* de nuestro medio, inhibiendo notablemente bacterias patógenas Gram negativas predominantes en los alimentos.⁽¹⁸³⁾

Ud-Daula y col. (2016) Lograron determinar la CMI del AE de hojas de *Etlingera fimbriobracteata* (K. Schum.) frente a *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de 625µg/ml. A pesar de ser un buen resultado, este se encuentra muy lejano al que conseguimos inhibir esta bacteria con el AE de *Satureja brevicalyx*, lo cual se debe al bajo contenido de componentes inhibidores que tiene *Etlingera fimbriobracteata* en comparación a *Satureja brevicalyx*.⁽¹⁸⁴⁾

Argote y col. (2017), determinaron la actividad antibacteriana de los AEs de eucalipto, cascara de limón y mandarina frente a *S. aureus* y *E. coli* ATCC 25922. Los resultados demostraron que los aceites esenciales de eucalipto y mandarina tienen capacidad inhibitoria sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 con una CMI y CMB de 13.2 µl/ml para ambos aceites, mientras para el AE de cascara de limón se obtuvo una CMI y CMB de 14.6µl/ml. El AE de *S. brevicalyx* posee una actividad ligeramente similar, estos resultados cercanos se deben a que los componentes mayoritarios como el limoneno y eucaliptol de los AEs de Mandarina y Eucalipto respectivamente, son terpenos como el timol y carvacrol, catalogados metabolitos bactericidas de primer orden.⁽¹⁸⁵⁾

Vagionas y col. (2007), determinaron la actividad antimicrobiana de los AEs de tres especies de *Satureja* que crecen en Tanzania, contra bacterias y hongos dentro de ellos *Escherichia coli* ATCC 25922, con el que se obtuvo una CMI de 1.77 mg/ml, 5.70mg/ml y 6.14 mg/ml para los AEs de *Satureja biflora*, *Satureja masukensis* y *Satureja pseudosimensis* respectivamente. Los valores de CMI que obtuvimos con el AE de *Satureja brevicalyx* para *E. coli* ATCC 25922, son ligeramente superiores frente a estos resultados, debido al contenido de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados como Linalol, Timol y Spathulenol presentes mayoritariamente en los AEs de estas especies.⁽¹⁸⁶⁾

El análisis estadístico de medias realizado sobre los resultados de las pruebas de dilución en microplaca, permitio aclarar la existencia de diferencia significativa al 95% de confianza, entre las diez concentraciones de aceite esencial puestas a prueba para cada especie bacteriana, lo cual muestran que conforme disminuye la concentración del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*, disminuye la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas. Quedando demostrado que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* tiene una marcada actividad frente a *E. coli* 25922, *Salmonella typhi* y *Shigella dysenteriae* a concentraciones muy bajas.

Entre los monoterpenos oxigenados a los que se les atribuye propiedades antibacterinas, podemos mencionar a la pulegona y timol, este último es responsable de ocasionar, que la membrana celular se permeabilice, y que puedan desintegrar la membrana externa de las bacterias gramnegativas, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP. ⁽¹⁸⁷⁾ El daño a la pared celular bacteriana y la pérdida del contenido celular se puede estudiar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). ⁽¹⁸⁸⁾ ⁽¹⁸⁹⁾ ⁽¹⁹⁰⁾

El uso culinario de *Satureja brevicalyx* que se da hasta hoy, nos da luz para comprender el alto conocimiento que obtuvieron nuestros antepasados, respecto al aprovechamiento de su aroma y las bondades para mantener granos y tubérculos sanos por largos periodos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El aceite esencial extraído a partir de hojas de *Satureja brevicalyx* por el método de arrastre por vapor de agua con un rendimiento de 1.23% v/p, posee una densidad de 0.925 g/mL, un índice de acidez 0.102, un índice de refracción 1.4859 y es soluble a 80% de etanol; cuyas características fisicoquímicas se debe a la composición mayoritaria de monoterpenos oxigenados, siendo favorable su aprovechamiento como potente antimicrobiano en la conservación de alimentos procesados.
- El aceite esencial extraído a partir de hojas de *Satureja brevicalyx* mediante arrastre por vapor de agua, demostró tener efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Shigella dysenteriae* a concentraciones de 200 µg/mL para ambas especies, y logrando inhibir *Salmonella typhi* a una concentración de 800µg/mL.
- El aceite esencial extraído a partir de hojas de *Satureja brevicalyx* mediante arrastre por vapor de agua, demostró tener efecto bactericida sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Shigella dysenteriae* a concentraciones de 200µg/mL similar resultado obtenido en la inhibición de estas mismas especies, y logrando eliminar a *Salmonella typhi* a una concentración de 1,600µg/mL.

5.2. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria por el método colorimétrico de microdilución en caldo propuesto por Abate y col., 1998. Basado en adicionar el 0.8mg/mL del bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) a cada uno de los pozos luego de un periodo de 04 horas de incubación, con la finalidad de obtener resultados mejor representados y de fácil lectura.
- Realizar una evaluación de la toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* por el método de dosis fija, a fin de determinar una dosis para la formulación de una matriz sobre un determinado alimento procesado.
- Evaluar concentraciones minimas de aceite esencial de *Satureja brevicalyx* a través de la dosificación sobre alimentos para determinar el nivel de eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* y evaluar su impacto organoléptico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li, Y. Y., & Yi, Z. Y. Present situation and development of food antistaling agent and preservatives. *Journal of Beijing Institute Petrochemistry Technology*. 2003; 11: 18-23.
2. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Nychas, G. J. E., & Fasseas, K. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*. 2001; 13: 65-75.
3. Grahame, W. Gould. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for foods applications. *Journal of Food Protection*. 1996; 59(13): 82-86.
4. Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 2012; 45(2): 722-734.
5. Daza, Pérez, R. M. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 1998; 22(3): 57-67.
6. Liébana, U.J. Microbiología Oral. 1era. Edit. McGraw Hill, 1997.
7. García, C. Patricia. Resistencia Bacteriana a los Agentes Antimicrobianos en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 2003; 20: 11-23.
8. Silva, S. Jesús. Resistencia a antibioticos. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM*. 2006; 48(2): 105-112.
9. Kenneth, B. Williams Robert. Microbiología. 9a. s.l. : Publicaciones Cultural S.A., 1986.
10. Martínez, J. L., & Baquero, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews*. 2002; 15(4): 647-679.
11. Poole, Keith. Mechanims of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Mycobiology*. 2002; 92: 55-64.
12. Borbolla-Sala, M. E., del Rosario Vidal-Pérez, M., Piña-Gutiérrez, O. E., Ramírez-Messner, I., & Vidal-Vidal, J. J. Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco*. 2004; 10(2): 221-232.
13. Gupta, S. K., & Sharma, A. Dynamic properties of *Escherichia coli*. *World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015; 4(7): 296-307.
14. Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., & Álvarez, E. E. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*. 2006; 38: 38-40.
15. Lázaro, E., & Oteo, J. Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. *Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud*. 2006; 30: 549-562.
16. Ishii, S., Ksoll, W. B., Hicks, R. E., & Sadowsky, M. J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 612-621.

17. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. Brook Biología de los Microorganismos. Décima. s.l. : Prentice Hall, 2004.
18. Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. Microbiología. 5a. s.l. : McGraw-Hill-Interamericana de España, 2004.
19. White, A. S., Godard, R. D., Belling, C., Kasza, V., & Beach, R. L. Beverages obtained from soda fountain machines in the US contain microorganisms, including coliform bacteria. *International journal of food microbiology*. 2010; 137: 61-66.
20. Lopez, Alvarez, J. *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. s.l. : Cienciavet. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 1976.
21. Martino, T., Leyva, V., & Puig, Y. Principales bacterias patógenas en alimentos. *Temas de Higiene de los Alimentos. La Habana: Ciencias Médicas*. 2008: 29-42.
22. Bhunia, Arun K. Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. [ed.] Food Science Text Series. Second edition. s.l. : Springer, 2018.
23. Balow, A., Truper, H. G., Dworkin, M., & Harder, W. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 2da. s.l. : Slepecky and HE Hemphill, 1992. págs. 1663-1768. Vol. 4.
24. Carné, S., & Zaragoza, A. B-Galactomananos vegetales hidrolizados para prevenir la invasión intestinal de *Salmonella* en avicultura. *Publirreportaje, Selecciones avícolas*; 2014; 56(9):37-41.
25. Popoff, MY., Bockemühl, J., & Hickman-Brenne, FW. R. Supplement 1996 (40) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*. 148, 1997, p. 811-4.
26. Bopp, CA., Brenner, FW., Wells, JG., & Strockbine, NA. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. [aut. libro] Ellen Jo Baron, Michael A Pfaller, Fred C Tenover & Robert la Yolken Patrick R. Murray. Manual of Clinical Microbiology. 7ma. Washington DC : ASM Press; 1999, p. 459-74.
27. Brenner, D.J. Facultatively anaerobic gram-negative rods. [aut. libro] Krieg N.R & Holt J.C. [ed.] Bergey's. Manual of Systematic Bacteriology. 2da. Baltimore : Willians and Wilkins, 1984, Vol. 1, p. 408-516.
28. Brenner, F.W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(7): 2465-2467.
29. Paola, A., Triviño, R., Núñez, C., Alfonso, S., Humberto, J., & Vargas, L. Valoración de desinfectantes mediante el método dilución-neutralización en cepas de *Salmonella spp.* aisladas en plantas de beneficio porcino. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2011; 2: 187-201.
30. Benenson, A.S. El control de la Enfermedades Transmisibles en el hombre. Decimosexta. Washington DC: OMS; 1997. p. 458-463.
31. Schutze, G. E., Sikes, J. D., Stefanova, R., & Cave, M. D. The home environment and salmonellosis in children. 103. s.l. : Pediatrics, 1999. p. 1-5.
32. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Michael, A. Pfaller. Microbiología Medica. 6ta Edición. s.l. : Elsevier España, SL., 2009.

33. Moreno, A. Enfermedades infecciosas del intestino. [ed.] Farreras Rozman. 13a. s.l. : Harcourt Brace de España SA, 1997. p. 192-200. Vol. 13.
34. Banatvala, N., Cramp, A., Jones, I. R., & Feldman, R. A. Salmonellosis in North Thames (East), UK: associated risk factors. *Epidemiology & Infection*. 1999;122(2):201-207.
35. De Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, N. J., Bartelds, A. I., & Van Duynhoven, Y. T. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerging infectious diseases*. 2001; Vol. 7, p. 82.
36. Angulo, F. J., Johnson, K. R., Tauxe, R. V., & Cohen, M. L. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance*. 2000; 6: 77-83.
37. Mochales, F. B., Castelló, R. B., Marqués, J. C., Rodríguez, L. D., Alemany, X. G., Rodríguez, J. Á. G., ... & Durán, R. R. Resistencia Microbiana: ¿ QUÉ HACER? Informe del panel de expertos. *Revista Española de Salud Pública*. 1995; 69(6): 445-461.
38. Acheson, D. y & Hohmann, E. L. Nontyphoidal salmonellosis.. *Clinical Infectious Diseases*. 15 de enero de 2001; 32(2): 263-269.
39. Altekruse, S. F., Cohen, M. L., & Swerdlow, D. L. Emerging foodborne diseases. *Emerging infectious diseases*. 1997; 3(3): p. 285.
40. Hisek, G., Leschinsky, D., Irons, S., & Safranek, T. J. Multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium-United States, 1996 (Reprinted from MMWR, vol 46, pg 308-310, 1997). *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1997; 277(19): 1513-1513.
41. Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella spp*. *Revista latinoamericana de microbiología*. 2005; 47: 25-42.
42. Vázquez, N.J. Preparaciones de Proteínas de la Membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la Tifoidea Aviar. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México. 1995. Tesis de Maestría.
43. Ryan, K. J. Sherris: Microbiología médica. 5a. s.l. : McGraw Hill Mexico, 2011.
44. Wright, D. J. y Drasar, B. S. Dysentery in World War 1: *Shigella* a century on. *The Lancet*. 2014; 384(9955): 1651-1653.
45. Basualdo, J. A., Coto, C. E., & de Torres, R. A. Microbiología biomedica: bacteriología, micología, virología, parasitología, inmunología. 2da. s.l. : Atlante, 2006.
46. Rowe, B., and Gross, R.J. *Shigella*. [aut. libro] Krieg N.R and Holt J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9a. Baltimore : Wilkison & Wilkins, 1994.
47. DuPont, H. L., Hornick, R. B., Dawkins, A. T., Snyder, M. J., & Formal, S. B. The response of man to virulent *Shigella flexneri*. *The Journal of infectious diseases*. 1969; 2: 296-299.
48. Jawetz E., Melnick J., & Adelberg E. Microbiología Médica. 19a. s.l. : Manual moderno, S.A. De C.V., 1990.

49. Koneman, E. y Dowell, S. Diagnostico microbiologico Texto, Atlas a Color. s.l. : Medica Panamericana S.A., 1990.
50. Bernardini, M.L, Mounier J, d'Hauteville H, Coquisrondon M & Sansonetti P.J. Identification of icsA, a plasmid locus in *Shigella flexneri* that governs bacterial intra and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86:3867-3871.
51. Bennish, M. L., Harris, J. R., Wojtyniak, B. J., & Struelens, M. Death in shigellosis: incidence and risk factors in hospitalized patients. *Journal of infectious diseases.* 1990;161(3):500-506.
52. Bennish, Michael L. Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13(4): 319-324.
53. Maurelli, A. T., & Lampel, K. A. Especies de *Shigella*. In *Microbiología de los alimentos*. [ed.] Acribia. s.l. : Fundamentos y fronteras, 1997. p. 225-237.
54. Echeverria, P., Harrison, B. A., Tirapat, C., & McFarland, A. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Applied and environmental microbiology.* 1983;46:32-36.
55. Cronquist, A., & Takhtadzhian, A. L. An integrated system of classification of flowering plants. s.l. : Columbia University Press, 1981.
56. Brako, L., & Zarucchi, J. L. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru: Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú. 1993. pág. 45, Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden.
57. Chumacero, A., Iparraguirre, D., Riofrío, O., & Salas, E. Género *Satureja* (Lamiaceae) en la etnomedicina andina. Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima : s.n., 2003.
58. Carhuapoma, Y. M. Plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas. UNSCH. Ayacucho : s.n., 2002.
59. Mostacero, J., Mejía, F., & Gamarra, O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo : Normas Legales, 2002. p. 868-870. Vol. 2.
60. Salaverry, Garcia O. Beneficios medicinales de la muña. [ed.] Instituto Nacional de Salud. *El Investigador en Salud*. Setiembre de 2011, Vol. 10, p. 1-2.
61. Ormachea, A. Edgar C. Traditional use of muña (*Minthostachys* spp. labiatae) in phytosanitary aspects of Cusco and Puno. Peru, plant protection. Cusco : s.n., *Revista Peruana de Entomologia*, 1979; 22: 67-70.
62. Gibaja, S. Investigaciones químicas de la muña *M. mollis*. [Tesis de bachiller] Lima: UNMSM; 1960.
63. Vejarano, A., y Aliaga, V. Conservacion de tuberculos, almacenamiento de tuberculos de papa. Biología, Universidad Nacional del Altiplano. Puno : s.n., 1972.
64. Delgado, M. Control quimico de insectos que atacan a la papa. 1974.

65. Ruíz, W. Augusto. Fraccionamiento del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de la papa-cultivar Mariva. Programa de Ciencias Departamento de Química, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima : s.n., 1975.
66. Munares, Echevarría, M. Estudio del aceite esencial de la muña (*Minthostachis mollis*) en almacenaje de papa como inhibidor de brotamiento y microorganismos. [Tesis Bachiller]. Lima : Programa Académico de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina. s.n., 1983.
67. Soto, VM. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad analgésica en diferentes extractos de la *Satureja brevicalyx* Epl. “wayra muña”. [Tesis Bachiller] Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH.: s.n., 1999.
68. Diez, MJ. Efecto antiespasmódico de wayra muña “*Satureja brevicalyx* Epl” sobre el intestino aislado de cobayo. [Tesis Bachiller] Ayacucho : Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH. s.n., 2012.
69. Palomino, PR. Efecto antioxidante del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Satureja brevicalyx* Epl “wayra muña”. [Tesis Bachiller] Ayacucho: Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH. : s.n., 2005.
70. Bandoni, A. L. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata : Editorial de la Universidad Nacional de la Plata – CYTED, 2003.
71. Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Second Edition. s.l. : CRC Press Taylor & Francis Group, 2016.
72. Azcón, J. y Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. 1ra Edición. Barcelona : McGraw Hill interamericana, 2000. p. 261-283.
73. Salisbury, F. B., & Ross, C. W. Fisiología vegetal. s.l. : Grupo Editorial Iberoamérica, 1994. págs. 515-535.
74. Kirchner, J. G., & Miller, J. M. Preparation of terpeneless essential oils. A chromatographic process. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1952; 44(2): 318-321.
75. De Castro, M. L., Jimenez-Carmona, M. M., & Fernandez-Perez, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999;18(11): 708-716.
76. Guenther, E. The Essential Oils: History-Origin in Plants Production-Analysis. New York : Van Nostrand Company, 1948. Vol. 1.
77. Taiz, L. & Zeiger, E. Plant Physiology. Sunderland : Editorial Sinauer Associates Inc., 2002.
78. Lahlou, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Journal Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2004; 18(6): 435-448.
79. Rivera, S. P. G., Cardozo, R., & García, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) NE Brown ex Britton & Wilson. *Revista Guillermo de Ockham*. 2004; 2: 201-205.

80. De Ugaz, O. L. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. 2da. Lima : Universidad Católica del Perú, 1994.
81. Carey, F.A. Organic Chemistry. 5ta. s.l. : McGraw-Hill, 2003.
82. McMurry, J. Química orgánica. 6ta. México D.F. : Thomson Learning, 2005.
83. Valencia, O.C. Fundamentos de Fitoquímica. México D.F. : Editorial Trillas, 1995.
84. Romero, M.D. Plantas aromáticas: Tratado de aromaterapia científica. 1ra. Buenos Aires : Editorial Kier, 2004.
85. Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses. s.l. : John Wiley & Sons, 2008.
86. Escobedo, Monge, S. C. V. Conservación de yuca (*Manihot esculenta* Grantz) con aceite esencial de muña (*Mintostachys mollis*) y con germicida químico. [Tesis Bachiller] Lima Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina.: s.n., 1987.
87. Bruneton, J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2da. Zaragoza : Acribia S.A., 2001.
88. ISO 279, 1998. Essential oils –Determination of relative density at 20°C – Reference method. Geneve, Swiss : s.n., 1998.
89. Olsen, E. D. Métodos ópticos de análisis. 1ra. Barcelona : Reverté, 1990.
90. Alcazar, Del Castillo, J. Diccionario de Industrias Alimentarias: Índice de acidez. Cusco : s.n., 2002. pág. 345.
91. Albaladejo, Meroño, Q. El Aceite esencial de limón producido en España Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. [Tesis Doctoral] Murcia: Departamento de tecnología de los alimentos nutrición y bromatología, Universidad de Murcia. s.n., 2007.
92. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*. 2001; 91(3): 453-462.
93. Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., & Nychas, G. J. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of applied microbiology*. 2008; 104(6): 1586-1596.
94. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*. 2008; 124: 91-97.
95. Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. 1999; 62(9): 1017-1023.

96. López Malo, A, Paulo, E y Alzamora S. Naturally occurring compounds plant sources. [aut. libro] Sofos JN y Branen AL. Davidson PM. Antimicrobials in food. 3ra. s.l. : Taylor y Francis Group, 2005, p. 428-451.
97. Luqman, S., Dwivedi, G. R., Darokar, M. P., Kalra, A., & Khanuja, S. P. Potential of *rosemary* oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative Therapies in Health & Medicine*. 2007; 13(5) 54-59.
98. Davidson, P.M. & Branen, A.L. Antimicrobials in Foods. New York : Marcel Dekker Inc, 1993. págs. 95-136.
99. Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of food protection*. 2001; 64(7): 1019-1024.
100. Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, S., Kodama, T., Kashima, K. & Imanishi, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. Blackwell Publishing Ltd. 2003; 8(3): 207-213.
101. Oosterhaven, K., Poolman, B., & Smid, E. J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops & Products*. 1995; 1(4): 23-31.
102. Burt, S. A., Van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., ... & Veldhuizen, E. J. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(14):4484-4490.
103. Mattos, Cortegana, J. V. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) como aditivo no nutricional en la estimulación de *Lactobacillus spp.* y control de *Salmonella thyphimurium* en cuyes. [Tesis Bachiller] Lima : Escuela de Postgrado, Especialidad de Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina. s.n., 2007.
104. López-Malo, V. A. Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainillina. [Tesis Maestría] Cholula, Universidad de las Américas. Puebla : s.n., 1995.
105. Beuchat, L. R., & Golden, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food technology* (USA). 1989,
106. Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*. 1994; 76(6): 626-631.
107. Ismaiel, A., & Pierson, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *Journal of Food Science*. 1990; 55(6): 1676-1678.
108. Aureli, P., Costantini, A., & Zolea, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*. 1992; 55(5): 344-348.
109. Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., ... & Pedro, L.G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*. 2003; 36: 35-40.
110. Radušenė, J., Judpintienė, A., Pečiulytė, D., & Janulis, V. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *Biologija*. 2005; 4: 53-58.

111. Carhuapoma, YM. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling" urqu muña". [Tesis Doctorado] Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. s.n., 2007.
112. Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G. J. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 C. *Journal of applied microbiology*. 2000; 89(6): 901-909.
113. Skandamis, PN y Nychas, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 91(6): 1011-1022.
114. Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D. D. K., Bensaid, M., & Thonart, P. Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. *Letters in Applied Microbiology*. 2007; 44(3): 268-273.
115. Mejlholm, O., & Dalgaard, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in applied microbiology*. 2002; 34: 27-31.
116. Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goni, P., López, P., & Nerín, C. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007; 388(5-6): 1003-1011.
117. Rooney, M. L. Active packaging: Science and application. [aut. libro] Barbosa-Canovas G y Aguilera JM. Welte-Chanes JS. Engineering and Food for the 21 st Century. s.l. : CRC Press, Boca Ratón, 2002, p.539-547.
118. Guynot, M. E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marin, S. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 94(5): 893-899.
119. Eissa, H. A., Abd-Elfattah, S. M., & Abu-Seif, F. A. Anti-microbial, anti-browning and anti-mycotoxigenic activities of some essential oil extracts in apple juice. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008; 58(4): 425-432.
120. Gould, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of food protection*. 1996; 59(13): 82-86.
121. Vega-Portocarrero, E. y López-Malo, A. Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. *Revista Mexicana Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2009; 3: 85-95.
122. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. Principios de análisis instrumental. 5ta. Madrid : McGraw-Hill Interamericana de España, 2001. págs. 490-528. Vol. 543.
123. McNair, H. M., & Miller, J. M. Basic gas chromatography. New York : John Wiley & Sons, 2011.
124. Stashenko, E. E., Combariza, Y., & Puertas, A. M. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Universidad industrial de Santander. 1998.

125. Sandra, P., & Bicchi, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. s.l. : Heidelberg: Huethig, 1987. págs. 259-274.
126. Schreier, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Chromatographic methods. New York : Ed.Hüthig-Verlag, *Molecular Nutrition & Food Research*. 1984; 29(7): 718-719.
127. Rubinson, K. A. & Rubinson, J. F. Análisis instrumental. 1ra. Madrid : Prentice Hall, 2000. págs. 704-705.
128. Jennings, W., Mittlefehldt, E., & Stremple, P. Analytical gas chromatography. s.l. : Academic Press, 1997.
129. Kovats, E. S. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advance Chromatografi*. 1965; págs. 229-247.
130. Castaños, Enrique. Lidia con la Química. [En línea] 07 de -08- de 2015. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/05/instrumentacion-en-la-cromatografia-gas-liquido/>.
131. Grob, R. L., & Barry, E. F. Modern practice of gas chromatography. s.l. : John Wiley & Sons, 2004.
132. Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., & Martínez, J. R. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995; 697(1-2): 501-513.
133. Stashenko, E. E., Prada, N. Q., & Martínez, J. R. HRGC/FID/NPD and HRGGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1996;19(6): 353-358.
134. Stashenko, E. E., Cervantes, M., Combariza, Y., Fuentes, H., & Martínez, J. R. HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and in vitro evaluation of its antioxidant activity. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1999; 22(6): 343-349.
135. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 2004; 1025: 93-103.
136. McLafferty, F.W., & Turecek, F. Interpretation of mass spectra. [ed.] Biological Mass Spectrometry. 4ta. California: University Science Books, 1993. pág. 374. Vol. 23.
137. Games, D. E. Practical Aspects of Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1985; 65, p. 329.
138. Duran, D. C. 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] Bucaramanga: Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. Doctoral dissertation, 2005.

139. Shellie, R. A., & Marriott, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of Pelargonium graveolens essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry. *Analyst*. 2003;128(7): 879-883.
140. Kreis, P., & Mosandl, A. Chiral compounds of essential oils. Part XIII. Simultaneous chirality evaluation of geranium oil constituents. *Flavour and fragrance journal*. 1993; 8(3): 161-168.
141. Ravid, U., Putievsky, E., & Katzir, I. Chiral gc analysis of menthone and isomenthone with high enantiomeric purities in laboratory-made and commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*. 1994; 9(3): 139-142.
142. Cano, Pérez, C.A. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. [Tesis Maestría] Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2007.
143. UNIFEM, Fondo de las Naciones Unidas para el Desarrollo de la Mujer, [ed.]. Técnicas de secado: Tecnología aplicada al ciclo alimentario. 2da. Lima : Rachel, 1998.
144. Motle, P. Proyecto de Factibilidad para la Instalación de una Planta de Extracción del Aceite Esencial de Menta. [Tesis Bachiller] Lima, Universidad Nacional de Ingeniería. 1977.
145. Sefidkon., F, Abbasi, K., & Khaniki, G. B. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Journal Food Chemistry*. 2006; 99:19-23.
146. Guan, W., Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Journal Food Chemistry*. 2007; 101(4): 1558-1564.
147. Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Journal Food Chemistry*. 2009; 112(4): 1072-1078.
148. ISO 279:1998, International Standard Organization. Essential oils. Determination of relative density at 20°C. Second edition.
149. ISO 875:1999, International Standard Organization. Essential oils-Evaluation of miscibility in ethanol. Second edition.
150. ISO 280: 1998, International Standard Organization. Essential oils. Determination of refractive index. Second edition.
151. ISO 1242: 1999, International Standard Organization. Essential oils. Determination of acid value. Second edition.
152. Ricaldi, Sarapura, J. O. Análisis GC-MS de la composición fitoquímica del aceite esencial de Chiuyche (*Satureja incana*). [Tesis Maestría] Huancayo, Unidad de Postgrado de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, UNCP. 2014.
153. Huamani, Quinte, W. Estudio de compuestos bioactivos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) por cromatografía de gases-espectrometría de masas en tres niveles altitudinales del distrito de Huando. [Tesis Bachiller] Huancavelica, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Académico Profesional de Agroindustria, UNH. 2015.

154. Kokkini, S. Essential oils as taxonomic markers in *Mentha*. [aut. libro] R. M., Reynolds, T. Harley. *Advances in labiate science*. Great Britain : The Royal Botanic Gardens, 1992, págs. 325-334.
155. Muñoz, Acevedo, A., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*. 2007; 13(33): 125-128.
156. Asekun, O. T., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Journal Food Chemistry*. 2007; 101(3): 995-998.
157. Nassiff, AD, Ricciardi, AE, Torres, GA y Ricciardi, AM. Contenido en pulegona de la infusión de *Mentha pulegium* L. Comunicaciones científica y tecnológicas. Universidad Nacional del Noreste, 2004.
158. Thorup, I., Würtzen, G., Carstensen, J., & Olsen, P. Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol. *Toxicology letters*. 1983; 19(3): 207-210.
159. Moorthy, B. Toxicity and metabolism of R-(+)-pulegone in rats: its effects on hepatic cytochrome P450 in vivo and in vitro. *Journal of the Indian Institute of Science*. 1991;71:76-78.
160. Chen, L. J., Lebetkin, E. H., & Burka, L. T. Metabolism of (R)-(+)-pulegone in F344 rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001; 29(12): 1567-1577.
161. Gordon, W. P., Huitric, A. C., Seth, C. L., McClanahan, R. H., & Nelson, S. D. The metabolism of the abortifacient terpene,(R)-(+)-pulegone, to a proximate toxin, menthofuran. *Drug Metabolism and Disposition*. 1987; 15(5): 589-594.
162. Anderson, I. B., Mullen, W. H., Meeker, J. E., Khojasteh-Bakht, S. C., Oishi, S., Nelson, S. D., & Blanc, P. D. Pennyroyal toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*. 1996; 124(8): 726-734.
163. Suárez, A., Echandi, M. M., Ulate, G., & Ciccio, J. F. Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Revista de biología tropical*. 2003; 51: 247-252.
164. Ruitón, C. M. F., & Chipana, Y. M. 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*. 2001; 4: 23-39.
165. Burzaco, Vidaurreta, A., Pérez-Alonso, M. J., & Velasco Negueruela, A. Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas con pulegona: *Mentha pulegium* L. y *Mentha cervina* L. Fresen. *Botanica complutensis*. 1992; 17: 79-85.
166. Kuklinski, C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega, 2003.
167. Krieger, R. Handbook of pesticide toxicology, two-volume set: principles and agents. s.l. : Academic press, 2001.
168. Hänsel, R., Sticher, O. Pharmakognosie – phytopharmazie. Berlin : Springer-Verlag, 2004.

169. Tepe, B., Sihoglu-Tepe, A., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Journal Food Chemistry*. 2007; 103(3): 766-770.
170. Vázquez, A. M., Aimar, M. L., Decarlini, M. F., Demmel, G. I., Cantero, J. J., & Ruiz, G. M. Constituyentes Orgánicos Volátiles de *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze: Análisis por HS-SPME e hidrodestilación clásica. *Rev. Colomb. Investig. Agroindustriales*. 2016; 3(9): 91-100.
171. Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Açar, G., Özkan, H., Kartal, N., ... & Şahin, F. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2003; 51(14): 3958-3965.
172. Bezić, N., Skočibušić, M., & Dunkić, V. Antimicrobial effect of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oil. *Acta Botanica Croatica*. 1999; 58: 99-104.
173. Rojas, L. B., & Usubillaga, A. Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour and fragrance journal*. 2000; 15: 21-22.
174. Stashenko, E.E., Gutierrez, A., Martinez, J.R. y Manrique, L.D. Análisis por GC/FID y GC/MS de la composición química y estudio de la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por diferentes técnicas, de *Satureja viminea* L. cultivada en Colombia. *Scientia Chromatographica*. 2017; 9: 25-39.
175. Kan, Y., Uçan, U. S., Kartal, M., Altun, M. L., Aslan, S., Sayar, E., & Ceyhan, T. GC-MS analysis and antibacterial activity of cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. Essential oil. *Turkish Journal of Chemistry*. 2006; 30(2): 253-259.
176. Muschietti, L., Van Baren, C., Coussio, J., Vila, R., Clos, M., Cañigual, S., & Adzet, T. Chemical composition of the leaf oil of *Satureja odora* and *Satureja parvifolia*. *Journal of Essential Oil Research*. 1996; 8(6): 681-684.
177. Gören, A. C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Wilkinson, J. M., & Cavanagh, H. M. Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation, thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity. *Natural Product Research*. 2004; 18(2): 189-195.
178. Skočibušić, M., Bezić, N., & Dunkić, V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Journal Food Chemistry*. 2006; 96: 20-28.
179. Sefidkon, F., & Jamzad, Z. Chemical composition of the essential oil of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*). *Journal Food Chemistry*. 2005; 91: 1-4.
180. Viturro, C. I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H., & Fournet, A. Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. *Flavour and fragrance Journal*. 2000; 15(6): 377-382.
181. Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., & Hirata, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2004; 19: 62-68.

182. Carhuapoma, M., López, S., Roque, M., Velapatiño, B., Bell, C., & Whu, D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA”. *Ciencia e investigación*. 2009; 12(2): 83-89.
183. Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jiménez, S. L. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*. 2010; 17(2): 149-154.
184. Ud-Daula, A. S., Demirci, F., Salim, K. A., Demirci, B., Lim, L. B., Baser, K. H. C., & Ahmad, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etlingera fimbriobracteata* (K. Schum.). *Industrial Crops and products*. 2016; 84:189-198.
185. Argote-Vega, F. E., Suarez-Montenegro, Z. J., Tobar-delgado, M. E., Perez-Alvarez, J.A., Hurtado-Benavides, Andres., & Delgado-Ospina, Johannes. Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2017; 15(2): 52-60.
186. Vagionas, K., Graikou, K., Ngassapa, O., Runyoro, D., & Chinou, I. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*. 2017; 103(2): 319-324.
187. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94(3): 223-253.
188. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 91(3): 453-462.
189. Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 2001; 91(6): 1011-1022.
190. Burt, S. A., & Reinders, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*. 2003; 36(3): 162-167.
191. Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Mihajlović, B., & Matavulj, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Plant medic*. 2003; 69(05): 413-419.
192. Cuevas, Carlos F. Amábile. Diccionario de Infectología y Microbiología Clínica. México: Bayer de México, 2008.
193. Cantón, E., Martín, E., & Espinel-Ingroff, A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Iberoam Micol*. 2007; 15(6): 121-130.
194. Sefidkon, F., Abbasi, K., & Khaniki, G. B. Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food chemistry*. 2006; 99: 19-23.
195. Mazarei, Z., & Rafati, H. Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT*. 2019; 100: 328-334.

196. Fuertes C, Murguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Rev. Ciencia e Investigación*. 2001; 6(1): 23-39.
197. Peredo Luna H, Palou García E y López Malo A. Aceites Esenciales: Métodos de extracción. *Rev. Temas selectos de ingeniería de alimentos* (Puebla). 2009; 3(1): 24-32.
198. Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2004; 18(6):435-48.
199. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". En Resúmenes de Trabajos de Investigación del I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas, Lima, Perú. 1999.
200. Contreras G. Actividad antimicrobiana del aceite esencial *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. [Tesis Bachiller]. Universidad Nacional Agraria La Molina: Facultad de Biología. 1983.
201. Salmón B. Laurece R., Contribución al estudio de la especie vegetal (*Minthostachys mollis*) Kunt Griseb, “Muña” en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. [Tesis bachiller] Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. 1994.
202. Inga BA y Guerra MB. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en salud [Tesis Bachiller]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM; 2000.
203. Díaz K. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. [Tesis Bachiller] Lima: UNMSM; 2005.
204. Guiza Pérez DP y Rincón Prieto LM. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* [Tesis Bachiller]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
205. Carpio, A. Estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral. *Revista UCV*, 2008; 23(2).
206. Cano C., Bonilla P., Roque M, & Ruiz J. Actividad antimicótica IN VITRO y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. 2008; 25(3): 298-301.
207. Chávez Torres, L., Díaz Castañeda, F. D. M., Escalante Rosadio, G., & Estrada Montañez, E. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*. 2008:13(2).
208. Azaña Espinoza I.L. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis bachiller] Lima: UNMSM; 2010.

209. Huari Guerrero G.M. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (muña) sobre *Streptococcus mutans*. [Tesis de bachiller] Lima: UNMSM; 2014.
210. Reyes Jurado F, López Malo A, Palou Enrique. Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Foot Protection* 2016; 79(2): 309-15.
211. Saharkhiz, M. J., Zomorodian, K., Taban, A., Pakshir, K., Heshmati, K., & Rahimi, M. J. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Three *Satureja* Species Against Foodborne Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2016;19(8): 1984-1992.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• APARADO POSTAL
N° 021 - Cusco - Perú

• FAX: 238156 - 238173 - 222512

• RECTORADO

Calle Tigr. N° 122

Teléfonos: 222571 - 224891 - 234181 - 234398

• CIUDAD UNIVERSITARIA

Av. De la Cultura N° 721 - Teléfonos: 238261 - 222510 - 232170 - 232875 - 232226

• CENTRO TELEFÓNICO: 232358 - 232310
249937 - 243326 - 243857 - 243838

• LOCAL CENTRAL

Parque de la Universidad
Teléfonos: 227571 - 257221 - 228015

• MUSEO ENKA

Cerro del Almirante N° 103 - Teléfono: 237300

• CENTRO AGRONÓMICO MAYRA

San Jerónimo de Cusco - Teléfonos: 277845 - 277286

• COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"

Av. De la Cultura N° 721
"Ciudad Universitaria" - Teléfono: 237192

EL QUE SUSCRIBE, PROFESOR INVESTIGADOR ASOCIADO AL
HERBARIO VARGAS (CUZ).

CERTIFICA:

Que el Señor, **Grégory Moisés Rodas Tantalla**, Bachiller en Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (UNAMBA), ha solicitado a la Dirección del Herbario (CUZ), la determinación taxonómica de una muestra vegetal herborizada, la que al ser diagnosticada utilizando bibliografía especializada y muestras del Herbario, corresponde a la especie *Clinopodium brevicalyx*, cuya posición taxonómica de acuerdo al Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group, APG III (2009), es la siguiente:

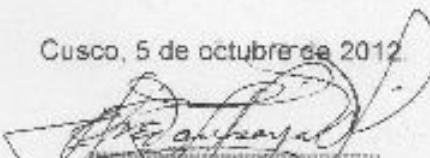
División : Magnoliophyta (= Angiospermas)
Clase : Magnoliopsida = Tricolpados (Eudicotilifoneas)
Subclase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : *Clinopodium*
Especie : *Clinopodium brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda

Sinonimia : *Satureja brevicalyx* Epling

Nombres comunes : "cjuñuca", "cjuñu muña", "ñut'u rap'i muña", "puna muña".

Se expide la presente certificación, para fines de investigación que requiere el recurrente.

Cusco, 5 de octubre de 2012


Dr. Alfredo Tapachi Ferrera
Prof. Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ)

ANEXO 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRÁFIA – Pabellón de Control de Calidad -1er piso
 Av. de la Cultura 733 CUSCO –PERÚ Contacto 984437369-99692779 / 973868855

CONSTANCIA

Los que suscriben, Responsables del Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, dejan Constancia:

Que el Bach. GREGORY MOISES RODAS TANTALLA de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ingeniería - UNAMBA ha presentado al Laboratorio de Cromatografía de Gases una muestra de aceite esencial de muña "*Clinopodium brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda" para la caracterización e identificación de componentes, resultados que forman parte de la tesis intitulo: Actividad Antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de muña "*Clinopodium brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda" frente a *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Vibrio cholerae*. Dicha muestra ha sido caracterizada utilizando el Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N- acoplado a un Espectrómetro de Masas. La identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de cada componente con los datos compilados en las librerías NIST05a.L y Flavor2.L.

Del análisis efectuado se reportan 20 componentes mayoritarios para los cuales se indican los tiempos de retención, abundancia y el nivel de coincidencia.

Resumen de los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial de muña según las librerías NIST05a.L y Flavor2.L.

	Tiempo de Retención min	Contenido Relativo %	Compuesto	Qual
1	5.127	0.18	Alpha-pinene	81
2	6.155	0.21	Sabinene	93
3	7.681	1.90	p-cymene	97
4	7.817	0.40	Limonene	97
5	7.972	1.88	Eucalyptol	99
6	8.848	0.59	Gamma-terpinene	94
7	10.371	4.28	Linalol	53
8	12.540	0.58	a. Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (2R-cis)- b. Menthone	96

ANEXO 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA - Pabellón de Control de Calidad - 1er piso
 Av. de la Cultura 733 CUSCO - PERÚ Contacto 984437309-990692770 / 973868855

9	12.967	10.57	a. Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (2S-trans)- b. Menthone	98
10	13.458	3.38	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, trans-	83
11	14.096	0.76	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4- trimethyl-	91
12	16.215	55.78	Pulegone	98
13	18.549	6.71	Thymol	95
14	18.955	0.31	a. 3-Methyl-4-isopropylphenol b. p-thymol	87
15	20.617	0.51	2,4-Cycloheptadien-1-one, 2,6,6-trimethyl-	90
16	20.993	1.53	Terpinyl acetate	91
17	23.970	3.15	Beta-caryophyllene	99
18	27.239	3.13	Bicyclogermacrene	91
19	27.962	0.41	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-[1- methylethyl]-, [s-(E,E)]-	93
20	28.364	1.44	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7- dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)]-	94
21		2.5	Otros no identificados	

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 03 de Octubre del 2012.

Qco. Jorge Choquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía -
 UNSAAC.

Mgl. Nancy Accostupa Quispe
 Analista del Laboratorio de Cromatografía -
 UNSAAC.

ANEXO 3

Instrument: UNSAAC
 Sample Name: MUÑA-G
 Misc Info: Aceite Esencial de muña Vial
 Number: 1

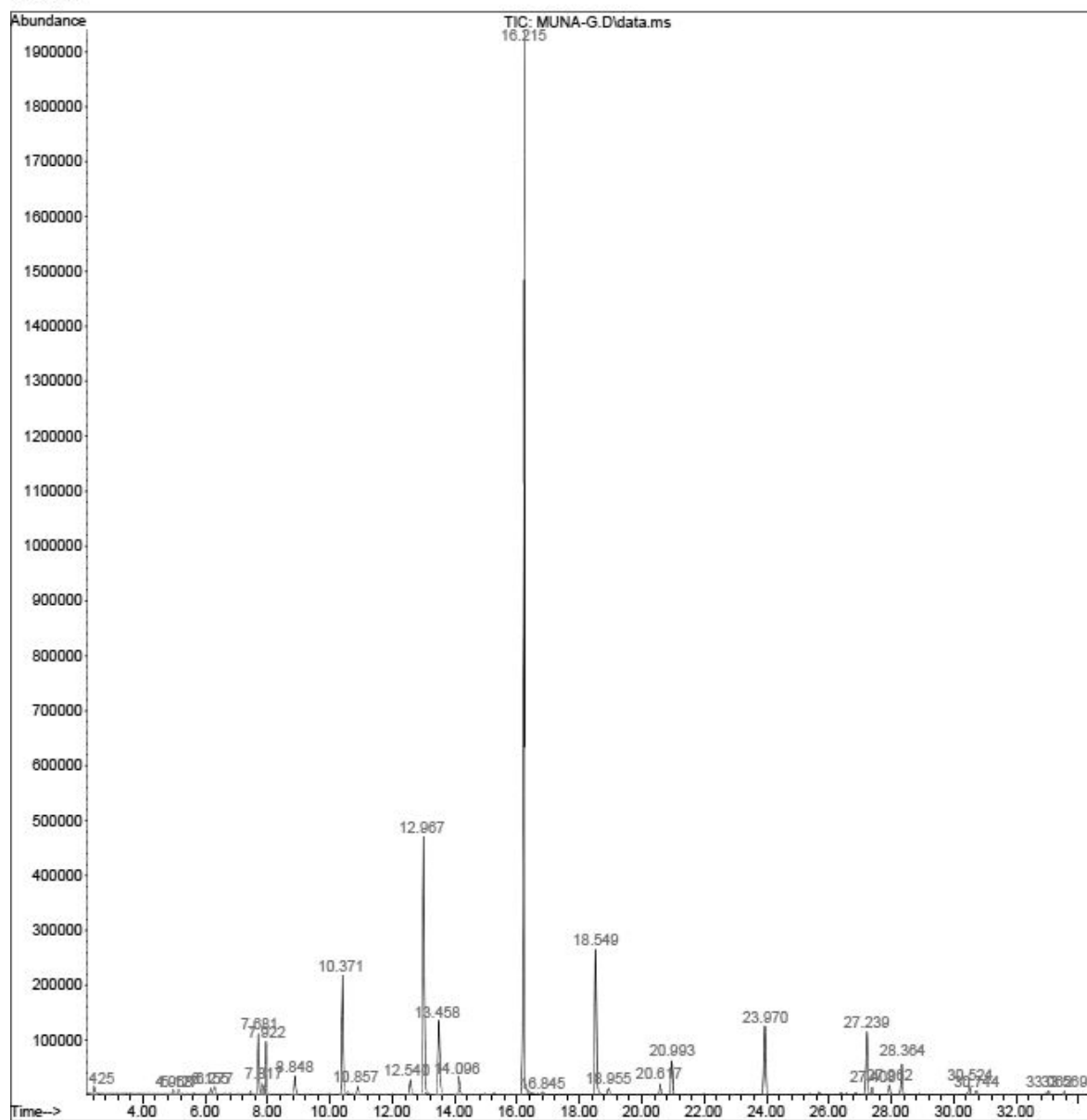




Figura 16. Cromatograma de los componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* ilustrados en la Tabla 5 del presente estudio.

ANEXO 4

 **GOBIERNO REGIONAL DE APURIMAC**
DIRECCION REGIONAL DE SALUD DE APURIMAC
LABORATORIO REFERENCIAL EN SALUD PÚBLICA
"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"




CONSTANCIA

Se deja constancia que el señor GREGORY MOISES RODAS TANTALLA, Bachiller en Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ha realizado pruebas de cultivo y ensayos susceptibilidad microbiológica in vitro, como parte del estudio de investigación titulado **"EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Satureja brevicalyx* ("muña") FRENTE A *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*"**, durante los meses de abril a setiembre del año 2014, dichas actividades se realizaron en el área de Enteropatógenos del Laboratorio Referencial en Salud Pública - DIRESA Apurímac.

Se expide la presente constancia al interesado para fines que estime pertinente

Atentamente,


Hija Susy Arregui Azuela
D.P. 6726
DIRECTORA

Abancay, 17 de abril del 2018

ANEXO 5

RESULTADOS DE LECTURAS ESPECTROFOTOMETRICAS DE LAS PLACAS DE MICRODILUCIÓN

ABSORBANCE MODE 8 PAGE 1 05/04/09 17:58:00
 LOT NUMBER: _____ EXP. DATE: _____ ANALYST: _____
 WAVELENGTHS-492NM 630NM

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1- 1	0.074	0.077	0.078	0.078	0.075	0.078	0.077	0.074	(700)
1- 2	0.078	0.076	0.077	0.079	0.075	0.080	0.081	0.078	800
1- 3	0.088	0.078	0.076	0.080	0.080	0.081	0.079	0.078	400
1- 4	0.070	0.074	0.077	0.076	0.074	0.078	0.079	0.088	200
1- 5	0.075	0.078	0.077	0.080	0.080	0.080	0.079	0.074	90
1- 6	0.071	0.070	0.075	0.075	0.082	0.070	0.077	0.075	50
1- 7	0.073	0.074	0.078	0.077	0.082	0.088	0.083	0.074	25
1- 8	0.072	0.078	0.078	0.079	0.077	0.085	0.078	0.077	15
1- 9	0.080	0.084	0.085	0.090	0.081	0.084	0.082	0.076	6.25
1-10	0.083	0.085	0.082	0.084	0.085	0.087	0.087	0.085	3.12
1-11	0.274	0.280	0.292	0.309	0.325	0.318	0.301	0.184	0.625
1-12	0.081	0.106	0.107	0.105	0.089	0.103	0.099	0.028	(-)

Escherichia coli ATCC 25922
 TEST ENDED

Hemarsader :K (85) 05/04/09 17:54:36
 ABSORBANCE MODE 8 PAGE 1 05/04/09 17:55:00
 LOT NUMBER: _____ EXP. DATE: _____ ANALYST: _____
 WAVELENGTHS-492NM 630NM

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1- 1	0.073	0.077	0.078	0.074	0.075	0.077	0.079	0.077	8
1- 2	0.073	0.078	0.077	0.078	0.081	0.079	0.081	0.076	8
1- 3	0.071	0.077	0.082	0.076	0.087	0.083	0.082	0.077	8
1- 4	0.088	0.073	0.077	0.079	0.081	0.080	0.089	0.074	8
1- 5	0.075	0.078	0.080	0.080	0.084	0.083	0.083	0.073	8
1- 6	0.078	0.080	0.079	0.081	0.083	0.083	0.074	0.083	8
1- 7	0.088	0.078	0.083	0.083	0.085	0.088	0.083	0.084	8
1- 8	0.080	0.082	0.081	0.084	0.086	0.087	0.078	0.083	8
1- 9	0.077	0.090	0.092	0.092	0.095	0.091	0.090	0.081	8
1-10	0.078	0.086	0.088	0.087	0.089	0.089	0.087	0.083	3.12
1-11	0.182	0.215	0.212	0.212	0.207	0.204	0.202	0.206	0.625
1-12	0.136	0.200	0.227	0.228	0.231	0.228	0.216	0.258	(-)

S. typhi S. dysenteriae
 TEST ENDED

ANEXO 6
PANEL FOTOGRÁFICO



Figura 17. *Satureja brevicalyx* (Epling) Harley & A. Granda, Curahuasi, Abancay - Apurimac (3,910 msnm)



Figura 18. Recolección de arbustos de *Satureja brevicalyx* en el sector de Tracapata, comunidad Luis de la Puente Uceda, Curahuasi, Abancay – Apurimac (3,910 msnm).



Figura 19. Destilación del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* mediante arrastre por vapor de agua. Laboratorio de la DIREPRO – Apurímac.

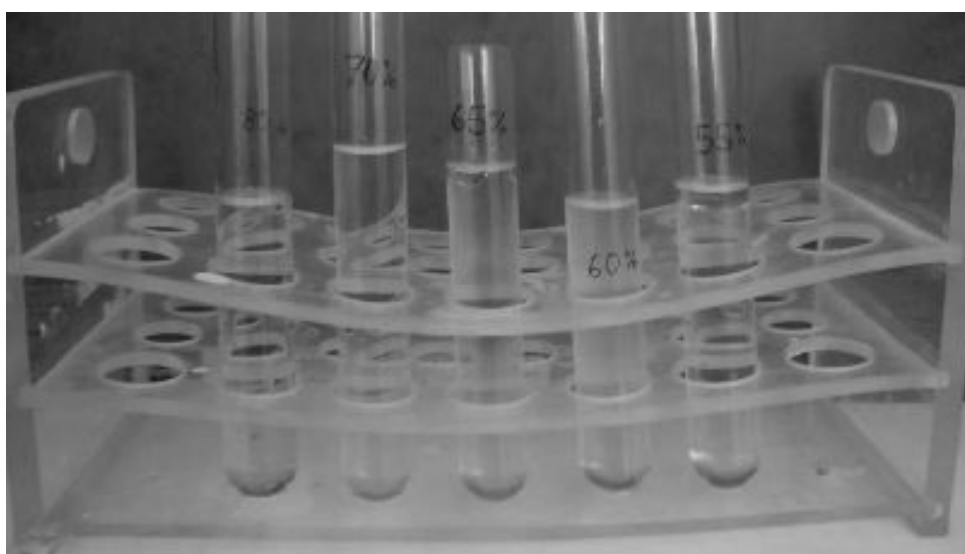


Figura 20. Resultados de solubilidad del aceite esencial de *S. brevicalyx* al 80% (v/v). Laboratorio de Química de la E.A.P.I.A. UNAMBA – Abancay.



Figura 21. Determinación del índice de refracción del aceite esencial de *S. brevicalyx* mediante refractómetro digital. Lab. Química de la UNSAAC – Cusco.

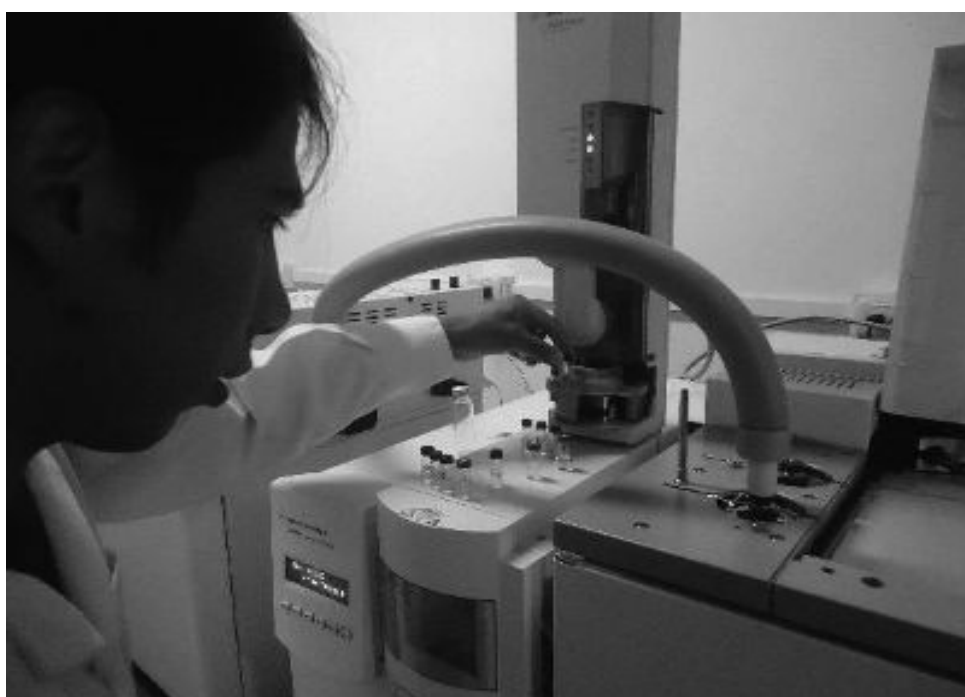


Figura 22. Ingreso de muestras del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* al cromatografo de gases acoplado a un espectrometro de masas para el analisis de sus componentes químicos. Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC – Cusco.



Figura 23. Analizando los componentes químicos del aceite esencial de *S. brevicalyx* mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas. Laboratorio de Cromatografía de la UNSAAC – Cusco.

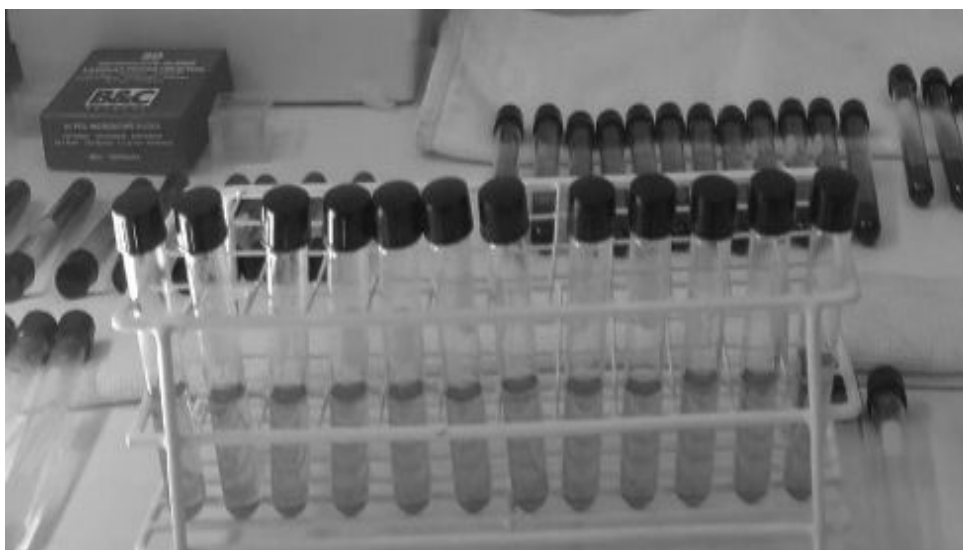


Figura 24. Diluciones dobles de Caldo Mueller Hinton para ensayos de dilución en microplacas. Lab. Referencial de Salud Pública de la DIRESA – Apurímac.

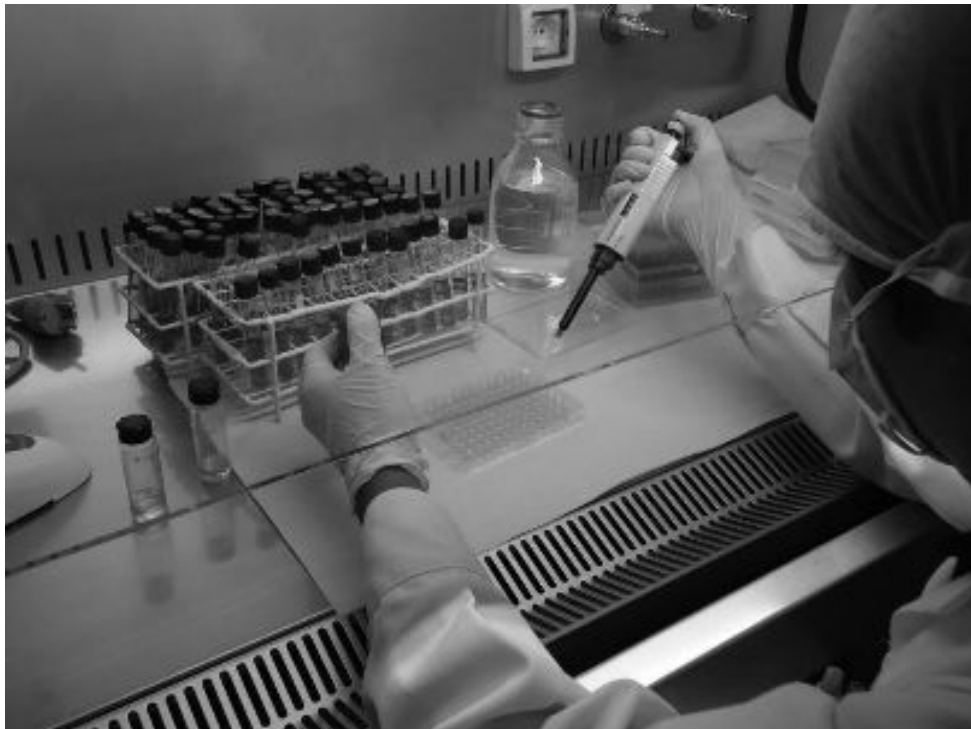


Figura 25. Adición de Caldo Mueller Hinton a cada pocillo de la microplaca para la prueba antibacteriana por el método de microdilución. Lab. Referencial de Salud Pública de la DIRESA – Apurímac.



Figura 26. Adición de inoculos bacterianos para poner a prueba el efecto de las concentraciones del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. Lab. Referencial de Salud Pública de la DIRESA – Apurímac.



Figura 27. Placas de microdilución ensayadas ingresando a incubador para poner a prueba el efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. brevicalyx*. Lab. Referencial de Salud Pública de la DIRESA – Apurimac.



Figura 28. Lectura de placas de microdilución mediante lector ELISA. Laboratorio del Banco de Sangre del Hospital Guillermo Díaz de la Vega, Abancay - Apurimac.

ANEXO 7

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABS	30	0.14	0.08	4.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.0E-05	2	3.5E-05	2.27	0.1226
Bacterias	7.0E-05	2	3.5E-05	2.27	0.1226
Error	4.2E-04	27	1.6E-05		
Total	4.9E-04	29			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00437
 Error: 0.0000 gl: 27

Bacterias	Medias	n	F.E.
E. coli ATCC	0.08	10	1.2E-03 A
Shigella spp	0.08	10	1.2E-03 A
S. typhi	0.08	10	1.2E-03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 29. Analisis de varianza del Diseño de Bloques Completos.

Nueva Tabla : 20/04/2018 - 03:04:16 p.m. - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABS	40	0.48	0.39	4.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.6E-04	9	4.0E-05	3.14	0.0088
Conc. del ac esenc. (ug/mL..	3.6E-04	9	4.0E-05	3.14	0.0088
Error	3.8E-04	30	1.3E-05		
Total	7.4E-04	39			

Test:Duncan Alfa=0.05
 Error: 0.0000 gl: 30

Conc. del ac esenc. (ug/mL..	Medias	n	F.E.
200.00	0.08	4	1.8E-03 A
1600.00	0.08	4	1.8E-03 A
50.00	0.08	4	1.8E-03 A B
800.00	0.08	4	1.8E-03 A B
100.00	0.08	4	1.8E-03 A B
400.00	0.08	4	1.8E-03 A B
12.50	0.08	4	1.8E-03 A B
6.25	0.08	4	1.8E-03 A B C
25.00	0.08	4	1.8E-03 B C
3.12	0.09	4	1.8E-03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 30. Analisis de varianza de las absorbancias con respecto a los bloques (03 cepas).

Nueva tabla : 20/04/2018 04:19:42 p.m. [Versión : 01/11/201

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABS	40	0.53	0.39	5.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		6.5E-04	9	7.2E-05	3.82	0.0026
Conc. del ac esenc. (ug/mL..		6.5E-04	9	7.2E-05	3.82	0.0026
Error		5.7E-04	30	1.9E-05		
Total		1.2E-03	39			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0000 gl: 30

Conc. del ac esenc. (ug/mL..	Medias	n	E.E.				
200.00	0.07	4	2.2E-03	A			
1600.00	0.08	4	2.2E-03	A	B		
400.00	0.08	4	2.2E-03	A	B		
800.00	0.08	4	2.2E-03	A	B		
25.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C	
100.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C	
50.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C	
12.50	0.08	4	2.2E-03		B	C	D
3.12	0.08	4	2.2E-03			C	D
6.25	0.09	4	2.2E-03				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 31. Analisis de varianza de las absorbancias con respecto a las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nueva tabla : 20/04/2018 - 11:10:43 p.m. - [Versión : 01/11/201

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABS	40	0.64	0.53	4.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		6.2E-04	9	6.9E-05	5.84	0.0001
Conc. del ac esenc. (ug/mL..		6.2E-04	9	6.9E-05	5.84	0.0001
Error		3.5E-04	30	1.2E-05		
Total		9.7E-04	39			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0000 gl: 30

Conc. del ac esenc. (ug/mL..	Medias	n	E.E.				
1600.00	0.08	4	1.7E-03	A			
200.00	0.08	4	1.7E-03	A	B		
800.00	0.08	4	1.7E-03	A	B		
100.00	0.08	4	1.7E-03	A	B	C	
50.00	0.08	4	1.7E-03	A	B	C	
400.00	0.08	4	1.7E-03	A	B	C	D
12.50	0.08	4	1.7E-03		B	C	D
25.00	0.09	4	1.7E-03			C	D
3.12	0.09	4	1.7E-03				D
6.25	0.09	4	1.7E-03				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 32. Analisis de varianza de absorbancias con respecto a las cepas de *Salmonella typhi*.

Nueva tabla : 20/04/2018 - 11:18:14 p.m. - [Versión : 01/11/2014

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABS	40	0.53	0.39	5.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6.5E-04	9	7.2E-05	3.82	0.0026
Conc. del ac esenc. (ug/mL..	6.5E-04	9	7.2E-05	3.82	0.0026
Error	5.7E-04	30	1.9E-05		
Total	1.2E-03	39			

Test:Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0000 gl: 30

Conc. del ac esenc. (ug/mL..	Medias	n	E.E.			
200.00	0.07	4	2.2E-03	A		
1600.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	
400.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	
800.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	
25.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C
100.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C
50.00	0.08	4	2.2E-03	A	B	C
12.50	0.08	4	2.2E-03		B	C D
3.12	0.08	4	2.2E-03			C D
6.25	0.09	4	2.2E-03			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 33. Analisis de varianza de absorbancias con respecto a las cepas de *Shigella dysenteriae*.