



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE ACEITE ESENCIAL

DE *Satureja boliviana* BENTH (MUÑA) SECO Y FRESCO FRENTE

A *Escherichia coli* ATCC 25922. PUNO 2019.

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. CHANG MAMANI TICONA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

Las líneas textuales que dan forma a los párrafos que materializan el presente, va dedicado las personas que hicieron posible, andar a través de la meta que esto implica, a mis hermanos Chein, Jonás y Juana, a mi padre Sergio, a la persona lejana en el tiempo pero cercana en el hoy latente de mi conciencia, mi madre, Mercedes.

Chang Mamani Ticona



AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a nuestro creador Dios todo poderoso que es poseedor de toda sabiduría, por atender mis plegarias que me hicieron resiliente y por iluminar mi camino para avanzar en esta meta trazada como parte de mi formación profesional.

A, mi siempre Alma Mater, Universidad Nacional del Altiplano, que abriga las aulas del saber de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde fortalecí mi formación personal y me dieron el conocimiento para desarrollar mi profesión.

A cada uno de los docentes de la Escuela Profesional de Biología, en especial del Area de Microbiología y Laboratorio Clínico, a los docentes de las diferentes facultades que conocí desde los primeros días en los claustros del saber.

Al Dr. Sc. Juan José Pauro Roque Director de la unidad de investigación, por su apoyo a la realización de la presente tesis y por su aporte a mi formación profesional.

Mi especial gratitud, director de tesis, Dra. Vicky Cristina Gonzales Alcos, por su comprensión, conocimientos, apoyo, consejos y enseñanzas a su vez exigencia que hicieron posible la sustentación de la presente tesis.

A los integrantes del jurado calificador, Presidente Dra. Youri Teresa Del Carpio Condori, Primer miembro Mg. Dante Mamani Sairitupac, Segundo miembro Mg. Diana Elizabeth Cavero Zegarra. por sus correcciones y aprobación de la presente de tesis.

A la Lic. Yrma Ruelas Ortega por su haberme brindado apoyo y orientación en la parte administrativa que hizo posible la realización del presente.

A los responsables de la implementación y permanencia de la Plataforma Pilar, que se ha convertido en una importante herramienta, que de seguro muchísimos más están agradecidos.

A todas las amistades y compañeros por su apoyo anímico y aliciente.

¡Muchísimas gracias!



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 9

ABSTRACT..... 10

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL 12

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 12

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES..... 13

2.2. MARCO TEÓRICO 18

2.2.1. Descripción de la muña (*Satureja boliviana* Benth.) 18

2.2.2. Descripción de la bacteria *Escherichia coli*..... 27

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO 32

3.2. TIPO DE ESTUDIO..... 32

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA 32

3.4. METODOLOGÍA..... 33



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE PLANTA FRESCA Y SECA DE <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) FRENTE A <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	41
4.2. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR RESPUESTA ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DE LOS TRATAMIENTOS CON ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDA DE PLANTAS FRESCAS Y SECAS DE <i>Satureja boliviana</i> Benth (MUÑA) A VOLÚMENES DE 10, 15 y 20 µl FRENTE A <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	44
V. CONCLUSIONES	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	56

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de Julio del 2022

ÁREA: Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Diagnóstico y Epidemiología



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) en proceso de secado natural en sombra...	35
Figura 2. Activación de la cepa comercial certificada <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y desarrollo en medio agar sangre.	37
Figura 3. Agar Mueller Hinton inoculado con <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y discos impregnados con aceite esencial extraídos de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) fresca y seca.	39
Figura 4. Medias estimadas del tamaño de los halos del efecto antibacteriano in vitro de aceites esenciales de planta fresca y seca de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. ANOVA del diseño factorial.	46
Figura 5. Equipo de extracción de aceites esenciales tipo Clevenger. Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios FIQ-UNA-PUNO, Agosto 2021.	57
Figura 6. Pesado de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) para el proceso de destilación. Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios FIQ-UNA-PUNO, Agosto 2021.	57
Figura 7. Desarrollo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en Agar Sangre y Agar McConkey, Noviembre 2021.....	58
Figura 8. Efecto antibacteriano a dosis de 10 µl frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, Noviembre 2021.	58
Figura 9. Efecto antibacteriano a dosis de 10 µl frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, Diciembre 2021.....	58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de terpenoides obtenidos a partir de aceite esencial extraído por Arrastre de vapor de agua de la planta <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) procedente del distrito de Ayaviri del departamento de Puno.....	19
Tabla 2. Porcentaje de los principales componentes de los aceites esenciales determinado por análisis de cromatografía de gases y espectroscopia de masas, de la planta de la familia Lamiaceae <i>Satureja boliviana</i> Benth, colectadas de la Provincia de Manco Kápac (3860 msnm), Departamento de La Paz, Bolivia.	20
Tabla 3. Cantidad de aceites esenciales obtenidos de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) por el método de arrastre a vapor de agua.	41
Tabla 4. Respuestas antibacterianas in vitro de aceites esenciales extraídos de planta fresca y seca de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	42
Tabla 5. Comparación de medias de los tamaños de halo de inhibición de la respuesta antibacteriana de aceites esenciales de planta fresca y seca de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, a diferentes volúmenes o dosis.....	44
Tabla 6. Comparación de la respuesta antibacteriana in vitro de aceites esenciales extraídos de planta fresca y seca de <i>Satureja boliviana</i> Benth (muña) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, según el ANOVA factorial.	59



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ATCC	: American Type Culture Collection
CMI	: Concentración mínima inhibitoria
EDA	: Enfermedad diarreica aguda
<i>et al.</i>	: y colaboradores
GC-MS	: gases-espectrometría de masas
g	: gramo
HIBC	: halo de inhibición de crecimiento bacteriano
kg	: kilogramo
mg	: miligramo
ml	: mililitro
OMS	: Organización mundial de la salud
UFC	: Unidad formadora de colonia
µl	: microlitro



RESUMEN

La muña es una planta aromática distribuida ampliamente en la región de Puno y utilizada empíricamente por sus propiedades medicinales, con la finalidad de contribuir al estudio de aceites esenciales de la muña y a la vez revalorarla, se planteó el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de muña seca y fresca de *Satureja boliviana* Benth frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Se ha extraído los aceites esenciales de la muña seca y fresca utilizando el método de hidrodestilación o arrastre por vapor de agua en equipo Clevenger, y para evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* se enfrentó los dos tipos de aceites esenciales a dosis de 10 μ l, 15 μ l y 20 μ l sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando el método de difusión en placa según Kirby – Bauer en agar sólido Mueller Hinton, los datos obtenidos fueron analizados según el diseño experimental factorial 2x3 utilizando el software SPSS. Como respuesta al primer objetivo específico, se encontró en promedio un efecto antibacteriano con un halo de 11.8 mm para el aceite de muña fresca y 11.7 mm para el aceite de muña seca, el análisis estadístico no demostró diferencia significativa ($p > 0.05$) para un $\alpha = 0.05$ a pesar de que se ha obtenido aceite esencial de la muña fresca con un rendimiento de 0.82 % comparado con el 0.60 % de la muña seca y como respuesta al segundo objetivo, los promedios de los halos para los dos tipos de aceites esenciales a dosis de 10, 15 y 20 μ l fue de 10.8, 11.9 y 13.0 mm respectivamente para el aceite de muña fresca y 10.1, 12.5, y 13.5 mm para el aceite de muña seca, las medias de los halos para los aceites de muña fresca y seca fue 10.45, 11.85 y 12.95 mm y de acuerdo al análisis estadístico se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$), sin embargo no se encontró interacción entre los factores tipos de aceite y dosis, se concluye que, los aceites esenciales extraídos de muña fresca y seca frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 tienen el mismo efecto antibacteriano por lo que la respuesta a los tratamientos para el factor A: aceites esenciales, son iguales; respecto al factor B: dosis, el mejor efecto antibacteriano fue a dosis de 20 μ l de aceite esencial con un halo de 12.95 mm y no se evidencia interacción entre los factores aceite esencial y volúmenes o dosis.

Palabras clave : Muña, aceite esencial, efecto antibacteriano, *Escherichia coli*.



ABSTRACT

The muña is an aromatic plant widely distributed in the Puno region and used empirically for its medicinal properties, in order to contribute to the study of essential oils of the muña and at the same time revalue it, the objective was to evaluate the antibacterial effect in vitro of the essential oils of dry and fresh muña of *Satureja boliviana* Benth against *Escherichia coli* ATCC 25922. The essential oils of the dry and fresh muña have been extracted using the method of hydrodistillation or steam dragging in Clevenger equipment, and to evaluate the in vitro antibacterial effect was compared to the two types of essential oils at doses of 10 μ l, 15 μ l and 20 μ l on *Escherichia coli* ATCC 25922 using the Kirby-Bauer plate diffusion method on solid Mueller Hinton agar, the data obtained were analyzed according to the 2x3 factorial experimental design using SPSS software. In response to the first specific objective, an antibacterial effect was found on average with a halo of 11.8 mm for fresh muña oil and 11.7 mm for dry muña oil. Statistical analysis did not show a significant difference ($p > 0.05$) for a $\alpha = 0.05$ despite the fact that essential oil has been obtained from fresh muña with a yield of 0.82% compared to 0.60% from dry muña and in response to the second objective, the averages of the halos for the two types of essential oils at doses of 10, 15 and 20 μ l it was 10.8, 11.9 and 13.0 mm respectively for fresh muña oil and 10.1, 12.5 and 13.5 mm for dry muña oil, the means of the halos for fresh muña oil and dry was 10.45, 11.85 and 12.95 mm and according to the statistical analysis a significant difference was found ($p < 0.05$), however no interaction was found between the factors types of oil and dose, it is concluded that the essential oils extracted from muña fresh and dry fren *Escherichia coli* ATCC 25922 have the same antibacterial effect, so the response to treatments for factor A: essential oils, are the same; Regarding factor B: dose, the best antibacterial effect was at a dose of 20 μ l of essential oil with a halo of 12.95 mm and there is no evidence of interaction between the essential oil factors and volumes or doses.

Keywords: Muña, essential oil, antibacterial effect, *Escherichia coli*.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La extracción de aceites esenciales a partir de plantas secas conlleva a la obtención de poca cantidad de aceite, comparando con la extracción de aceite de plantas frescas, esto podría tener una marcada influencia en los resultados de todo los estudios que se encargan de la búsqueda de nuevos principios activos de origen natural, por otro lado, es de conocimiento que la bacteria *Escherichia coli* es común ocasionando afecciones gastrointestinales, y que los tratamientos habituales que se han vuelto ineficaces en cepas de bacterias resistentes que van apareciendo cada vez más y que éstos pueden transmitirse a otras personas. Una falta de respuesta eficaz a los tratamientos habituales debe condicionar a que se realice búsquedas de compuestos antibacterianos de origen natural (OMS, 2011).

La región altiplánica del departamento de Puno que se encuentra a más de 3800 msnm, cuenta con una amplia distribución de plantas medicinales nativas que crecen de manera natural, dentro de ellas, *Satureja boliviana* Benth (muña), esta especie se encuentra distribuida en abundancia en la comunidad de Gilahuancasayani de la provincia de Azángaro, los pobladores de estas zonas rurales recurren a la medicina tradicional para tratar las enfermedades diarreicas agudas, dolores estomacales y como prevención la utilizan para preparar sus alimentos además beben sus mates evitándose así una afección gastrointestinal, ello explicaría un posible efecto antibacteriano por parte de la muña. Diversas investigaciones han permitido conocer la existencia de actividad antibacteriana de los aceites esenciales, siendo el producto final los metabolitos secundarios presentes en sus aceites esenciales, y se conoce que, “los aceites esenciales existen en la naturaleza



como complejos moleculares sinérgicos, donde, la complejidad de la química vegetal garantiza la imposibilidad de que los patógenos la decodifiquen” (Romero, 2004).

La investigación contribuye científicamente a la validación y desarrollo de la medicina complementaria en su proceso de implementación en hospitales de la región como parte de su rutina terapéutica, así mismo, a la búsqueda de principios activos antibacterianos valorando la propiedad terapéutica de *Satureja boliviana* Benth, muña, como recurso natural de nuestra región de Puno, además, se aclara el supuesto de que el aceite extraído de planta fresca, por su mayor volumen extraído y posiblemente por ser más completa en cuanto a sus principios activos, podría brindar un mejor efecto antibacteriano, lo que será de gran utilidad y base para investigaciones futuras, por lo cual para efectos de la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Satureja boliviana* Benth (muña) seco y fresco extraído por hidrodestilación frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la respuesta antibacteriana *in vitro* del aceite esencial extraído de planta fresca y del aceite esencial extraído de planta seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Determinar la mejor respuesta antibacteriana *in vitro* de los tratamientos con aceite esencial extraída de plantas frescas y de plantas secas de *Satureja boliviana* Benth (muña) a volúmenes de 10, 15 y 20 μ l frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Primo (2001), determinó la actividad antibacteriana de aceite esencial de *Mintostachis verticillata* Griseb, según la técnica de dilución en caldo afirma haber encontrado sensibilidad a 5 mg/ml sobre gram positivos y 10 mg/ml sobre gram negativos y que por cromatografía de gases logró identificar pulegona 44.56% y mentona 39.51% sugiriendo la actividad antibacteriana a la presencia de pulegona. También Bezic *et al.* (2005), mencionan haber determinado la composición fitoquímica por cromatografía de gases y espectrometría de masas, del aceite de *Satureja cuneifolia* y *Satureja montana* siendo sesquiterpenos como cimeneno, borneol, terpineno, timol y carvacrol mínimamente y como monoterpenos limoneno y pineno, además menciona que la actividad antibacteriana según la técnica de Kirby – Bauer fue a 10 µl formando un halo de 23 mm y a 20 µl de aceite un halo de 32 mm, y agrega que para *S. montana* con 10µl formó un halo de 7 mm y con 2 µl un halo de 11 mm, enfrentados a *Escherichia coli*.

Carbajal (2005), reporta que, al ser enfrentado aceites esenciales de muña, *Satureja boliviana* y de la pata muña, *Hedeoma mandoniana* contra *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) obtuvo una CMI a 6.55 mg/ml a 7µl y una CMI de 8.46 mg/ml a 9µl de manera respectiva y afirma que la concentración mínima bactericida fue coincidente a la concentración mínima inhibitoria para los aceites esenciales de ambas plantas.

Zapata *et al.*, (2009), indica que las actividades antifúngicas de plantas de la familia *Labiatae* enfrentadas a *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. crusei* ATCC



6258, *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305, demostraron CMI entre 250 – 375 µg/ml con aceite esencial de muña, *Minthostachys mollis*, siendo la planta con mejor actividad, también menciona que los principales componentes de los aceites esenciales de *M. mollis* y *H. mutabilis* fueron epóxido de cis-piperitona y cineol. Por otro lado, Quispe y Mamani (2016) al determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* Griseb (muña) sobre *Cándida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* utilizando discos impregnados con diluciones de aceite en etanol a 100, 75, 50, y 25 % según el método de difusión Kirby – Bauer indican que la mejor actividad inhibitoria sobre *C. albicans*, *Enterococcus faecalis*, y *Staphylococcus aureus* se atribuye al aceite esencial de *Minthostachys Mollis* Griseb. Contrariamente a los efectos antibacterianos de aceites esenciales, Calsin (2017), indica que *C. albicans* fue resistente frente a *Equisetum arvense*, cola de caballo, incluso a una dosis de 50 µl de aceite esencial.

Zuni (2017), demostró al aplicar el método de dilución de aceite esencial en placa para *Menta piperita*, sobre *Escherichia coli* enteropatógena, una CMI de 2.5%, *in vitro*, y comparando con tetraciclina la actividad con 30 µl fue de 54.2 % al utilizar el método de Kirby - Bauer. Además, Calsin (2017), menciona que, la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 bajo el extracto etanólico y aceite esencial de *Equisetum arvense*, cola de caballo, a dosis, 35 – 50 µl, superaron al control gentamicina, hasta un 57 y 27 % de manera respectiva. Sin embargo, Aquino (2017), determinó según el método de difusión en agar, utilizando aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. halló una mayor actividad sobre *Escherichia coli* con un porcentaje de inhibición de 20 µl y que incluso duplica por encima a la actividad inhibitoria del control positivo y mientras que *Caiophora cirsiifolia* no evidenció actividad alguna.



Baca (2017), indica que utilizando el método de difusión en agar, determinó sensibilidad antibacteriana aplicando concentraciones diluidas de aceite esencial de *Senecio sp* en etanol de 96°, y aduce que, la CMI para *Proteus vulgaris* está por encima de 50% de dilución lo que le corresponde un halo de 11.9 mm, para *Proteus mirabilis* a 75% un halo de 7.37 mm, para *Proteus rettgeri* con 75% un halo de 7.0 mm, para *Proteus morgani* con 75% un halo de 6.9 mm. Por otro lado, Mamani (2017), al determinar efecto inhibitorio de extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio spp*, chachacoma, utilizando el método de difusión de Kirby – Bauer, halló efecto inhibitorio del extracto de hojas sobre *Staphylococcus aureus*, como el más óptimo, y que no se encontró efecto en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp*.

Quispe y Mamani (2016), evaluaron el efecto de inhibición *in vitro* de aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb, muña, por el método de Kirby – Bauer, sobre cepas de origen endodóntico periapicales, dónde determinó que existe una gran actividad de inhibición sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans* incluso los efectos inhibitorios fueron mayores a lo presentado por paramonoclorofenol alcanforado. Por otro lado, Espinoza (2018), reporta el efecto inhibitorio de hojas de *Minthostachys mollis*, muña, sobre *Escherichia coli*, aplicando el mismo método del autor anterior, e indica que, a diluciones seriadas de 100, 75, 50 y 25% de aceite, se evidenció baja inhibición sin llegar a superar el tamaño de halo inhibitorio que considera sensible al antibiótico ciprofloxacino, que es 21 mm.

Coronado y Cauna (2017), reportan que la actividad antibacteriana *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *Plantago major*, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 entre otras como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC15442



se presentó en concentraciones de 1, 2.5 y 5 %, e indica una CMI de 0.5mg/ml y CMB de 0.5 mg/ml y que *Rumex crispus* ha tenido actividad antibacteriana a 0.2, 0.5, 1, 2.5, y 5% de concentraciones, indicando que la CMI determinada fue de 0.1 mg/ml, y la CMB de 0.2mg/ml. Por otro lado, Chura (2017), evaluó efecto antibacteriano de las decocciones de tarwi, *Lupinus mutabilis* Swwet, aplicando el método de Kirby – Bauer donde las concentraciones de 50 y 100 % de decocciones de hojas y semillas fueron las que alcanzaron efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Salas (2016), determinó el efecto antimicótico de aceite esencial de *Minthostachis mollis*, muña, en *Candida albicans* aisladas de muestras de pacientes con diagnóstico de tuberculosis obteniendo una media de halo de inhibición óptima de 29.2 mm a una concentración de 1ml/250µl. Así mismo, Quispe (2018), quien al determinar la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium sp.* frente al aceite esencial de *Mintosthachis mollis*, muña, y comparando con carbendazim, indica, que la susceptibilidad antimicótica a concentración de 100% alcanzó 25.1 mm de halo de inhibición, siendo el mejor efecto, pero inferior comparando con el halo alcanzado por el antimicótico carbendazim. De manera similar, Villafuerte (2017), reporta actividades antimicrobianas de *Tagetes multiflora* Kunth, al aplicar extractos etanólicos y acuosos, indicando la formación de halos de inhibición de 11.33 mm frente a *Escherichia coli*, 13 mm para *Pseudomona aeruginosa* y 15.6 mm para *Staphylococcus aureus*, a su vez menciona haber determinado una CL de 35.56 ug/ml para el extracto etanólico y una CL de 386.04 para el extracto acuoso.

Orbegozo y Rodríguez (2018), determinaron las características farmacognósticas y rendimiento de aceite esencial de hojas de *Minthostachis mollis*, muña, y llegaron a



identificar lactonas, triterpenos, taninos, compuestos fenólicos, flavonoides y aminoácidos además indican que el obtuvieron un rendimiento de 0.6% +- 0.15 de aceite esencial usando el equipo de destilación por arrastre de vapor Clevenger. De manera similar, Castro (2012), determinó cantidades porcentuales de los componentes de aceites esenciales extraídas de hojas frescas y secas de muña utilizando el método de destilación por arrastre de vapor de agua a 84 °C durante 90 minutos, cuya cuantificación por cromatografía de gases arrojaron un 30.168 % de pulegona y un 45.036 % de mentona en aceite esencial de hojas frescas y 52.321 % de pulegona y 24.808 % de mentona en aceite de hojas secas, notándose el aumento de pulegona y disminución de mentona en el aceite de hojas secas.

Urrunaga y Acurio (1995), afirman que, el rendimiento de aceite esencial de *Satureja boliviana* es de 1.03 % considerándose apreciable tal porcentaje, aún si es comparado con otras especies aromáticas que crecen en el altiplano puneño por ejemplo orégano, menta, hierba buena y otras especies de muña, a la vez ambos autores mencionan: “ las pruebas físicas aplicadas al aceite esencial de *Satureja boliviana*, según los caracteres organolépticos, densidad, índice de refracción, rotación óptica, punto de congelación, solubilidad en etanol absoluto y pruebas químicas de coloración, que la mayoría de sus componentes son de naturaleza de los monoterpenos, con grupos cetónicos” Así mismo, Skocibusic *et al.* (2004), menciona que en los aceites esenciales de *Satureja subspicata* extraídas por hidrodestilación, se llegó a identificar carvacrol 16.76 % , α -pineno 13.58 % , p-cimeno 10.76 % , γ -terpineno 9.54 % y éter metílico de timol 8.83 % , también demostraron que existe una gran actividad antibacteriana contra gram positivas y gram negativas, cuyos resultados de inhibición oscilan entre 0.09 – 6.25 mg/ml y de 1.56 – 25.0 mg/ml de dosis respectivamente.



2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Descripción de la muña (*Satureja boliviana* Benth.)

Clasificación taxonómica

Reino:	Vegetal
División:	Angiospermae
Clase:	Dicotiledoneae
Sub clase:	Simpetales
Orden:	Campanulales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Satureja</i>
Especie:	<i>boliviana</i>
Nombre científico:	<i>Satureja boliviana</i>
Nombre común:	“muña” (Beck, 2004)

Características botánicas:

Es una planta aromática herbácea anual, crece erguida de 0.50 a 1.20 metros de altura. Presenta: tallos cuadrangulares, hojas opuestas y glandulosas, cortamente pecioladas decusadas, láminas ovadas u oblongas de 12 a 33 mm de largo por 5 a 12 mm de ancho, enteras. Pecíolo de 2 a 4 mm de longitud. Flores hermafroditas zigomorfas dispuestas en racimo corto o pseudoespigas axilares de 3 a 4 mm de alto. Pedúnculo de 2 mm de longitud. Corola bilabiada de 2.5 mm de altura, labio superior entero, labio inferior trilobulado. Cáliz acampanado de 2 mm con pelos glandulosos, 10 nervado, 5 dentado. 4 estambres didinamos. Ovario unilobulado. pistilo ginobásico, estigma bífido. Fruto tetraquenio. Semillas de color marrón oscuras y de forma oval de 1.5 mm de largo y menos de 1 mm de ancho (Cáceda & Rossel, 1993).



Distribución Geográfica:

Es una especie con distribución extensa en el Altiplano y valles interandinos que se encuentran entre los 3 800 y 4 300 msnm. y se distribuye en varios sectores de los valles altoandinos y en puna húmeda (Cáceda & Rossel, 1993).

Propiedades terapéuticas:

Entre las plantas peruanas utilizadas en la medicina tradicional, son pocas las que han logrado su validación y una de ellas es la muña, esta planta precisamente es utilizada con la finalidad de tratar dolores en las vías digestivas y respiratorias en la medicina tradicional (Hammond *et al.*, 1998).

Composición química del aceite esencial:

En las siguientes tablas 1 y 2 se detalla la composición química de los elementos principales del aceite esencial de *Satureja boliviana* (muña).

Tabla 1. Porcentaje de terpenoides obtenidos a partir de aceite esencial extraído por Arrastre de vapor de agua de la planta *Satureja boliviana* Benth (muña) procedente del distrito de Ayaviri del departamento de Puno.

Metabolito	Porcentaje (%)	Peso molecular
Pulegona	70.0	152.1
Isomentona	15.0	154.1
Mentona	10.0	154.1
Pepiretona	5.0	152.1

Fuente: Luque (2004).

Tabla 2. Porcentaje de los principales componentes de los aceites esenciales determinado por análisis de cromatografía de gases y espectroscopia de masas, de la planta de la familia Lamiaceae *Satureja boliviana* Benth, colectadas de la Provincia de Manco Kápac (3860 msnm), Departamento de La Paz, Bolivia.

Compuesto	Porcentaje (%)	Compuesto	Porcentaje (%)
Isomentona	33.61	α -Tujeno	1.35
Carvacrol	11.14	α -Pino	1.09
Pulegona	9.79	Terpineno	1.04
1-metil-2-(1-metil)-benceno	9.04	α -Terpineol	1.00
1,8 Cineol	9.02	Cariofileno	1.00
Sabineno	2.92	Epibiclosesquifelandreno	0.97
Indo bornil acetato	1.53	Espatulenol	0.43

Fuente: Figueroa *et al.* (1995).

Plantas Medicinales

Los sistemas médicos tradicionales y de extensión popular están compuestos fundamentalmente por el uso de plantas medicinales y aromáticas que, a su vez son su principal materia prima para uso medicinal. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población en el mundo atiende sus problemas médicos únicamente mediante el uso de plantas medicinales (Jiménez, 2003).

Algunos autores afirman que solo se ha estudiado, desde el punto de vista fitoquímico, algo más del 10% de la flora presente en la tierra, lo realizado con la flora marítima, es lógicamente ínfimo, lo que nos lleva a suponer a futuro, un 90% de plantas con bondades farmacobioquímicas esperan para ser descubiertos con investigaciones incluyendo su composición química, y si nos preguntamos en relación a la actividad biológica ¿Qué



hay?, evidentemente y de manera relativa existe escasa cantidad de plantas tropicales estudiadas desde una mirada de la acción farmacológica, siendo inferior al 1% (Jiménez, 2003).

Definitivamente, para implementar de modo rápido y eficaz procesos que nos encaminen en la búsqueda de sustancias biológicamente activas, es necesario realizar una conjunción entre distintas disciplinas científicas que se complementen agrupándose a la química de productos naturales, la etnobotánica y la medicina. De esta manera, se incorpora proyectos tecnológicos innovadores e interdisciplinarios, incluyendo la etnomedicina, las técnicas modernas de separación y elucidación de estructuras químicas, la determinación de principios activos y necesariamente el screening in vivo, entre otros (Nicolai, 2000).

Aceites Esenciales

Son fitoconstituyentes que se encuentran en plantas que tienen por característica ser aromáticos, debido a que están compuestos de combinaciones que incluyen componentes oxigenados, sesquiterpenos y terpenos, además de otros componentes lipídicos que a temperatura ambiente suelen volatilizarse, contienen componentes farmacológicamente activos, y pueden ser arrastrados con vapor de agua caliente. Los aceites esenciales son solubles en etanol y pequeña proporción de ellos se solubilizan en agua. La destilación con vapor de agua caliente puede hacer posible obtener estos aceites esenciales de las plantas, también cabe mencionar que algunos aceites esenciales suelen solidificarse en resina al entrar en contacto con el aire. Estos aceites se encuentran en estructuras glandulares o ductos secretores de los tejidos vegetales (Kinghord, 2001).

Los hidrocarburos son predominantes en algunos aceites como en el aceite de turpentina, en ellos se pueden hallar solo pequeñas cantidades de compuestos oxigenados



y en otros, como el aceite de clavo de olor se componen en elementos oxigenados. El sabor y olor característico que presentan los aceites volátiles es debido a la presencia de compuestos oxigenados, siendo que la mayoría de éstos aceites esenciales tienen un origen terpenoide, a su vez, un reducido número de estos aceites, como del clavo de olor y la canela poseen derivados aromáticos combinados con terpenos y algunos escasos compuestos como el timol y carvacrol que estructuralmente son de tipo terpenoide (Kinghord, 2001).

Se trata de combinaciones homogéneas de componentes químicos orgánicos, que provienen de los terpenoides. Comparten la tarea de generar una gran diversidad de aromas que son percibidos de agrado al olfato. Al encontrarse en condiciones ambientales de temperatura y humedad, se encuentran en estado líquido y son de menor densidad que el agua, aunque con mayor viscosidad. Manifiestan coloraciones dentro del espectro amarillo, incluso en algunos tipos de aceites esenciales llegan a ser transparentes (Gunther, 1948; Teuscher et al., 2005; Muñoz, 2002; Peter, 2004).

Otras características que poseen además de ser inflamables, son atóxicos y en cierta medida alergénicos en algunas personas y a pesar de que no son tóxicos, pueden generar alergias a personas con sensibilidad a determinados terpenoides (Cadby et al., 2002). En tanto no se apliquen dosis que superen los límites de toxicidad establecidos son sustancias inocuas. Sus componentes se degradan al ser expuestos a álcalis fuertes, ácidos, calor constante, aire y luz solar, los que generan oligómeros de naturaleza indeterminada. La gran mayoría de lípidos son solubles en disolventes orgánicos comunes y que son casi inmiscibles mezclados con disolventes polares asociados, entre ellos el amoníaco y el agua. Poseen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos



aromáticos que se encuentran dentro de su estructura química y la Agencia de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) las ha considerado como sustancias seguras (Code of Federal Regulations, 2003).

Durante las últimas décadas, se tiene por asumido que el procedimiento para obtención de aceites esenciales es por vaporización, ya sea del aceite libre o del que se encuentre en el área superficial de las hojas u otra estructura, que en el momento en que el lecho vegetal es cubierto por una corriente de vapor saturado de agua el aceite sea arrastrado. Esta premisa está sustentada por abundante información empírica, hecho que se le asume a un equilibrio termodinámico alcanzado entre el agua y el aceite, y que la vaporización es la que controla el proceso. Entonces debido a esto, al proceso se le denomina como “hidrodestilación” (Gunther, 1948).

Considerando la investigación pionera de Von Rechenberg, los estudios botánicos y el conocimiento empírico adquirido, hace deducir de la existencia de hasta tres fenómenos que controlan el proceso de destilación de aceite esencial. El primero de ellos es la vaporización inmediata que ocurre en la materia vegetal, específicamente en la interfase de la película que se forma en su superficie al contacto con el vapor circundante. Luego, el segundo fenómeno es la difusión del aceite vaporizado en medio de la corriente del vapor circundante, esto ocurre porque el vapor en el sistema de extracción ejerce una convección que lo transporta inmediatamente al exterior del equipo. Finalmente, un tercer elemento es la excreción o exudación del aceite esencial, que atraviesa la cutícula, partiendo de la estructura interna de los tricomas glandulares hacia la película que se encuentra en la superficie del material vegetal (Gunther, 1948).



La secreción del aceite, se refiere a la difusión desde el interior de la matriz herbácea, tal proceso resultante se trata de un fenómeno cinético, pues, es la vaporización que induce a la liberación del aceite, se representa por una velocidad que mantiene el flujo del aceite mezclado con el vapor de agua, mediante un factor de efectividad de extracción, similar al módulo de Thiele, el cual es empleado para la reacción heterogénea en un sólido poroso y su difusión, se puede relacionar la vaporización con la difusión del componente a extraerse desde el interior de la planta, pero se suele despreciar la difusión desde la parte superficial de la planta. Este modelo tiene cierta limitación debido a que el aceite esencial se halla principalmente en los tricomas glandulares superficiales, más no al interior de las hojas o al interior de la misma planta, como solía asumirse, mientras que la vaporización instantánea está vinculada al equilibrio de las fases formadas, por lo que no se trata de un concepto arbitrario o empírico. Entonces, la implementación del factor de efectividad se muestra físicamente inconsistente al utilizar el módulo de Thiele, pues, el soluto se libera desde la superficie hacia el vapor (Palomino & Cerpa, 1999).

Principios activos con propiedades antibacterianas.

Carvacrol: Su fórmula general $C_{10}H_{14}O$, derivado fenólico, monoterpénico que es hallado dentro de distintos aceites esenciales, su coloración va desde incolora-amarilla, posee propiedades antifúngicas además de antimicrobianas. La molécula en mención, se adhiere en los grupos amino e hidroxilamino de las proteínas presentes en la membrana bacteriana, provocando una alteración en la permeabilidad (Badui, 1998; Asociación Argentina de Fitomedicina, 2002).

Linalol: Con fórmula general $C_{10}H_{18}O$ es un alcohol acíclico, este es sintetizado desde el mirceno del dehidrolinalol, tiene como característica su insolubilidad ante el agua, pero soluble en etanol al 60%, posee un olor refrescante a flores (Badui, 1998).



Pulegona: Su fórmula general es $C_{10}H_{16}O$, es una cetona terpénica cíclica, está presente entre ciertas lamiáceas, es sintetizada desde 3-metil-ciclohexanona. Se trata de una sustancia oleosa, que en cloroformo, éter y etanol es miscible y tiene un olor similar a la menta (Badui, 1998).

Terpenos: La alta concentración de terpenos como carvacrol, cineol y limoneno pueden explicar la actividad inhibitoria de los aceites esenciales al exhibir actividad antibacteriana *in vitro* debido a que se provoca una modificación de la bicapa lipídica que conforma la membrana plasmática trayendo como consecuencia una alteración en su permeabilidad. Por esto, se entiende que la actividad antimicrobiana tiene como elemento fundamental al grupo hidroxilo presente en las estructuras de timol y carvacrol (Koroch *et al.*, 2006; Trombeta *et al.*, 2005).

La literatura científica presenta informes de actividad antibacteriana de aceites esenciales que no puede ser explicado solamente por la actividad de los terpenos como moléculas únicas. Tiene más sentido asumir que el sinergismo entre los diversos componentes químicos que conforman los aceites esenciales como mezcla producen un efecto antibacteriano (Bueno *et al.*, 2009; Edris, 2007).

Obtención de aceites esenciales por el método arrastre de vapor de agua

Es llamada también hidroextracción, hidrodifusión e hidrodestilación y no hay consenso en su denominación. El método consiste en emplear vapor de agua caliente saturado a determinada presión en un sistema cerrado que contiene material vegetal llamándose a este proceso “destilación por arrastre de vapor”; aunque también se ha asumido que el agua funciona como agente extractor que hizo que se le nombre como “hidroextracción”. A la hidrodestilación se le definiría como un procedimiento que



permite extraer aceite esencial de una planta aromática, a través del empleo de vapor de agua saturado a presiones atmosféricas alcanzando temperaturas próximas a 100 °C en determinado momento, provocando en el tejido vegetal un quiebre de sus estructuras induciendo así a la liberación del aceite esencial en forma de vapor a presión (Palomino & Cerpa, 1999).

Consideraciones para la recolección de la materia prima

La recolección de la planta como materia prima, tiene que realizarse durante la temporada adecuada, que por lo general corresponde justo al momento de la floración. Entre la variedad de plantas silvestres, esta etapa se da entre la estación de primavera-otoño con diversos picos de abundancia, también puede ocurrir en dos periodos: el primero, entre fines de primavera e inicios del verano; y el segundo, a finales de verano e inicios de otoño. En el momento de la floración, las hojas alcanzan un número máximo y luego inicia la formación de los órganos de reproducción de la planta con formación de la semilla y continuando con la caída de las hojas como señal de envejecimiento de la planta. Es por este motivo que se ha recomendado que se respeten estas épocas para recolectar plantas, haciendo que de esta manera se pueda maximizar el volumen cosechado y su calidad. Además, se hace importante, que la recolección de la materia prima sea realizada de madrugada, previo al inicio de la fotosíntesis (Elechosa, 2009).

Se recomienda no arrancar las plantas de manera directa, debido a que el suelo en la sierra se encuentra pobremente estructurada, por lo que la alteración del escenario con la desaparición de una planta, puede desencadenar inestabilidad con la consecuente pérdida del suelo lo cual es perjudicial para el ecosistema así como para la perpetuidad de la especie. Para las especies arbustivas o herbáceas, se deben considerar algunos



cuidados particulares: los cortes deben ser finos con tijeras bien afiladas y a una distancia mayor a los 10 cm del cuello de la raíz, sujetando las ramas hacia abajo y evitando que se desarraiguen de la raíz, porque al tironear se llegan a lacerar los pelos absorbentes generando una reducción del contacto rizodermis-suelo, trayendo como consecuencia una deshidratación de la planta (Elechosa, 2009).

Mientras que, con las plantas rastreras, se deben cortar las ramas erguidas, permitiendo que al menos dos de ellas puedan mantener contacto con el suelo permitiendo que formen nuevas raíces a partir de los nudos y se puedan seguir propagándose para asegurar la calidad genética de la planta recolectada. Por otro lado, el material que se recolecta tiene que empaquetarse en bolsas de papel kraft para minimizar la descomposición natural (Elechosa, 2009).

2.2.2. Descripción de la bacteria *Escherichia coli*

Clasificación taxonómica

Dominio:	Bacteria
Reino:	Monera
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Gracilicutes
Orden:	Baciliales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>Escherichia coli</i> (Bergey,2001)



Morfología

Es un bacilo Gram negativo, mide de 1 a 3 μm por 0.2 a 0.4 μm , presenta flagelo y pilis, con pared celular constituida en su mayoría por peptidoglicano, presenta una doble membrana fosfolipídica (Trigoso *et al.*, 1992).

Epidemiología

Las enfermedades diarreicas fueron asociadas por primera vez con las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). En la actualidad, siguen consideradas como su causa principal entre los niños de los países más pobres del mundo. Cabe señalar que esta enfermedad es rara en países en vías de desarrollo, aunque cada cierto tiempo ocurren pequeños brotes con pequeñas cargas infecciosas que se transmiten entre personas, especialmente en guarderías (Murray *et al.*, 2010).

Mecanismo de infección de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Esta bacteria infecta al adherirse a las células epiteliales del intestino delgado provocando que las microvellosidades sean destruidas. Los pili formadores de haces (BFP) son los que median la adhesión inicial y que determinan el crecimiento de las microcolonias sobre las células epiteliales. Los genes codificados en islotes de patogenicidad “locus de borramiento de los enterocitos” (LBE) son los que regulan el anclaje a la célula epitelial. Entonces, la adhesión de la célula anfitriona y la superficie de la célula afectada es conducida por un grupo de más de 40 genes, la que ocasionan la degradación celular. Tras la unión bacteria-célula epitelial, se activa secreción de proteínas de la célula epitelial, inducido por el sistema secretor de tipo III del agente patógeno. En la membrana epitelial se inserta la proteína receptora íntima translocada (Tir), que cumple la función de recibir a la íntima, la cual, es una adhesina bacteriana,



al completarse la unión de la intimina con Tir, se desencadena la polimerización de actina y la acumulación de elementos del citoesqueleto celular por debajo de las bacterias ancladas, lo que genera la reducción de la integridad superficial de la célula, y por lo tanto su muerte (Murray *et al.*, 2010).

Cuadro clínico ocasionado por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Está caracterizada por la presencia de fiebre leve, malestar general, vómitos y diarrea acuosa profusa y crónica, con gran cantidad de moco sin presencia de sangre macroscópica y regularmente se encuentra leucocitosis en sangre periférica (Winn *et al.*, 2008).

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Para detectar a los quimioterápicos activos respecto al microorganismo causante de la infección se prefiere utilizar los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* (Murray *et al.*, 2010).

Infección bacteriana

La infección ocurre cuando las bacterias ingresan dentro del organismo humano. Se entiende que el cuerpo humano supone una serie de condiciones favorable para la bacteria, proporcionándole alimento, humedad y calor que necesita para su crecimiento, debido a que ellas adquirieron atributos genéticos que facilitan su incursión (invadir), permanencia (colonizar) para acceso a las fuentes de nutrientes limitando las respuestas inmunes y no inmunes del organismo huésped. Muchos de los mecanismos empleados por las bacterias con la finalidad de mantener sus nichos y los productos derivados del crecimiento bacteriano pueden producir problemas graves en el organismo humano (Murray *et al.*, 2010).



Resistencia bacteriana

Se trata de un fenómeno en el que un microorganismo evita los efectos de un antimicrobiano al que en algún momento era sensible. Los microorganismos resistentes como parásitos, bacterias y algunos virus resultan inmunes y no se ven afectados por los antiparasitarios como los antipalúdicos, los antibióticos y antivirales, ocasionando que las terapias comunes resulten insuficientes para eliminar al microorganismo, permitiendo que la infección permanezca y se transmita a más personas (OMS, 2011).

Bacterias comunes y patógenas

En este acápite se señalan algunos de los agentes patógenos nosocomiales considerados los más habituales.

- **Bacterias comensales:** Son halladas habitualmente entre las personas sanas, se trata de bacterias propias de la flora normal del ser humano. Poseen una función protectora fundamental para la prevención de la formación de colonias de microorganismos patógenos. Sin embargo, ciertas bacterias comensales son capaces de generar una infección en el anfitrión natural si hay un compromiso inmunológico o la carga bacteriana es lo suficientemente capaz de provocar una infección. La más común de ellas es la *Escherichia coli* del tracto intestinal, causante de infecciones urinarias (OMS, 2002).

- **Las bacterias patógenas:** Se trata de bacterias con una virulencia mayor, lo que las vuelve potenciales causantes de infecciones (esporádicas o endémicas), ello sin importar las condiciones en las que se encuentre el organismo anfitrión. Por ejemplo: podemos mencionar a las bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae* (*Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia coli*) que tienen una excelente capacidad de formar colonias en distintas áreas del organismo humano incluso



donde se encuentran las defensas inmunológicas, sumado a ello la capacidad de resistencia que puede llegar a ser muy alta. Cabe mencionar que algunas bacterias como la *E. coli* son un grave riesgo para la salud pública (OMS, 2002).

Evaluación de la susceptibilidad microbiana

Muchos microorganismos han desarrollado diferentes grados de resistencia a los quimioterápicos, en algunos casos con el paso del tiempo causan efectos colaterales, lo que no sucede con el uso de los principios activos de una planta. Duraffourd y colaboradores, indican haber trabajado mucho en fitoterapia clínica, aplicando tratamientos en base a aceites esenciales y que han comparado con las actividades que presentan los antibióticos, además reportan que, al usar componentes activos como aceites esenciales no se ha visto evidencia de efectos adversos en humanos. Luego de realizar números estudios estadísticos, diseñando tablas de la actividad antimicrobiana en función a diámetros de los halos de inhibición formados por los aceites esenciales, establecen clínicamente lo siguiente:

- Sensibilidad Nula : cuando el diámetro es inferior a 8 mm
- Sensibilidad límite : cuando el diámetro comprende de 8 a 14 mm
- Sensibilidad media : con diámetros que van de 14 a 20 mm
- Sensibilidad sumamente sensible : para diámetros superiores a 20 mm (Duraffourd *et al.*, 1983).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

La recolección de la materia prima, se procedió recolectándose las plantas de *Satureja boliviana* Benth, muña, de las laderas de los cerros ubicados geográficamente en la comunidad de Gilahuancasayani del distrito de Asillo, provincia de Azángaro, departamento de Puno, con las coordenadas 14°39'52.8''S 70°22'27.9''W, para su destilación se transportó al Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano ubicada en la ciudad de Puno. Las pruebas experimentales de efecto antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de muña fresca y seca enfrentadas a la cepa certificada *Escherichia coli* ATCC® 25922™ lote: 335-530-3 se ejecutó en las instalaciones privadas del Laboratorio Clínico San Pablo, área de microbiología, de la ciudad de Juliaca.

3.2. TIPO DE ESTUDIO.

El tipo de investigación fue experimental, aleatorizado, manipulado y comparativo.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población infinita en estudio, está representada por los aceites esenciales provenientes de la especie *Satureja boliviana* Benth, que se encuentra distribuida geográficamente en las laderas de los cerros que forman parte de la comunidad de Gilahuancasayani del distrito de Asillo, provincia de Azángaro. La muestra fue no probabilística por conveniencia o muestra dirigida, representada por 450 µl de aceite



esencial para realizar la experimentación de efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, realizándose cinco repeticiones para cada tratamiento con un total de 30 unidades experimentales.

3.4. METODOLOGÍA

La investigación se dividió en tres etapas:

Etapa pre analítica:

Recolección de la materia prima y extracción de los aceites esenciales.

Fundamento.

Es vital que considerar, por motivo de conservación de una especie de planta para evitar que se extinga realizar un corte a la planta a 10 cm del suelo, en plantas herbácea, así como en plantas rastreras (Elechosa, 2009). En las estructuras estomáticas de especies de plantas aromáticas se presentan sus aceites esenciales. Al ingresar vapor de agua a los estomas se provoca su rotura dando a lugar la destilación de aceite esencial. Este tipo de método es aprovechado por la industria aromática por su abaratado costo, si se compara con diferentes métodos utilizados para la obtención de aceites esenciales (Bandoni, 2003).

Procedimiento:

La planta se colectó antes de la floración, en la comunidad de Gilahuancasayani del distrito de Asillo, provincia de Azángaro, a 3924 msnm, de las laderas del cerro ubicado en la misma comunidad, un hábitat abrigado por dos laderas y abastecido por la humedad de un manantial que se abre paso desde la parte alta del cerro, el mismo que es alimentado por un riachuelo pequeño cuyo lecho va cuesta abajo; se cortó la muña con una hoz a 10 cm aproximadamente del suelo, de tal manera que cada una de las plantas vuelvan a crecer, en seguida se empaquetó la muña en bolsas de papel kraft con la



finalidad de disminuir al mínimo la descomposición natural durante el tiempo de traslado al Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano (Fig. 1).

Previo al proceso de destilación de los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor de agua se ha descontaminado el equipo de destilación tipo Clevenger con alcohol de 90° y lavado con agua destilada para retirar los residuos de alcohol, un peso de 5 Kg de muña fresca se introdujo en la columna de extracción del equipo, se esperó el ascenso de la temperatura en todo el sistema a 88 °C, al iniciarse la destilación se graduó el caudal de la mezcla aceite y agua en la pera de decantación, la mitad de 5 Kg de muña fue sometido previamente a secado de manera natural en la sombra por 5 días, se procedió a destilar el aceite de la muña seca, al término de la destilación y decantación, se añadió sulfato de sodio anhidro para realizar una separación de partículas sedimentadas, se procedió a determinar densidades de los aceites por el método de picnometría aplicándose la fórmula:

$$P.e. = \frac{W_o}{W_o + (W1 - W2)}$$

Donde: P.e. = peso específico; W_o = peso del aceite esencial; $W1$ = peso del picnómetro (con agua destilada); $W2$ = peso del picnómetro (con muestra de aceite esencial).

A temperatura de 12 °C el aceite esencial tendrá una densidad dada según la ecuación:

$$\delta_{12}^{\circ} = X \text{ g/ml}$$

Donde: δ = densidad; X = valor numérico hallado; g = gramos; ml = mililitros. Posteriormente cada uno de los aceites esenciales extraídos fueron depositados en frascos de vidrio oscuro, cerrado herméticamente y almacenado a 4 °C.



Figura 1. *Satureja boliviana* Benth (muña) en proceso de secado natural en sombra.

Etapas analíticas

Para la evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* de los aceites esenciales de *Satureja boliviana* Benth (muña) seco y fresco extraído por hidrodestilación a volúmenes de 10, 15 y 20 μ l frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 se procedió a realizar lo siguiente:

Esterilización de materiales a trabajar sometido a calor húmedo.

Fundamento.

Los equipos de autoclave, en su interior elevan la temperatura de manera rápida en corto tiempo, ello sin dejar en el material autoclavado sustancias tóxicas, cumpliendo de que el material muy necesariamente deba ser resistente a altas temperaturas y ser adecuadas para esterilizarlas en calor húmedo. El calor húmedo provoca desnaturalización de proteínas durante el proceso de autoclavado eliminado así cualquier forma de vida. El tiempo considerado para la esterilización es entre 15 y 30 minutos a 1.5 atmósferas, alcanzando los 180°C (MINSAs, 2009).



Procedimiento

Todo material necesario, de vidrio, pinzas, tijeras, fueron acomodados al interior del equipo de autoclavado, llevándose al óptimo funcionamiento al alcanzar los 180 °C por 30 minutos a presión generada de 1.5 atm, posteriormente se dejó disminuir su temperatura, se retiró todos los materiales esterilizados y se empaquetó para ser guardado hasta el momento de su utilización.

Preparación de Mueller – Hinton como medio para la prueba de susceptibilidad bacteriana

Fundamento

El Agar Mueller – Hinton presenta reproducibilidad de lote a lote bastante aceptable (NCCLS, 2002); su composición hace posible el crecimiento de la mayoría de bacterias con importancia clínica, sin presentar variaciones entre diferentes lotes y las pruebas de control de calidad presentan la misma reactividad, durante las pruebas de difusión en placa (Koneman,1991).

Procedimiento

El medio Agar Mueller – Hinton deshidratado se constituyó con agua destilada y llevado a un pH promedio de 7.3, según las indicaciones del fabricante, se llevó a autoclave para su esterilización, se enfrió en baño maría para que descienda a una temperatura de 50°C para ser vertido en placas petri considerando una altura de 4mm de grosor, se dejó enfriar para ser almacenado a temperatura de 2 a 4 °C hasta el momento que sea requerido.

Activación de la cepa comercial *Escherichia coli* ATCC 25922.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, se realizó la activación y sembrado de la cepa comercial liofilizada de *Escherichia coli* ATCC 25922 certificada en medio agar sangre para su recuperación. Fig. 2, se llevó a incubación a 37 °C durante 18 horas.

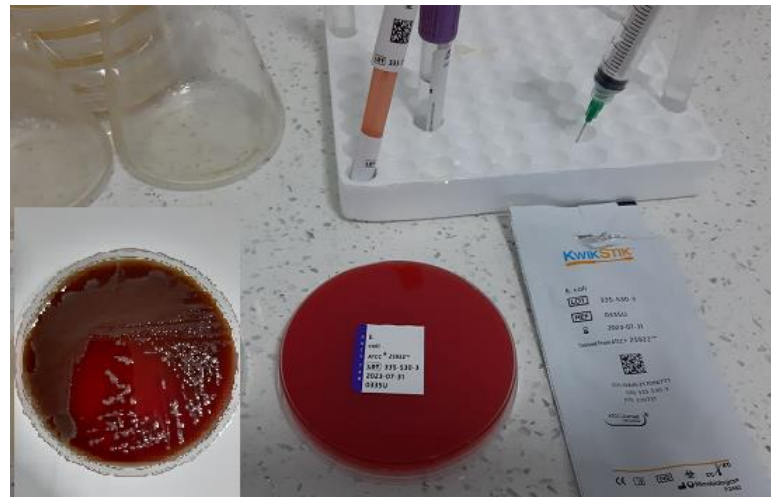


Figura 2. Activación de la cepa comercial certificada *Escherichia coli* ATCC 25922 y desarrollo en medio agar sangre.

Preparación del estándar de McFarland.

Se preparó soluciones químicas de, BaCl (cloruro de bario) con agua destilada, mezclando 1.175 g de soluto con 100ml de solvente, llegándose a una concentración de 1.175%; se combinó H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 0.36N con agua destilada 1:100, obteniéndose H₂SO₄ al 1%, finalmente se mezcló las soluciones obtenidas de BaCl y H₂SO₄ en proporciones de 1:200, se homogenizó, se distribuyó en frascos transparentes, se tapó herméticamente y se guardó entre 2 y 4 °C hasta ser utilizado (INS,2001).

Preparación del inóculo

Para obtener una concentración adecuada de bacterias a inocularse, se utilizó el estándar de turbidez de sulfato de bario equivalente a 0.5 de Mc Farland, para obtener un



inóculo a concentración de 1×10^8 ufc/ml. (NCCLS,2002), para ello se consideró al menos 4 colonias aisladas de la cepa activada que desarrollo en agar sangre, luego se homogenizó en un tubo con 4 ml de medio líquido tripticasa soya, se llevó a incubación a 37°C hasta obtenerse una turbidez óptica equivalente a la escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/ml), se comparó el inóculo con el estándar de Mc Farland en un fondo blanco con líneas negras para verificar que el inóculo sea el adecuado para las pruebas de suceptibilidad.

Método de difusión en placa según Kirby – Bauer en agar Mueller – Hinton

Fundamento

La bacteria a inocularse es distribuida en medio bacteriológico sólido para adicionar cantidades graduadas del componente antimicrobiano (Winn *et al.*, 2008). El tiempo estimado para alcanzar un desarrollo óptimo, luego de colocar los discos de papel impregnados con la sustancia antibacteriana, a prueba, en el medio Mueller – Hinton, es de 18 horas, hasta la formación de un halo, el que es medido con una regla milimetrada, además la concentración de la sustancia antibiótica debe ser lo necesariamente abundante para alcanzar una difusión homogénea y reproducible (Koneman *et al.*,2008).

Procedimiento:

Se inoculó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 previamente ajustada a concentración equivalente al estandar de McFarland en las placas petri que contienen el agar Mueller-Hinton, seguidamente se dispensó discos de papel filtro sobre el medio de cultivo, se procedió a dispensar el aceite esencial de muña fresca, con una micropipeta graduada, los volúmenes de 10, 15 y 20 μl , así mismo se dispensó aceite esencial de muña seca en otro grupo de placas con agar Mueller – Hinton previamente inoculadas (Fig. 3), se inoculó suero fisiológico como control negativo por cada repetición, se llevó a estufa

de incubación a 37 °C durante 18 horas, se revisó la ausencia o presencia de los halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con aceite esencial, el diámetro de los halos de inhibición (área circular sin desarrollo bacteriano o de colonias de bacterias) fueron medidos utilizando una regla milimetrada.

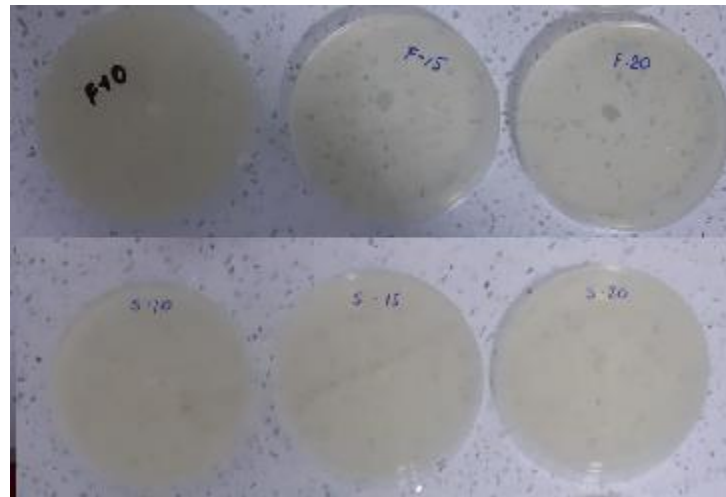


Figura 3. Agar Mueller Hinton inoculado con *Escherichia coli* ATCC 25922 y discos impregnados con aceite esencial extraídos de *Satureja boliviana* Benth (muña) fresca y seca.

Etapas post analíticas

Análisis de los datos

Para el análisis de los datos obtenidos se estableció promedios y el tratamiento de los datos se realizó según el Diseño Factorial 2x3 (aceites esenciales x volumen o dosis) en el software SPSS, considerándose un nivel de significancia de 5% = 0.05, correspondiendo al modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = Es la variable respuesta de la k -ésima observación bajo el j -ésimo nivel del factor B, sujeto al i -ésimo nivel del tratamiento A. $i = 1, 2$. (niveles del factor A; aceite



esencial de muña). $j = 1, 2, 3$. (niveles del factor B; dosis de 10, 15, 20 μl). $k = 1, 2, 3, 4, 5$. (repeticiones). $\mu =$ Constante, media de la población a la cual pertenecen las observaciones; $\alpha_i =$ Efecto del i -ésimo nivel del factor A. $\beta_j =$ Efecto del j -ésimo nivel del factor B. $(\alpha\beta)_{ij} =$ Efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A, en el j -ésimo nivel del factor B. $\epsilon_{ijk} =$ Efecto del error experimental.

Hipótesis a probarse:

Respecto al factor A:

$H_i: \alpha_i \neq 0$; existe diferencia significativa, por lo que al menos una respuesta a los tratamientos es diferente.

Respecto al factor B:

$H_i: \beta_j \neq 0$; existe diferencia significativa, por lo que al menos uno de los tratamientos es diferente.

Nivel de significancia:

$\alpha = 0.05; \alpha = 0.01$



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE PLANTA FRESCA Y SECA DE *Satureja boliviana* Benth (muña) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922.

a) Extracción del aceite esencial de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña).

Tabla 3. Cantidad de aceites esenciales obtenidos de *Satureja boliviana* Benth (muña) por el método de arrastre a vapor de agua.

	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Aceite (ml)	Rendimiento(%)
Muña Fresca	5000	5000	41.3	0.82
Muña Seca	5000	2900	32.2	0.60

En la tabla 3, se observa, referente a la extracción de aceite esencial de la muña fresca se obtuvo 41.3 ml a partir de 5000 g de muña fresca, que le corresponde un rendimiento de 0.82% y al deshidratar 5000 g de muña, se obtuvo un peso final de 2900 g de lo que se obtuvo 32.2 ml de aceite esencial que le corresponde un rendimiento de 0.60 %, evidentemente el mayor volumen obtenido de aceite esencial fue de la muña fresca.

Estos datos son contradictorios a lo mencionado por Urrunaga y Acurio (1995) quienes afirman haber obtenido un rendimiento de aceite esencial de *Satureja boliviana* de 1.3 %, y que, consideran apreciable tal porcentaje comparando con otras especies aromáticas como orégano, menta, hierba buena y otras especies de muña adicionalmente indican que “la mayoría de los componentes de los aceites esenciales son de naturaleza

de los monoterpenos con grupos cetónicos”. Además de manera similar, Orbegozo y Rodríguez (2008) indican un rendimiento de aceite esencial extraído de *Minthostachys mollis*, muña, de 0.6 % a pesar de ser una especie diferente, coincide con el rendimiento de la muña seca en estudio. Sin embargo, obtener aceites esenciales a partir de muña fresca podría implicar mejores efectos antibacterianos por contener todos sus componentes terpénicos y resultaría favorable para evidenciar un efecto antibacteriano óptimo al usar aceite esencial extraída de muña fresca en lugar de muña seca.

Así mismo, la OMS (2011) al indicar que la obtención de aceites esenciales de materia vegetal seca es de un menor volumen comparado con el aceite extraído de materia vegetal fresca, es coincidente con los datos de la tabla 3, y que ello podría influir en los resultados de estudios abocados a la búsqueda de principios activos de origen natural. Lo que es puesto a prueba por la experimentación en el presente estudio.

b) Respuesta antibacteriana *in vitro* del aceite esencial extraído de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 4. Respuestas antibacterianas *in vitro* de aceites esenciales extraídos de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

FACTOR A:	Extraída de muña fresca				X	Extraída de muña seca				X
FACTOR B:	0 μ l	10 μ l	15 μ l	20 μ l		0 μ l	10 μ l	15 μ l	20 μ l	
1	0	10.0	12.0	12.5		0	10.0	11.5	13.5	
2	0	11.0	11.0	12.5		0	10.0	11.0	12.5	
3	0	10.0	12.0	13.0	11.8	0	10.0	12.0	12.5	11.7
4	0	11.0	12.0	12.5		0	10.0	12.0	14.0	
5	0	12.0	12.5	13.0		0	10.5	12.5	13.5	
Promedio:		10.8	11.9	13.0			10.1	12.5	13.5	

Fuente: el autor de la investigación

Donde X: promedio total



En la tabla 4, se presentan los resultados obtenidos de la experimentación manifestada en el tamaño de halos que indican efecto antibacteriano, de donde se observa un promedio de 11.8 mm de diámetro del halo, alcanzado por el aceite de muña fresca, y un 11.7 por el aceite de muña seca. Al analizar los datos obtenidos con el software estadístico SPSS, estadísticamente no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) aceptándose la hipótesis nula, por lo que usar cualquiera de los dos tipos de aceites esenciales tendrá el mismo efecto antibacteriano.

No se han reportado estudios comparativos entre aceites esenciales extraídas a partir de *Satureja boliviana* Benth (muña) fresca y seca para evaluar su efecto antibacteriano, sin embargo, Castro (2012), reporta que identificó en aceite esencial de hojas frescas de muña, 30.168 % de pulegona y un 45.036 % de mentona y 52.321 % de pulegona y 24.808 % de mentona en aceite de hojas secas, notándose el aumento de pulegona y disminución de mentona en las hojas secas dando fuerza a la idea que la pulegona por encontrarse en mayor cantidad en hojas frescas condicionaria a obtener mejor efecto antibacteriano. Además, a pesar de ser coincidente con lo mencionado por Primo (2001), que identificó pulegona 44.56% y mentona 39.51 % como principales componentes de *Myrthostachis mollis* también sugiriendo que la actividad antibacteriana de debe a la pulegona. Lo cual no sería relevante tales diferencias mencionadas según el presente estudio.

Por otro lado Bezic *et al* (2005), quien menciona haber determinado en aceites esenciales de *Satureja cuneifolia* y *Satureja montana* sesquiterpenos cimeneno, borneol, terpineno y timol y un bajo porcentaje de carvacrol y monoterpenos como limoneno y pineno. Lo que haría suponer que los aceites esenciales extraídas de plantas frescas al

estar más completos en composición tendrían mejor efecto antibacteriano a manera de sinergia, Así mismo, los autores Bueno *et al.* (2009) y Edris (2007) que la actividad antibacteriana de los aceites esenciales es potenciada por el sinergismo de sus componentes químicos. Sin embargo, según el presente estudio se vendría a mencionar nuevamente que tales afirmaciones posiblemente tampoco serían relevantes.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR RESPUESTA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LOS TRATAMIENTOS CON ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDA DE PLANTAS FRESCAS Y SECAS DE *Satureja boliviana* Benth (MUÑA) A VOLÚMENES DE 10, 15 y 20 µl FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 5. Comparación de medias de los tamaños de halo de inhibición de la respuesta antibacteriana de aceites esenciales de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, a diferentes volúmenes o dosis.

Volúmen (ul)	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
10 ul	10.450	0.178	10.083	10.817
15 ul	11.850	0.178	11.483	12.217
20 ul	12.950	0.178	12.583	13.317

Fuente: el autor de la investigación

Entonces, en la Tabla 6, donde se representa las medias de todos los tratamientos, se puede observar que el volumen o dosis de aceite esencial a 20 µl alcanzó un mayor tamaño de halo de inhibición con una media de 12.95 mm, mientras que, al volumen de 15 µl se encontró una media de 11.8 mm y a 10 µl se observa una media de 10.45 mm de halo de inhibición. Al análisis estadístico de los valores de halos producidos por las dosis



o volúmenes de aceite esencial, se encontró estadísticamente diferencia significativa ($p < 0.05$) lo que conduce a rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna, por lo que existe un mejor efecto antibacteriano en una de las dosis empleadas.

Estos resultados según Duraffourd *et al* (1983), quien realizó trabajos en fitoterapia clínica demostrando susceptibilidad de una variedad de microorganismos frente a diversos tipos aceites esenciales, indica que a un halo de inhibición menor a 8 mm no es sensible y un halo entre 8 – 14 mm es igual a sensible. Por lo que, con 12.95 mm de halo de inhibición, *Escherichia coli* ATCC 25922 sería clínicamente sensible, esto a un volumen o dosis de 20 μ l de aceite esencial de muña.

Además, Bezic *et al.* (2005), indica haber logrado la formación de un halo de 23 mm aplicando 10 μ l de aceite esencial de *Satureja cuneifolia* sobre *Escherichia coli*, según el método de difusión en disco de Kirby – Bauer, y que además, con 20 μ l se formó un halo de 32 mm, y con 20 μ l de aceite de *Satureja montana* se formó un halo de 11 mm, resultado que coincide con el presente estudio, adicionalmente, el autor agrega, que con 10 μ l se formó una halo de 7 mm, de este último se puede afirmar que el aceite esencial de cada especie de planta difiere en su efecto antibacteriano. De manera similar, Carbajal (2005), indica haber encontrado inhibición de *Escherichia coli* enteropatógena al volumen de 9 μ l equivalente a una CMI de 8.46 mg/ml con aceite esencial de *Hedeoma mandoniana* y el aceite extraído de *Satureja boliviana* logro inhibición con 7 μ l equivalente a una CMI de 6.55 mg/ml. Por lo que estos datos son similares al presente estudio.

Por otro lado, Diversos autores como Primo (2001), Bezic *et al.* (2005), Orbegoso y Rodríguez (2018), Castro (2012), Skocibusic *et al.*, (2004) además de Urrunaga y

Acurio (1995) mencionan haber identificado componentes químicos presentes en los aceites esenciales de diversas plantas y a las que se les determinó efecto antibacteriano, como: *Minthostachis verticillata*, *Satureja cuneifolia*, *Satureja montana*, *Mintostachis mollis*, *Satureja boliviana* y *Satureja subspicata*, siendo identificado los siguientes componentes: pulegona, mentona, sesquiterpenos como cimeneno, terpineno y timol, carvacrol, limoneno, triterpenos y monoterpenos, siendo la mentona, pulegona y carvacrol los componentes más abundantes. Coincidentemente Koroch *et al.* (2006) y Trombeta *et al.* (2005), mencionan que la capacidad antibacteriana e incluso antifúngica que desencadenan los grupos hidroxilos de los terpenos sobre la estructura de la membrana celular provocan una alteración en la permeabilidad de membrana que trae como consecuencia un efecto inhibitorio o bactericida así como fungicida. El cual se puede afirmar que el efecto antibacteriano determinado en el presente estudio esta inducida por terpenos.

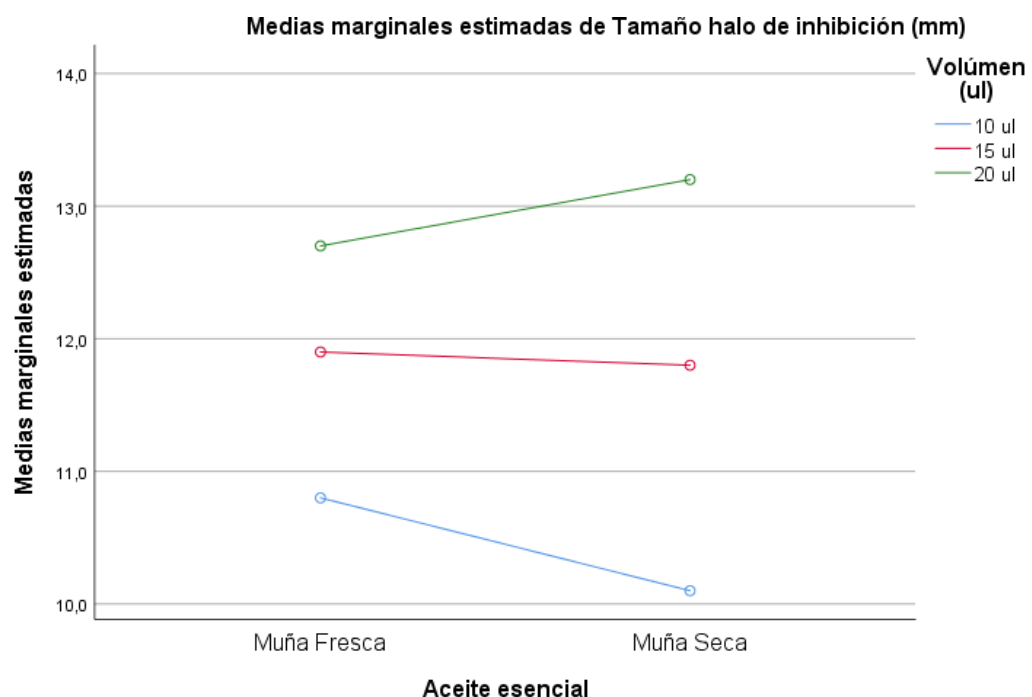


Figura 4. Medias estimadas del tamaño de los halos del efecto antibacteriano *in vitro* de aceites esenciales de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. ANOVA del diseño factorial.



En la figura 4, se observa que, a dosis de 10 μ l se obtuvo un halo de mayor tamaño por el aceite esencial de muña fresca, que el de muña seca y para la dosis de 15 μ l las medias de los de los halos son similares, mientras que a dosis de 20 μ l el aceite esencial de muña seca formó un halo de mayor tamaño, este comportamiento que se puede percibir de la figura, sugiere que podría deberse a que durante el secado de la muña se han perdido algunos componentes del aceite esencial que modifican el efecto antibacteriano sugiriendo que no necesariamente a mayor dosis habrá mejor efecto antibacteriano si se realiza estudios comparativos entre aceite de muña seca y fresca, pero se debe aclarar que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de aceites.



V. CONCLUSIONES

1. El efecto de los tratamientos *in vitro* del aceite esencial extraído de plantas frescas y secas de la especie *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, fue de 11.8 y 11.7 mm, comparativamente los dos tipos de aceites tienen el mismo efecto antibacteriano, por lo que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$).
2. La mejor respuesta antibacteriana *in vitro* a los tratamientos con aceite esencial extraída de plantas frescas y secas de la especie *Satureja boliviana* Benth (muña) a las dosis de 10, 15 y 20 μ l frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fue a 20 μ l con un halo inhibitorio de 12.95 mm, estando por encima de los efectos producidos por las dosis de 15 μ l y 10 μ l, demostrándose que entre los halos de inhibición existe diferencia significativa ($p < 0.05$).



VI. RECOMENDACIONES

Realizar estudios para determinar concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida con valor terapéutico *in vivo* utilizando aceites esenciales extraídos por hidrodestilación de *Satureja boliviana* Benth, (muña) fresca y seca, a su vez identificar los terpenos de los aceites, así como algún posible efecto antibacteriano incluyendo sus combinaciones utilizando diseños factoriales.

Realizar investigaciones para evaluar el efecto antibacteriano de aceites esenciales extraídas por el método de arrastre a vapor de agua, de plantas frescas y secas de otras especies aromáticas, con la finalidad de identificar nuevos principios activos de la flora peruana.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asociación Argentina de Fitomedicina (2002). Farmacognosia. Aceites esenciales.
Se encuentra en
<http://www.plantasmedicinales.org/farmaconogsia/sept2002/aceitesesenciales.htm>
h. (fecha de revisión: 22/10/2016).
- Aquino, E. (2017). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias gram negativas. Universidad Nacional del Altiplano. p.1- 98
- Baca, C. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario. Universidad Nacional del Altiplano. p. 1-76.
- Bandoni, A. (2000). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica (1 ed). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Badui S. (1998). Diccionario de tecnología de los alimentos. Editorial Addison. México, D.F.
- Beck S. (2004). Clasificación taxonómica. Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas y forestales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia..
- Bezic, N.; Skocibusic, M. & Dunkic, V. (2005). Composición fitoquímica y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja montana* L. y *Satureja cuneifolia* Ten. Acta Botánica. Croacia. Vol. 64, Nº 2: p 313-322.
- Brooks G., Butel J. & Morse S. (1999). Microbiología médica de Jawets, Melnick y Adelberg. Décimo cuarta edición. Editorial el Manual Moderno. México, D.F. 900p.



- Bueno J., Martínez J., Stashenko E. & Ribon W. (2009). Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Revista Biomédica. Colombia*. Vol. 29, p51-60.
- Cáceda F. & Rossel J. (1993). *Flora medicinal y cosmovisión campesina en comunidades campesinas de Puno*. Editorial Universitaria. Puno – Perú.
- Calsin, Y. (2017). Actividad antimicrobiana “In vitro” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatógenas. Universidad Nacional Del Altiplano. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/5321>
- Carbajal, J. (2005). Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de la muña (*Satureja boliviana*) y de la pata muña (*Hedeoma mandoniana*) sobre *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno –Perú. P1-59.
- Castro, M. A. (2012). Comparación de los compuestos terpénicos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) extraídos de las hojas frescas y secas. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.p.
- Cadby P. A., Troy W. R., Middleton J. D., Matthias G. H. V. (2002). Fragrances: are they safe? *Flavour Fragr. J.* Vol. 17: p 472-477.
- Chura, Q. (2017) Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Coronado, G. Y. & Cauna, P.Y. (2017). Actividad antibacteriana in vitro de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* (Llanten) y *Rumex crispus* (Lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* Universidad Nacional Del Altiplano. Puno. p 1-71.



- Duraffourd C, D' Hervicourt L, Lapraz Jc. (1983). Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. Editorial Masson SA. París
- Edris A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* Vol. 21, p308-23.
- Elechosa, M. (2009). Desarrollo de tecnologías innovadoras para la exploración, conservación, evaluación y utilización de plantas aromáticas nativas. Buenos Aires. 64p. Se encuentra en: http://www.inta.gov.ar/irb/docs/manual_recol_sustentable.pdf. (Fecha de revisión 27/10/2010).
- Figueroa, N. Estevez, T. Giménez, A. (1995). Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas. Vol. IV. La Paz-Bolivia.
- Espinoza, I. (2018). Efecto Antibacteriano del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” sobre *Escherichia coli* ATCC11229 comparado con Ciprofloxacino. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.p.
- Gunther E. (1948). The Essential Oils. History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: Vol. 1: New York, USA.
- Hammond Gb, Fernandez Id, Villegas Lf, Vaisberg Aj. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J Ethnopharmacology.* Vol. 61, N° 1: p17- 30.
- Huaracha, Olinda. (2019). Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre *Candida albicans*. Universidad Nacional del Altiplano. Puno. p
- Instituto Nacional De Salud. (2001). Laboratorio de enteropatógenos. Unidad de bacteriología. Lima, Perú.



- Jimenez S. (2003). Ventajas y desventajas de los productos naturales. IX Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica. Medellín-Colombia, Octubre. p 22-24.
- Kinghorn D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. J. Pharm. Pharmacol. Vol. 53: p135- 148.
- Koneman, E.; Sthephen, A.; Dowell, J.; Sommers, H. & Winn, W. (1991). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina. p.1-999.
- Koroch A., Juliani R. & Zygadlo J. (2006). Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: Berger RG, editor. Flavours and Fragrances. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p. 87-103
- Luque Y. (2004). Diseño y construcción de un extractor de aceite esencial de muña (Satureja boliviana). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 118p.
- Mamani, L. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio spp* (chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*, Universidad nacional del Altiplano. p.1- 48.
- Minsa, (2009). Ministerio de Salud. Boletín estadístico de salud. Lima, Perú. Vol. 1, N° 1: p17.
- Muñoz F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. 4ª Reimpresión. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Murray P., Rosenthal K. & Pfaller M. (2010). Microbiología médica. Sexta edición. Editorial Elsevier Mosby. Barcelona. España.
- Nccls, (2002). National Committee for Clinical Laboratory Standars. Vol. 22, N° 1.



- Nicolai, S. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Editor: Roberto Pinzón S. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Bogotá, Colombia.
- OMS. (2011). Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N° 194.
- Quispe, D., & Mamani, J. (2016). Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre microorganismos prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. Universidad Nacional del Altiplano. Puno 2016. p. 1–97.
- Quispe, K. (2018). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium sp.* Universidad Nacional del Altiplano. Puno p.
- Salas, A. (2016). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Candida albicans*. Universidad Nacional del Altilano. Puno.p.1- 113.
- Teuscher E., Anton R. & Lobstein A. (2005). Plantes Aromatiques. Épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Editions Tec & Doc, Paris, France.
- Villafuerte, D. B. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora*. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.p.
- Orbegozo, H. M., & Rodríguez, K. G. (2018). Características farmacognósticas y rendimiento del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.p.
- Palomino A. & Cerpa M. (1999). Hidroextracción de los aceites esenciales. Memorias de la IV Reunión de Fenómenos de Transporte. Callao, Perú.



- Peter K. V. (2004). Handbook of Herbs and Spices. Woodhead Publishing Limited: London, England.
- Primo, V. (2001). Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb) Epling. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 33 N° 2: p. 113-117.
- Romero M. (2004). Plantas aromáticas: Tratado de aromaterapia científica. 1ra edición. Editorial Kier S.A. Buenos Aires-Argentina. 227p.
- Skocibusic, M.; Bezic, N. & Dunkic, V. (2004). Composición fitoquímica y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja subspicata* Vis. Departamento de Biología, Universidad de Split. Croacia.
- Urrunaga, R. & Acurio, L. (1995). Investigación de la *Satureja boliviana*: planta medicinal andina. Universidad Nacional de San Marcos. Año 03 Vol. 5 Perú.
- Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. & Woods, G. (2008). Koneman- Diagnóstico Microbiológico. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires-Argentina. p.1- 1696.
- Zapata, B.; Duran, C.; Stashenko, E. & Betancur, L. (2009). Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae. Revista Universidad Industrial de Santander, Salud. Vol. 41, N° 3: p 223-230.
- Zuni, J. (2017). Actividad antibacteriana "in vitro" del aceite esencial de menta (*Menta piperita* L.) frente a *Escherichia coli* *Eenteropatogena* (EPEC). Universidad Nacional del Altiplano. p 1-94.

ANEXOS

FLUXOGRAMA

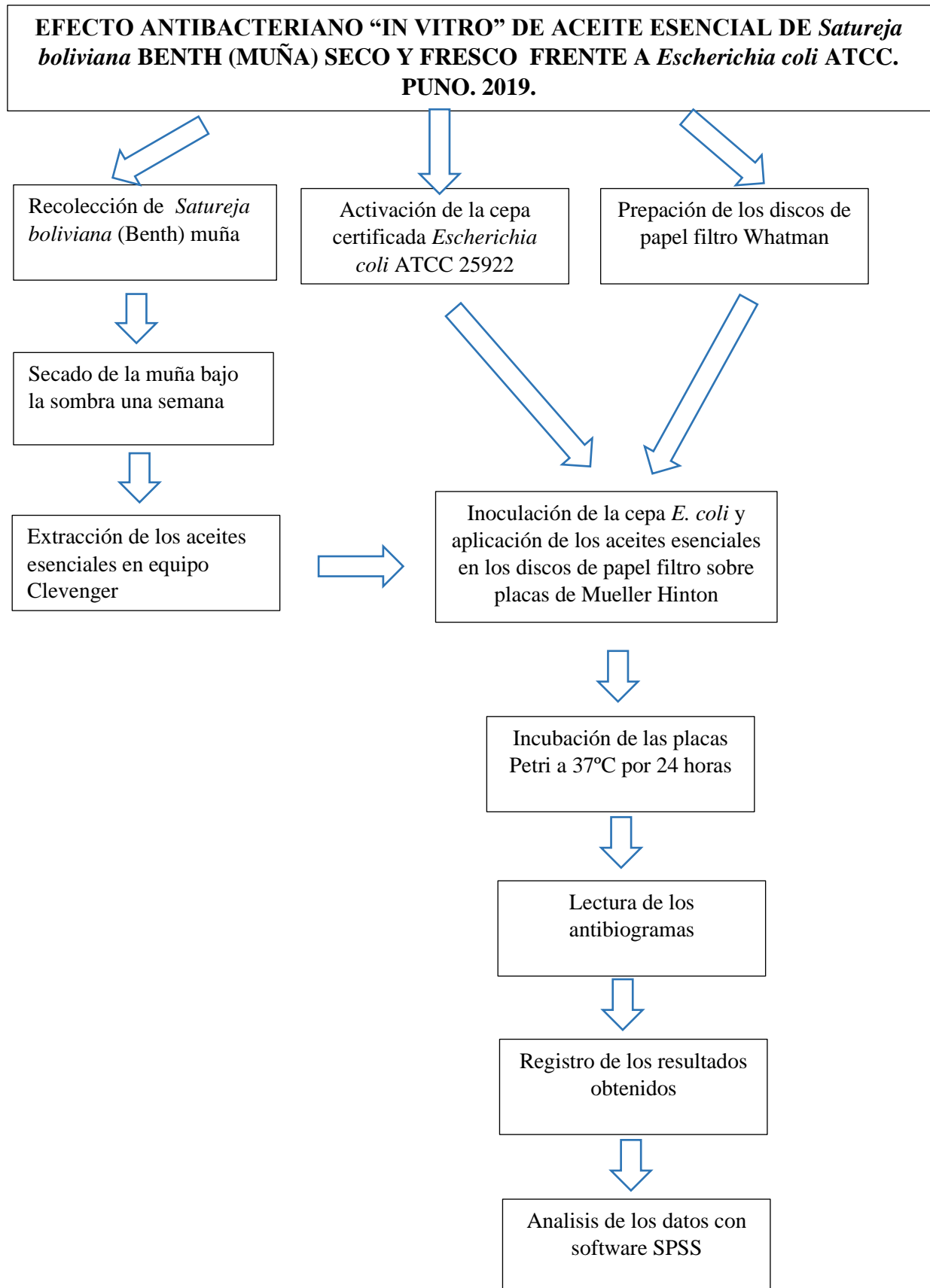




Figura 5. Equipo de extracción de aceites esenciales tipo Clevenger. Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios FIQ-UNA-PUNO, Agosto 2021.



Figura 6. Pesado de *Satureja boliviana* Benth (muña) para el proceso de destilación. Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios FIQ-UNA-PUNO, Agosto 2021.



Figura 7. Desarrollo de *Escherichia coli* ATCC 25922 en Agar Sangre y Agar McConkey, Noviembre 2021.

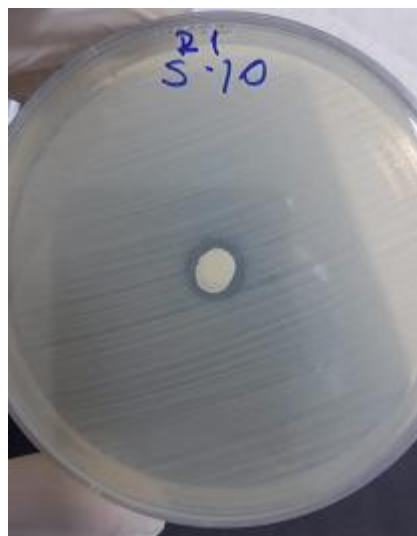


Figura 8. Efecto antibacteriano a dosis de 10 μ l frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, Noviembre 2021.

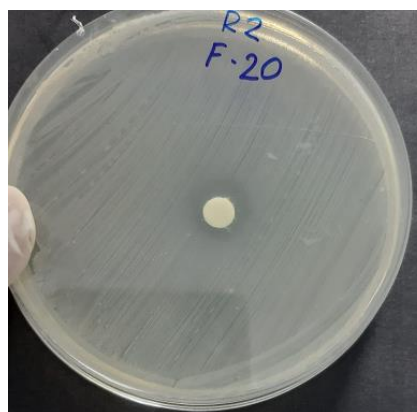


Figura 9. Efecto antibacteriano a dosis de 10 μ l frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, Diciembre 2021.



Tabla 6. Comparación de la respuesta antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales extraídos de planta fresca y seca de *Satureja boliviana* Benth (muña) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, según el ANOVA factorial.

Origen	Tipo III de suma de		Media		
	cuadrados	gl	cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	33.275 ^a	5	6.655	21.016	0.000
Intersección	4141.875	1	4141.875	13079.605	0.000
Aceite	0.075	1	0.075	0.237	0.631
Volúmen	31.400	2	15.700	49.579	0.000
Error	7.600	24	0.317		
Total	4182.750	30			
Total corregido	40.875	29			

a. R al cuadrado = 0.814 (R al cuadrado ajustada = 0.775)



CONSTANCIA

EL DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO.

HACE CONSTAR:

Que, el Sr. **CHANG MAMANI TICONA**, Bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, ha realizado la ejecución de la primera etapa de su proyecto de tesis titulada "EFECTO ANTIBACTERIAL IN VITRO DE ACEITE ESENCIAL DE SATUREJA BOLIVIANA BENTH (muña) SECO Y FRESTO FRENTE A Escherichia, Coli ATCC", utilizando el equipo de Extracción de Aceite esencial (pequeño), a partir del 11 al 26 del mes de agosto del año 2021, en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química UNA-PUNO.

Así consta en el Informe Nro. 003-S01-2021, presentado por el Ing. M.Sc. José Néstor Mamani Quispe, ex responsable (e) del LOPU.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime por conveniente.

Puno C.U., 24 de junio del 2022




WALTHER B. APARICIO ARAGÓN, Ph.D
DECANO DE LA FIQ
UNA-PUNO

Cc.
Archivo 122
ET2/iva



LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO ESPECIALIZADO
“LABORATORIO SAN PABLO”

Hematología Automatizada, Bioquímica, Inmunología, Inmunoserología, Microbiología, Exámenes de Orina, Prueba de Embarazo, Exámenes Anatómicos Patológicos (Biopsias), Hormonas, Marcadores Tumorales, Espermogramas, TORCH y otros.

DIRECCIÓN: Jr. Loreto N° 517 2do. Nivel ☎ 951-860045 ATENCIÓN: DE 7:00 A.M. A 8:00 P.M. DE LUNES A SÁBADO Y DOMINGOS DE 8:00 A.M. A 12:00 P.M.

CONSTANCIA


EL QUE SUSCRIBE EL PRESENTE, GERENTE GENERAL DEL LABORATORIO CLÍNICO “SAN PABLO” DE LA CIUDAD DE JULIACA, DEPARTAMENTO DE PUNO.

Hace constar:

Que el señor Bachiller CHANG MAMANI TICONA, egresado de la especialidad de Microbiología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, ha realizado con responsabilidad y dedicación, la ejecución de la segunda etapa experimental de su proyecto de tesis que lleva por título “Efecto antibacteriano *in vitro*” de aceite esencial de *Satureja boliviana* Benth (muña) seco y fresco frente a *Escherichia coli* ATCC. Puno. 2019”. Durante los meses de Setiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente.

Juliaca, 20 de Abril del 2022.



Lic. C. Arce Pérez Pérez
Gerente general
Laboratorio Clínico San Pablo
MEGA SUR S.R.L.

Email: lapsanpablo53@gmail.com