

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. XIMENA ALEXANDRA DEL POZO ESPINOSA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 06 de Octubre del 2006

Dra. Blanca Naranjo
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Patricia Moreira
CODIRECTOR DE TESIS

REVISADO POR

Master Mónica Jadán
Decana De la Facultad de Ciencias Aplicadas
Ingeniera en Biotecnología

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen por todas sus bendiciones, que me han permitido culminar mis estudios.

A la Escuela Politécnica del Ejército que a través de la Facultad de Ciencias Aplicadas y de todos aquellos catedráticos que compartieron sus conocimientos y experiencias, para cultivar no solo mi mente sino también mi corazón con un sin número de gratos recuerdos, les extiendo mi más sincero agradecimiento.

A la Dra. Blanca Naranjo y a la Ing. Patricia Moreira como directora y codirectora respectivamente, pues supieron aclarar mis dudas mediante el valioso aporte de sus conocimientos.

Al Lic. Arturo Castro y al CENTROCESAL por toda la ayuda que me brindaron para poder realizar esta Tesis.

Ximena Del Pozo

DEDICATORIA

A Dios que con sus bendiciones guía cada etapa de mi vida y a la Virgen por su protección.

A mis padres, hermanos y sobrinos que con su amor, dedicación y fortaleza me enseñaron que en la vida hay tropiezos de los cuales se aprende y siempre hay que seguir para adelante

A José Espinosa (+) y Olga Mora a quienes le debo tanto, sobre todo su amor y dedicación.

A todos mis familiares y amigos quienes a lo largo de la mi carrera estuvieron junto a mí, compartiendo buenos y malos momentos, brindándome palabras de aliento.

Ximena Del Pozo

INDICE

CAPITULO	PAG.
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.3 DATOS	4
1.3.1 Valores con datos numéricos	4
1.3.1.1 Control del proceso de extracción y del producto	4
1.3.1.1.1 Rendimiento del proceso	4
1.3.1.1.2 pH	4
1.3.1.1.3 Densidad relativa	4
1.3.1.1.4 Índice de refracción	4
1.3.1.1.5 Número de bacterias y hongos que pueden estar presentes en el aceite esencial	4
1.3.2 Valores sin datos numéricos	4
1.3.2.1 Control del proceso de extracción y del producto	4
1.3.2.1.1 Olor	4
1.3.2.1.2 Color	4
1.3.2.1.3 Pruebas de coloración para determinar grupos funcionales	4
1.3.2.1.4 Presencia de patógenos	4
1.3.2.2 Determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial	5
1.3.2.2.1 Determinación del crecimiento de los distintos microorganismos frente al aceite esencial.	5

CAPITULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas Aromáticas Medicinales	6
2.2 Planta de Hierba Luisa	7
2.2.1 Otros nombres comunes	7
2.2.2 Aspectos Taxonómicos	8
2.2.3 Sinónimos	9
2.2.4 Origen y Distribución	9
2.2.5 Identificación de la especie	9

CAPITULO	PAG.
2.2.6 Descripción botánica	10
2.2.7 Ciclo de vida	13
2.2.8 Clima	13
2.2.9 Distribución geográfica	14
2.2.10 Propagación	14
2.2.11 Suelos	15
2.2.12 Cultivo	16
2.2.13 Usos y potencial económico	19
2.2.14 Especies de hierba luisa en el Ecuador	20
2.2.14.1 Cantón Pedro Vicente Maldonado	21
2.2.14.1.1 Descripción de la zona	21
2.3 Aceites Esenciales	24
2.3.1 Partes de la planta donde se encuentran	24
2.3.2 Funciones en el vegetal	25
2.3.3 Propiedades	25
2.3.4 Rendimientos	26
2.3.5 Características físicas	26
2.3.6 Composición química	27
2.3.7 Obtención y Almacenamiento	29
2.3.7.1 Destilación	29
2.3.7.2 Expresión en frío	29
2.3.7.3 Enfleurage	30
2.3.7.4 Extracción con solvente	30
2.3.8 Pureza de los Aceites Esenciales	30
2.3.9 Uso de los Aceites Esenciales	31
2.3.10 Normalización de los Aceites Esenciales	31
2.3.11 Los Aceites Esenciales Naturales y la Aromaterapia	32
2.3.11.1 Formas de usarlos	33
2.3.11.2 Precauciones	34
2.4 Aceite Esencial de Hierba Luisa	35
2.4.1 Características físicas del aceite esencial	36
2.4.2 Propiedades del aceite esencial de hierba luisa	36
2.4.3 Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa	37
2.4.4 Duración del aceite esencial	40
2.4.5 Usos del aceite esencial de hierba luisa	41
2.4.6 Importancia Económica	42

CAPITULO III.

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCESOS

3.1 Destilación	43
3.1.1 Destilación por Arrastre con Vapor:	44
3.1.2 Extracción de Aceites Esenciales:	44
3.2 Características Organolépticas	46

CAPITULO	PAG.
3.2.1 Determinación de las características organolépticas de los Aceites Esenciales	46
3.3 Densidad	47
3.3.1 Determinación de la densidad de un líquido	48
3.3.2 Medición de la densidad relativa de los Aceites Esenciales	48
3.3.2.1 Picnómetro	48
3.4 Índice de Refracción	50
3.4.1 Determinación del Índice de Refracción	51
3.4.2 Medición del Índice de Refracción de los Aceites Esenciales	53
3.4.2.1 Refractómetro	53
3.5 Potencial de Hidrógeno (pH)	54
3.5.1 Determinación del pH de las sustancias	55
3.5.2 Medición del pH de los Aceites Esenciales	56
3.5.2.1 Peachímetro	56
3.6 Espectroscopia de Infrarrojo	57
3.6.1 Características de un espectro Ir	57
3.6.1.1 Vibración Molecular	58
3.6.1.2 Absorción de Energía	59
3.6.2 Medición del espectro IR de los Aceites Esenciales	59
3.6.2.1 Espectrofotómetro de transformada de Fourier (IR-TF)	60
3.7 Caracterización de grupos funcionales (coloración)	62
3.7.1 Presencia de grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas	63
3.7.2 Presencia del grupo carbonilo de aldehído	64
3.7.2.1 Prueba de Tollens	64
3.7.2.2 Prueba de Fehling	65
3.7.3 Presencia de Esteres	66
3.7.4 Presencia de Fenoles	66
3.7.5 Presencia de Insaturaciones (dobles enlaces)	66
3.8 Determinación de patógenos en una muestra	67
3.8.1 Aerobios totales	68
3.8.2 Mohos	69
3.8.3 Levaduras	69
3.9 Determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del Aceite Esencial	70
3.9.1 Método Valoración de Desinfectantes Método AOAC	70
3.9.2 Bacterias, Levaduras y Hongos ATCC	71
3.9.2.1 The American Type Culture Collection (ATCC)	71
3.9.2.2 Bacterias ATTCC	71
3.9.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	71
3.9.2.2.1.1 Clasificación científica:	71
3.9.2.2.1.2 Localización:	72

CAPITULO	PAG.
3.9.2.2.1.3 Utilización:	72
3.9.2.2.1.4 Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i>	73
3.9.2.2.1.5 <i>E.coli</i> ATCC 25922	73
3.9.2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	74
3.9.2.2.2.1 Clasificación científica:	74
3.9.2.2.2.2 Localización	74
3.9.2.2.2.3 Cepas patógenas <i>Staphylococcus aureus</i>	75
3.9.2.2.2.4 <i>S.aureus</i> ATCC 6538	75
3.9.2.3 Levaduras y Hongos ATCC	76
3.9.2.3.1 <i>Candida albicans</i>	76
3.9.2.3.1.1 Clasificación científica:	76
3.9.2.3.1.2 Localización	76
3.9.2.3.1.3 Cepas Patógenas <i>Candida albicans</i>	77
3.9.2.3.1.4 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	77
3.9.2.3.2 <i>Aspergillus niger</i>	77
3.9.2.3.2.1 Clasificación científica	77
3.9.2.3.2.2 Cepas Patógenas <i>Aspergillus niger</i>	78
3.9.2.3.2.3 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	78

CAPITULO VI.

METODOLOGÍA

4.1 Tipo de Investigación	79
4.2 Muestra	79
4.3 Materiales	80
4.3.1 Reactivos y Medios de Cultivo	80
4.3.2 Microorganismos	81
4.3.3 Materiales	81
4.3.4 Equipos	82
4.4 Procedimiento Experimental	82
4.4.1 Extracción del Aceite Esencial por HD	83
4.4.2 Características organolépticas del Aceite Esencial	84
4.4.3 Determinación de la densidad del Aceite Esencial	85
4.4.4 Determinación del Índice de Refracción del Aceite Esencial	86
4.4.5 Determinación del pH del Aceite Esencial	87
4.4.6 Medición del espectro IR del Aceite Esencial	88
4.4.7 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial mediante pruebas de coloración	89
4.4.7.1 Presencia de grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas (Prueba de Brady)	89
4.4.7.2 Presencia del grupo carbonilo de aldehído:	90
4.4.7.2.1 Prueba de Tollens	90
4.4.7.2.2 Prueba de Fehling	91
4.4.7.3 Presencia de Esteres	91

CAPITULO	PAG.
4.4.7.4 Presencia de Fenoles	92
4.4.7.5 Presencia de Insaturaciones (Prueba de Bayer)	93
4.4.7.6 Presencia de compuestos aromáticos (triterpenos)	94
4.4.8 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial	94
4.4.8.1 Preparación de la muestra:	95
4.4.8.2 Prueba para determinar aerobios totales, mohos y levaduras	95
4.4.8.3 Prueba para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	96
4.4.9 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial	97
4.4.9.1 Fase de adaptación de los microorganismos	97
4.4.9.2 Fase de crecimiento de los microorganismos	99
4.4.9.3. Prueba para determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de Aceite Esencial	100

CAPITULO V.

RESULTADOS

5.1 Rendimiento del aceite esencial extraído:	103
5.1.1 Cálculos	104
5.2 Características Organolépticas del aceite esencial de hierba luisa:	105
5.3 Densidad, Índice de Refracción y pH del aceite esencial de hierba luisa	106
5.3.1 Cálculos	107
5.4 Espectro IR del aceite esencial de hierba luisa	108
5.5 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial mediante pruebas de coloración	110
5.6 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial	114
5.7 Prueba para determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de Aceite Esencial	115

CAPITULO VI.

DISCUSIÓN

Discusión	119
-----------	-----

CAPITULO VII.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones	121
7.2 Recomendaciones	122
BIBLIOGRAFIA	124

CAPITULO		PAG.
ANEXOS		144
	GRÁFICOS	
No.	GRÁFICO	Págs.
2.1	Plantación de la hierba luisa	7
2.2	Planta de hierba luisa	10
2.3	Raíz de la hierba luisa	11
2.4	Tallo de la hierba luisa	12
2.5	Hoja de la hierba luisa	12
2.6	Flor de la hierba luisa	12
2.7	Planta de hierba luisa de Ecuador	20
2.8	Mapa del Cantón Pedro Vicente Maldonado	21
2.9	Difusor de aceites esenciales y botellas con aceites esenciales	24
2.10	Fórmula Estructural del Isopreno	28
2.11	Aromaterapia y los Aceites Esenciales	32
2.12	Aceite Esencial de hierba luisa	35
2.13	Fórmula Estructural del Citral	37
2.14	Fórmula Estructural del Geraniol	38
2.15	Fórmula Estructural del Nerol	38
2.16	Fórmula Estructural del Farnesol	38
2.17	Fórmula Estructural del Citronelol	39
2.18	Fórmula Estructural del Linalool	39
2.19	Fórmula Estructural del Citronelal	39
2.20	Fórmula Estructural del Limoneno	40
2.21	Fórmula Estructural del Mirceno	40
3.1	Equipo para destilación de Aceites Esenciales	45
3.2	Características Organolépticas del Aceite de Lemongrass	47
3.3	Picnómetro de 10ml con Aceite Esencial (20°C)	49
3.4	Refractómetro de ángulo límite (20°C)	53
3.5	Campo Ocular del Refractómetro	54
3.6	Campo de Escala del Refractómetro	54
3.7	Peachímetro con el electrodo introducido en Aceite Esencial	56
3.8	Espectro IR de una muestra	58
3.9	Espectrofotómetro IR-TF	60
3.10	Esquema de un interferómetro de Michelson	61
3.11	Diagrama de Flujo del Espectrofotómetro de transformada de Fourier IR-TF	62
3.12	Pruebas de Coloración para Aceites Esenciales	63
3.13	Reacciones para la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona	64
3.14	Reacciones para la reducción de la plata	65
3.15	Reacciones para la formación de un comolejo cupro-tartárico	65
3.16	Reacciones para la formación de ác. hidroxámico	66
3.17	Reacciones para la formación del complejo Fenol-Fe ³⁺	66
3.18	Reacciones para la formación de 1,2-diol	67
3.19	Colonias de aerobios totales en caja petri (22°C)	68
3.20	Colonia de moho en caja petri	69
3.21	Colonias de levadura en caja petri	69

No.	GRÁFICO	Págs.
3.22	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	73
3.23	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	75
4.1	Diagrama de Flujo del proceso de extracción de aceite esencial de hierba luisa por HD	84
4.2	Diagrama de Flujo del proceso para determinar las características organolépticas del aceite esencial de hierba luisa	85
4.3	Diagrama de Flujo del proceso para determinar la densidad relativa del aceite esencial de hierba luisa	86
4.4	Diagrama de Flujo del proceso para determinar el índice de refracción del aceite esencial de hierba luisa	87
4.5	Diagrama de Flujo del proceso para determinar el pH del aceite esencial de hierba luisa	87
4.6	Diagrama de Flujo del proceso para obtener el espectro IR del aceite esencial de hierba luisa	88
4.7	Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído y cetona en el aceite esencial de hierba luisa	89
4.8	Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído en el aceite esencial de hierba luisa	90
4.9	Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído en el aceite esencial de hierba luisa	91
4.10	Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de esterés en el aceite esencial de hierba luisa	92
4.11	Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de fenoles en el aceite esencial de hierba luisa	93
4.12	Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de insaturaciones en el aceite esencial de hierba luisa	93
4.13	Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de compuestos aromáticos en el aceite esencial de hierba luisa	94
4.14	Diagrama de Flujo del proceso para determinar patógenos en el aceite esencial de hierba luisa	96
4.15	Diagrama de Flujo del proceso para determinar patógenos en el aceite esencial de hierba luisa	97
4.16	Diagrama de Flujo de la fase de adaptación de los microorganismos	98
4.17	Diagrama de Flujo de la fase de crecimiento de los microorganismos	100
4.18-a	Diagrama de Flujo para determinar la actividad del aceite esencial	102
4.18-b	Diagrama de Flujo para determinar la actividad del aceite esencial	102

TABLAS

No.	TABLA	Págs.
2.1	Análisis Bromatológico de la hierba luisa	10
2.2	Partes de la planta de hierba luisa	11
2.3	Cultivo de hierba luisa	16
2.4	Descripción del Cantón Pedro Vicente Maldonado	22
2.5	Composición química de los Aceites Esenciales	27
2.6	Composición química del Aceites Esenciales de Hierba Luisa	37
3.1	Índice de Refracción de ciertas sustancias	52
3.2	Escala para determinar el pH de una sustancia	55
4.1	Recolección de la planta de hierba luisa	79
5.1	Rendimiento del aceite esencial de hierba luisa	103
5.2	Características Organolépticas del aceite esencial de hierba luisa	105
5.3	Densidad, Índice de Refracción y pH del aceite esencial de hierba luisa	106
5.4	Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial de hierba luisa	110
5.5	Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial de hierba luisa	114
5.6	Determinación de la actividad antibacteriana del Aceite Esencial de hierba luisa contra <i>E. coli</i>	115
5.7	Determinación de la actividad antibacteriana del Aceite Esencial de hierba luisa contra <i>S. aureus</i>	116
5.8	Determinación de la actividad antimicótica del Aceite Esencial de hierba luisa contra <i>C. albicans</i>	117
5.9	Determinación de la actividad antimicótica del Aceite Esencial de hierba luisa contra <i>A. niger</i>	118

ANEXOS

- No. ANEXO
- A.1 Esquema de la formación del PPI y su isomerización a PPDMA.**
- B.1 Esquema de la biosíntesis de los terpenos**
- C.1 Sembrío de la planta de hierba luisa**
- C.2 Fotografías del proceso HD**
- C.3 Fotografías del proceso para determinar las características organolépticas**
- C.4 Fotografías del picnómetro con aceite esencial para determinar la densidad relativa:**
- C.5 Fotografías del refractómetro con aceite esencial para determinar el índice de refracción**
- C.6 Fotografías del Peachímetro con aceite esencial para determinar el índice de refracción**
- C.7 Fotografías del Espectrofotómetro IR-TF con aceite esencial para obtener el espectro IR del aceite esencial**
- C.8 Espectro IR del aceite esencial de hierba luisa**
- C.9 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial mediante pruebas de coloración**
- C.9.1 Presencia de grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas (Prueba de Brady)**
- C.9.2 Presencia del grupo carbonilo de aldehído:**
- C.9.2.1 Prueba de Tollens**
- C.9.2.2 Prueba de Fehling**
- C.9.3 Presencia de Esteres**
- C.9.4 Presencia de Fenoles**
- C.9.5 Presencia de Insaturaciones**
- C.9.6 Presencia de compuestos aromáticos (triterpenos)**
- C.10 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial**
- C.10.1 Preparación de la muestra**
- C.10.2 Presencia de Aerobios Totales**
- C.10.3 Presencia de Mohos y Levaduras**
- C.10.4 Presencia de *S. aureus***
- C.10.5 Presencia de *E. coli***
- C.11 Prueba para determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de Aceite Esencial:**
- C.11.1 Controles**
- C.11.2 Resultado de la actividad del aceite esencial**
- C.11.2.1 Bacteria *E. coli* ATCC 25922**
- C.11.2.2 Bacteria *S. aureus* ATCC 6538**
- C.11.2.3 Levadura *C. albicans* ATCC 10231**
- C.11.2.4 Hongo *A. niger* ATCC 16404**
- D.1 Mapa del Cantón Pedro Vicente Maldonado**

- No. ANEXO
- E.1 Absorciones de grupos funcionales en el I.R.**
- E.1.1 Hidrocarburos**
 - E.1.2 Alcanos**
 - E.1.3 Alquenos**
 - E.1.4 Alquinos**
 - E.1.5 Aromáticos**
 - E.1.6 Alcoholes**
 - E.1.7 Aminas**
 - E.1.8 Compuestos Carbonílicos**
 - E.1.9 Aldehídos**
 - E.1.10 Cetonas**
 - E.1.11 Ácidos**
 - E.1.12 Esteres**
- F.1 Preparación de los reactivos para las pruebas de coloración**
- F.1.1 Preparación de 2,4—dinitrofenilhidrazonas**
 - F.1.2 Preparación de la solución de KMnO_4**
 - F.1.3 Preparación del reactivo de Tollens**
 - F.1.4 Preparación del Reactivo de Fehling**
- G.1 Preparación de los medios de cultivos para las pruebas microbiológicas**
- G.1.1 EMB (Medio de cultivo Eosin methylene Blue agar)**
 - G.1.2 SAB (Medio de cultivo Agar Sabouraud dextrosa)**
 - G.1.3 TAT (Medio de cultivo Tryptone-Azolectin-Tween)**
 - G.1.4 TSA (Medio de cultivo Agar con Soja Trípica)**
 - G.1.5 TSB (Medio Caldo Trypticasa Soya)**
 - G.1.6 VJ (Medio de cultivo Agar Vogel y Jonson)**
- H.1 Generalidades**
- H.2 Materiales**
- H.3 Preparación de las Soluciones**
- H.3.1. Acido Sulfúrico 1%**
 - H.3.2. Cloruro de Bario 1%**
- H.4 Procedimiento**
- I.1 Análisis de la composición química de aceite esencial (Hierba Luisa)**

RESUMEN

El aceite esencial es el producto del metabolismo secundario de las plantas, muy utilizado en el campo de la industria. El objetivo de este proyecto fue extraer, caracterizar y determinar la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). El aceite esencial fue extraído de las hojas de la planta empleando la técnica de destilación por arrastre con vapor, para la caracterización del aceite esencial se lo analizó física, química y microbiológicamente. Las pruebas para comprobar la actividad antimicrobiana se las hizo contra las cepas *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404 utilizando el método descrito de la AOAC (915.12) para valoración de desinfectantes. Los resultados indicaron que el aceite esencial conservó sus características organolépticas después de la extracción por varios meses. El aceite esencial presento actividad antimicrobiana, siendo mayor la actividad antimicótica que la antibacteriana.

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial/hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)/extracción/caracterización/actividad antibacteriana/actividad antimicótica.

ABSTRACT

The essential oil is the product of the secondary metabolism of the plants, very used in the field of the industry. The objective of this project was to extract, to characterize and to determine the antibacterial and antimicotic activity of the essential oil of hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). The essential oil was extracted of the leaves of the plant having used the technique of distillation by drag with steam, for the characterization of the essential oil analyzed physics, chemistry and microbiologically. The tests to verify the antimicrobial activity became them against the stocks *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 6538, *Candida* 10231 *albicans* ATCC and *Aspergillus Niger* ATCC 16404 using the described method of the AOAC (915.12) for valuation of disinfectants. The results indicated that the essential oil conserved its organolépticas characteristics after the extraction by several months. The essential oil I present/display antimicrobial activity, being greater the antimicotic activity than the antibacterial one.

KEY WORDS: Essential oil/grass luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) /extract/characterize/antibacterial activity/antimicotic activity.

INTRODUCCIÓN

Ecuador posee una gran variedad de recursos de flora identificadas y que si se los aprovecharía industrialmente se obtendrían muy buenos resultados; impulsando el desarrollo del país como productor de bienes naturales ya sea para consumo interno o de exportación. En el país existen 500 especies de plantas medicinales, de las cuales cerca de 125 son muy comercializadas.⁷²

En la actualidad se están promoviendo proyectos agroindustriales orientados al uso racional de los recursos naturales de flora y fauna para la obtención de productos naturales, así es el caso de los aceites esenciales que están desplazando a los productos sintéticos.

Las plantas medicinales poseen en sus órganos sustancias que son usadas terapéuticamente. Sus principios activos están constituidos total o parcialmente por aceites esenciales.⁷²

Una planta medicinal aromática que posee grandes propiedades medicinales, es la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), la cual es empleada en diferentes medicamentos gracias a su actividad analgésica, antiasmática, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana, toxicidad, entre otras.

La hierba luisa es cultivada en numerosos países del mundo para la obtención de su aceite esencial, el cual es conocido por sus múltiples usos. El aceite esencial posee como componente principal el citral, que tiene un alto poder antibacteriano y antimicótico, además de otras aplicaciones en las industrias de: perfumería, farmacéutica, alimentos, entre otras. El aceite esencial de hierba luisa es muy usado en la industria de la aromaterapia, por las características que este posee como: antiinflamatoria, antirreumático y repelente contra mosquitos.^{1,54,115,124}

El aceite esencial de hierba luisa posee un color amarillo y un olor muy parecido al limón. Este se encuentra presente en las hojas de la planta, dentro del tejido foliar.⁵⁴

La técnica más utilizada para extraer aceite esencial es por arrastre con vapor ya que se obtiene aceite esencial de buena calidad que conserva sus propiedades organolépticas, físico - químicas.^{18,81,89}

El presente proyecto tiene dos objetivos principales, el primero es desarrollar un proceso experimental adecuado para extraer el aceite esencial de la hierba luisa de manera eficiente sin alterar sus características organolépticas* y su actividad antimicótica* y antibacteriana. Como segunda parte del proyecto se va a evaluar mediante pruebas microbiológicas la actividad antibacteriana y antimicótico que el aceite esencial de hierba luisa posee.

* **Características Organolépticas:** Son un conjunto de cualidades detectables por los sentidos: color, olor y sabor, indicativos primarios de la calidad de un producto.⁵⁸

* **Antimicótico:** Combate las infecciones causadas por hongos.⁸⁴

Una vez establecidos los procesos experimentales para la extracción, caracterización y aplicación del aceite esencial como antibacteriano y antimicótico, se pretende comercializarlo. Hay que tomar en consideración que el aceite esencial de hierba luisa al ser un compuesto natural no produce daños en el medio ambiente.

CAPITULO I. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Obtener aceite esencial a partir de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), para su aplicación como antibacteriano y antimicótico.

1.2 Objetivos Específicos

- Realizar un proceso de extracción que no altere las características del aceite esencial, mediante la identificación de los procesos químicos implícitos en la obtención del aceite esencial de hierba luisa.
- Caracterizar el aceite esencial de hierba luisa.
- Determinar si el aceite esencial de hierba luisa tiene propiedades antibacterianas y antimicóticas para utilizarlo como desinfectante.

Para alcanzar los objetivos planteados, se empleó la técnica de destilación por arrastre con vapor para extraer el aceite esencial, para la caracterización del aceite

esencial se lo analizó física, química y microbiológicamente. Las pruebas realizadas para comprobar la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial se las hizo con diversas cepas ATCC de bacterianas, levaduras y hongos, utilizando el método descrito de la AOAC (915.12) para valoración de desinfectantes.

1.3 DATOS

Los datos obtenidos se los dividió en dos para realizar la parte estadística:

1.3.1 Valores con datos numéricos.

1.3.1.1 Control del proceso de extracción y del producto

1.3.1.1.1 Rendimiento del proceso: cantidad de hojas (gr.) y cantidad de aceite extraído (ml).

1.3.1.1.2 pH

1.3.1.1.3 Densidad relativa

1.3.1.1.4 Índice de refracción

1.3.1.1.5 Número de bacterias y hongos que pueden estar presentes en el aceite esencial.

1.3.2 Valores sin datos numéricos

1.3.2.1 Control del proceso de extracción y del producto

1.3.2.1.1 Olor

1.3.2.1.2 Color

1.3.2.1.3 Pruebas de coloración para determinar grupos funcionales (positivo/negativo)

1.3.2.1.4 Presencia de patógenos (positivo/negativo) por ausencia/presencia.

1.3.2.2 Determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite

1.3.2.2.1 Determinación del crecimiento de los distintos microorganismos frente al aceite esencial de hierba luisa (positivo o negativo).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas Aromáticas Medicinales

Las últimas cuatro décadas se han caracterizado por el renacimiento de una cultura naturalista científicamente fundamentada, que incluye tanto la actividad agropecuaria como la médica. Surge una revalorización en el uso y producción de las plantas medicinales, tanto en estado natural, como de las sustancias y productos elaborados a partir de ellas. La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana y antimicótica, en fuentes como las plantas superiores, es importante para encontrar

alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos.^{14,96}

La medicina tanto tradicional como natural forman parte importante de cada país y región del mundo con características propias, dependiendo de los recursos disponibles en ellos, y teniendo en cuenta la idiosincrasia* de sus habitantes.⁹⁵

Diversas [instituciones](#) han prestado [atención](#) a la elaboración de [productos](#) naturales en el país, con variadas orientaciones respecto a las materias primas, usos y localización de las [plantas](#) industriales. Dentro de esta gama de [productos](#) naturales se encuentran los aceites esenciales que tienen una creciente [demanda](#) en el [mercado](#) internacional y pueden proporcionar [ingresos](#) tanto a los agricultores como a los productores.

Entre las plantas reconocidas por sus comprobadas propiedades medicinales se encuentra el cultivo de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf), cuya importancia se centra en la obtención de aceite esencial, el cual es rico en citral, y presentan varias propiedades entre ellas que es antibacteriano y antimicótico.⁹⁵

2.2 Planta de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (D.C) Staff)

* Idiosincrasia: Cualidad del carácter y temperamento de cada individuo, por la cual se distingue de los demás.⁵⁷



Gráfico 2.1 Plantación de hierba luisa

FUENTE:62

2.2.1 Otros Nombres comunes:

- En Ecuador se la conoce con los nombres de hierba luisa, yerba luisa.¹
- En la Amazonía se la conoce como patchuli falso.¹⁰⁹
- En Cuba se la conoce con los nombres vulgares de caña santa, cañita de limón, hierba de calentura, lemongrass, hierba limón, cañuela de limón, cañita santa, yerba de la calentura, yerba de limón.⁸⁹
- En Estados Unidos, Antillas Francesas y las Antillas Inglesas se la conoce con los nombres de lemongrass, limoncillo, matojo de limón, chiendent citronnelle, nest indian lemongrass.⁸⁹
- En México, [Costa Rica](#), Honduras, Nicaragua y [Guatemala](#) se la conoce con los nombres de zacate limón, té de limón, zacatelimón y zacate té.^{3,63,109}

- En Panamá se la conoce como hierba de limón y paja de limón.³
- En [Venezuela](#) y República Dominicana se la conoce con los nombres de limoncillo, pasto limón, hierba de limón, grama de limón, citronela, lemongrás, limonera, pasto cedrón, cañita de malojillo, malojillo criollo, limonaria y lemongrass.^{89,109}
- En Colombia y la Guayana se la conoce como limoncillo, limonera, zorra de limón, vergata, belgata,^{2,3,63,89}

2.2.2 Aspectos taxonómicos

La Dra. Rafaela Soto en su estudio de la hierba luisa la clasifica de la siguiente manera:

Reino: *Cormobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliatae (Liliopsida)*

Sub-clase: *Commelinidae*

Orden: *Cyperales*

Familia: *POACEAE (Gramíneas).*

Género: *Cymbopogon Spreng.*

Especie: *citratus Stapf*

2.2.3 Sinónimos:

Andropogon citratus D.C. ^{86,95,109}

2.2.4 Origen y Distribución:

La hierba luisa es originaria de la India, regiones de Asia Suroriental y África ecuatorial. Se encuentra distribuida en zonas tropicales, subtropicales y templadas. ^{62,63,86,95,96,109}

2.2.5 Identificación de la especie

Antiguamente existía confusión sobre la taxonomía de las plantas de las Indias Orientales y de las Indias Occidentales, productoras del aceite esencial denominado lemongrass.

Pero todo esta confusión finaliza cuando el científico Stapf, identifica a la planta de las Indias Orientales como *Cymbopogon flexuosus* y a la de las Indias Occidentales como *Cymbopogon citratus*. ^{86,96}

2.2.6 Descripción botánica:



Gráfico 2.2 Planta de hierba luisa.

FUENTE: 86

La hierba luisa es una planta herbácea*, muy vigorosa.

Su tamaño es mediano, la altura máxima a la cual la planta llega es de 1.50m hasta 2m con un diámetro de 5cm., y posee de 40 a 50 hijos.^{62,86,96}

Según lo descrito por la Dra. Rafaela Soto, en un análisis bromatológico* realizado a la hierba luisa se cuantificó su composición, y se obtuvieron los datos descritos en la tabla 2.1:

Tabla 2.1 Análisis Bromatológico de la hierba luisa

CARACTERISTICA	%
- Materia seca:	93.19%
- Materia orgánica:	86.07%
- Nitrógeno total:	0.96%
- Proteína cruda:	6.03%
- Cenizas:	7.12%

* **Planta herbácea:** Son plantas cuyas partes aéreas son blandas, y no poseen un tallo leñoso (un tronco).⁶⁴

* **Análisis Bromatológico:** Es un estudio realizado a las plantas utilizadas para elaborar alimentos en el cual se cuantifica su composición. Esta información es básica para planificar el suplemento de sales y minerales.¹⁰⁸

CARACTERISTICA	%
- Fibra cruda:	29.45%
- Carbohidratos solubles:	2.99%
- Calcio:	0.41%
- Fósforo:	0.22%

ELABORADO POR: Autora

FUENTE:95

En la tabla 2.2 se encuentra la descripción de las partes de la planta de hierba luisa:

Tabla 2.2 Partes de la planta de hierba luisa


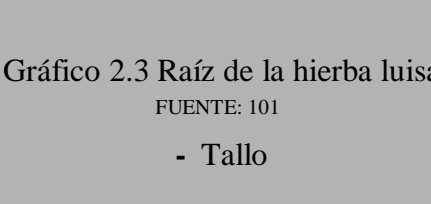

PARTE	DESCRIPCIÓN
- Raíz 	<p>La hierba luisa posee una raíz corta, muy ramificada. Estudios realizados han determinado que la mayor cantidad de raíces se encuentran en el suelo a una profundidad de 0.30cm.</p>
- Tallo 	<p>Posee una forma cilíndrica, es fuerte y corto. Su color es verde, cuando la planta es cortada, este se torna café rojizo.</p>

Gráfico 2.3 Raíz de la hierba luisa

FUENTE: 101

PARTE	DESCRIPCIÓN
 <p data-bbox="272 786 721 819">Gráfico 2.4 Tallo de la hierba luisa</p> <p data-bbox="437 828 555 853">FUENTE: 24</p> <p data-bbox="445 871 547 904">- Hojas</p>	<p data-bbox="770 871 1369 1854"> Son de color verde oscuros, poseen una vaina tubular la cual envuelve al tallo, encontrándose agrupadas cerca de la base. Tienen los bordes ásperos llenos de cerdas (parecidos al filo de un serrucho), que al manipular la planta cortan. El largo de las hojas va de 60cm. a 1m, y el ancho de (0.01 a 0.02)m, estas dimensiones varían con cada estación climática. Las hojas poseen un fuerte olor a limón, ya que en el lado central del mesófilo y entre los haces vasculares se encuentran las células donde se almacena el aceite esencial, el cual es rico en citral. </p>
 <p data-bbox="272 1771 721 1805">Gráfico 2.5 Hoja de la hierba luisa</p> <p data-bbox="437 1814 555 1839">FUENTE: 39</p>	<p data-bbox="770 1899 1369 2004"> Las células epidérmicas de las hojas poseen sílice, el cual puede causar úlceras. </p>

PARTE	DESCRIPCIÓN
<p data-bbox="456 309 539 338">- Flor</p>  <p data-bbox="277 795 715 824">Gráfico 2.6 Flor de la hierba luisa</p> <p data-bbox="434 837 555 860">FUENTE: 92</p>	<p data-bbox="772 309 1366 703">Esta planta generalmente no tiende a florecer, cuando lo hace es por que ha crecido en un clima propicio y no ha sido cortada en varios años. Las flores se encuentran sostenidas en el tallo, en varios racimos</p>

ELABORADO POR: Autora

FUENTE:38,62,63,86,95,96,109

2.2.7 Ciclo de vida:

El [ciclo de vida](#) de la hierba luisa va alrededor de cuatro a cinco años. En la bibliografía se puede encontrar datos que hacen referencia a ciclos de vida de más de 10 años, esto depende de las condiciones en las cuales esta creciendo la planta. ^{1,4,11,12,95}

2.2.8 Clima:

La hierba luisa crece en climas templados y cálidos. Requiere para su crecimiento la presencia de luz. Es resistente a las severidades del invierno, ya que soporta lluvias pero no en exceso. No tolera las nieblas. ^{4,12,62,86,95, 96}

La cantidad de aceite esencial de planta varía de mes en mes en el año, siendo los meses de junio, julio y agosto los que mas aceite esencial produce la planta. Esto se

debe principalmente a que el calor, el sol y la humedad climática de estos meses hacen que la planta acumule mas aceite esencial, mientras que en épocas donde la presencia de lluvia es constante el rendimiento de aceite disminuye, debido a que la planta llena de agua sus células para protegerse del mal tiempo.^{95,96}

Unas de las causas principales para que este cultivo varié en su producción son los factores ambientales (condiciones climáticas, nutricionales y otros), los cuales afectan directamente en la expresión de los genes responsables de la producción de los principios activos.^{86,95,96}

2.2.9 Distribución geográfica

La hierba luisa se encuentra cultivada en regiones subtropicales y tropicales. Esta planta crece desde el nivel del mar hasta alturas de 3000 m.^{7,12,38,95}

La hierba luisa se encuentra en jardines, huertos caseros, plantaciones de hierbas medicinales. En algunas zonas de la Costa y el Oriente Ecuatoriano la encontramos en grandes cantidades. Se la comercializa en todos los mercados del país.^{7,12,86}

2.2.10 Propagación

La hierba luisa se propaga por división de matas, debido a que la obtención de sus semillas es muy difícil, ya que la planta no florece en la mayoría de zonas en el mundo.

Las matas son extraídas de las plantas madres que tengan uno o dos años de edad, y se le recorta la parte aérea y las raíces.^{86,96}

Las nuevas madres van a dar una producción de 40 a 70 hijos en período de alrededor de 10 meses a un año de ser plantadas.^{62,86,96}

2.2.11 Suelo:

La hierba luisa crece en terrenos arenosos-arcillosos con adecuado drenaje y profundidad. Datos encontrados en la bibliografía, indican que la hierba luisa también puede crecer en suelos ligeramente arenosos.⁹⁵

La hierba luisa es una planta muy resistente, razón por la cual se la encuentra en suelos de buena calidad, como abono verde en suelos infértiles, en pendientes montañosas, en suelos arenosos, en suelos ligeramente ácidos. Pero la producción de aceite esencial de esta planta se da en suelos arenosos-arcillosos.^{62,95}

Un dato muy interesante encontrado en la bibliografía, indica que la hierba luisa cultivada en suelos con pH de 7.5 posee un alto rendimiento de cultivo y aceite esencial, mientras que la hierba luisa cultivada en suelos con pH de 4.8 posee bajos rendimientos.^{38,95,96}

Se debe preparar el suelo 40 días antes de la plantación, ya que este debe estar en condiciones óptimas para el buen crecimiento de la planta, para lo cual se debe realizar las siguientes actividades:

- Labrar la tierra (profundidad de 30cm.), para facilitar el crecimiento de las raíces.
- Limpieza del suelo de todas malezas, para que estas no afecten el crecimiento del nuevo cultivo.
- Realizar un riego periódico, para que el suelo cuente con las condiciones óptimas para el crecimiento del nuevo cultivo.
- Surcar el suelo.
- Colocar una correcta cantidad de abono con productos tales como: estiércol bien fermentado, azufre. ^{38,62,96}

2.2.12 Cultivo:

En la tabla 2.3 se encuentran todos los pasos que se deben seguir para realizar un cultivo de hierba luisa:

Tabla 2.3 Cultivo de hierba luisa

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
- Plantación	Para realizar la plantación de la hierba luisa se deben tomar en cuenta alguno aspectos importantes tales como: época de plantación, adecuado uso de la radiación solar, evitar la

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
<p>- Labores de cultivo</p>	<p>presencia de malezas, la conservación del agua y del suelo, fertilidad del suelo, entre otros.</p> <p>La plantación de la hierba luisa se realiza a mano colocando en cada hoyo del suelo de 1 a 3 hijos, posteriormente se coloca tierra hasta cubrir la raíz. En la bibliografía se encuentran varios datos de la distancia que se debe guardar entre planta y planta, siendo la distancia promedio de (50x90)cm. La época de plantación depende de la zona donde la planta de hierba luisa va a ser cultivada.</p> <p>Las labores de cultivo se las hace a los 20 a 25 días después de realizada la plantación, y posteriormente cada quincena.</p> <p>Esta actividad tiene la finalidad de controlar el crecimiento de malezas en los cultivos de hierba luisa, ya que estas hacen que el crecimiento de la planta disminuya.</p> <p>Fertilizar orgánicamente el cultivo ya que necesita nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica para su adecuado crecimiento, previamente se debe hacer una limpieza de maleza.</p> <p>Si en la zona donde se encuentra sembrada la planta no llueve, se debe regar la planta con agua potable si es posible. El riego se lo debe hacer constantemente, ya que así la planta crecerá más rápido y en correctas condiciones, evitando que se produzca un envejecimiento de las hojas acelerado. La hierba</p>

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
- Cosecha	<p>luisa no se ve afectada de manera significativa por plagas y enfermedades.</p> <p>La recolección de la hierba luisa suele realizarse en cualquier época del año. Se cortan con un machete las hojas a no menos de 10cm. de la superficie del suelo, para permitir la reparación del follaje. La planta está lista para ser cortada cuando empieza a envejecer, mostrando como característica la punta de las hojas de color pardo amarillenta y el tallo un color rojizo. Cuando la planta tiene de ocho meses a un año de edad se debe cortar solo una vez, en los siguientes años, se realizan de dos a cuatro cortes, cada tres o cuatro meses. Siempre la cosecha se la realiza a las primeras horas de la mañana, esto es entre 5 a 6 de la mañana.</p>
- Poscosecha	<p>Una vez cosechadas a las hojas de hierba luisa, se les realiza el control de calidad, es decir, se les examina retirando aquellas que presentan envejecimiento, manchas, huecos debido a que han sido atacadas por insectos, posteriormente las hojas son lavadas y llevadas al lugar donde van a ser almacenadas, el cual debe ser oscuro, tener aireación y baja humedad. Dichas condiciones evitar el deterioro de la planta en forma rápida.</p> <p>La planta tendrá varios destinos, puede ser usada entera para procesos de elaboración de medicamentos, para la extracción de su aceite esencial en alambiques a vapor de agua o a fuego</p>

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN
	<p>directo.</p> <p>La destilación se la realiza con las hojas enteras o picadas en trozos pequeños. El tiempo que tarda el proceso de destilación es de dos horas cuando se utiliza arrastre de vapor y dos horas y media cuando se realiza a fuego directo.</p>
<p>ELABORADO POR: Autora</p>	<p>FUENTE:38,62,86,95,96</p>

2.2.13 Usos y potencial económico:

La hierba luisa es muy usado como planta medicinal, entre las propiedades reconocidas tenemos: antihipertensivo, antiespasmódico, antiasmático, antimicótico, antibacteriano, anticitarral, antifebril, carminativo*, diaforético*, expectorante, ansiolítico, antipalúdico, analgésico, sirve para aliviar el vómito, la tos, ayuda a disminuir el colesterol.^{60,63,86,89,95}

Se utilizan las hojas de la hierba luisa como medicamento casero, ya que forma parte de las comúnmente conocidas “agüitas de vieja”.

El tallo de la hierba luisa es usado como cepillo de dientes, ya que al frotarlo contra estos hace que se tornen blancos y evita el crecimiento de caries, por las propiedades antes mencionadas que esta planta posee, resultados que se pueden ver después de una semana de su uso.¹⁰⁹

* **Carminativo:** Son agentes que previenen la formación de gases, ayudan a expulsarlos, y evitan los cólicos.⁴⁰

* **Diaforético:** Es el medicamento que se utiliza para hacer sudar al paciente.⁴¹

Uno de los usos más relevantes de la hierba luisa para el presente proyecto es la actividad biológica que presenta su aceite esencial sobre diferentes microorganismos, lo que es de gran importancia en la parte clínica humana debido a que siempre estamos expuestos a microorganismos que pueden ser perjudiciales para nuestra salud.

La hierba luisa se la utiliza como una barrera viva en las zonas donde existen pendientes, y el suelo puede erosionar. El desecho de las hojas después de la destilación es usado como alimento para el ganado, así como también se lo puede utilizar como fertilizante, pudiendo ser aplicado en forma de compost o cenizas.^{62,95,109}

2.2.14 Especies de hierba luisa en el Ecuador:

Peter M. Jorgensen y Susana León (1999) en el Catalogue of the Vascular plants of Ecuador describen a la hierba luisa como:

Especies en el país: Una (*citratus* Stapf).

Nombre científico: *Cymbopogon citratus* (DC) Staff

Familia: *POACEAE*

Sinónimo: *Andropogon citratus* DC.

Descripción: Es una hierba, introducida y cultivada en las cuatro regiones del país. (0 - 3000 m de altura.).

Provincias donde se la encuentra cultivada: Azuay, Bolívar, Galápagos, Guayas, Los Ríos, Morona Santiago y Pichincha.



Gráfico 2.7 Planta de hierba luisa de Ecuador
FUENTE:AUTORA

Para la realización del presente proyecto se cosecho la planta de un huerto medicinal localizado en la Parroquia Pedro Vicente Maldonado, perteneciente al Cantón que lleva su mismo nombre.

A continuación una breve descripción de esta de la zona.

2.2.14.1 Cantón Pedro Vicente Maldonado



Gráfico 2.8 Mapa del Cantón Pedro Vicente Maldonado
FUENTE: 46

2.2.14.1.1 Descripción de la zona:

En la tabla 2.4 se encuentra una breve descripción del Cantón Pedro Vicente Maldonado:

Tabla 2.4. Descripción del Cantón Pedro Vicente Maldonado

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
- Cabecera Cantonal:	Pedro Vicente Maldonado. Es una parroquia urbana, y se encuentra en plena región costeña
- Superficie:	El Cantón posee una superficie de 657Km²
- Ubicación:	Se encuentra al noroccidente de Quito, y al nororiente

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
	de la Provincia de Pichincha.
- Límites:	Se encuentra al norte limitando con la Provincia de Imbabura, al sur limita con el Cantón San Miguel de los Bancos y Santo Domingo de los Colorados, al este limita con el Cantón San Miguel de los Bancos y el Distrito Metropolitano de Quito, y al oeste limita con el Cantón Puerto Quito.
- Altitud:	Se encuentra a 600msnm.
- Clima:	Posee un clima subtropical (16 a 25)°C, con humedad relativa.
- Ríos:	El cantón se encuentra rodeado por los afluentes del Río Guayllabamba, Ríos Mulaute y Río Blanco.
- Característica:	Posee bastantes recursos naturales. Es reconocida mundialmente como un bosque nublado, con humedad subtropical y tropical.
- Actividades de la población:	<p>La población se dedica a la agricultura, produciendo: café, cacao, macadamia, yuca, caña de azúcar, achiote, arroz, plátano, naranjas, mandarina, piñas, maracayá, chirimoya, arashá, sidra, guayaba, papaya, frijoles.</p> <p>Al visitar la zona se pueden observar plantaciones de palma africana y palmito, como árboles de caucho y bambú.</p> <p>También se dedican a la ganadería bovina, a la crianza</p>

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
<p>- Interés turístico y científico:</p>	<p>de cerdos y caballos por los inmenso pastizales que posee, los cuales son muy fértiles.</p> <p>En la ciudad la población se dedican a la manufactura y artesanía.</p> <p>Esta zona es muy apta para la producción de plantas medicinales para comercializarlas, lamentablemente la población no lo ve como fuente de ingreso y solo en la zona se encuentran pequeños huertos medicinales caseros y uno que otro más grande, que pertenecen a campesinos que se dedica a vender estas plantas en los mercados de Quito.</p> <p>Al ser una zona que posee un inmenso ecosistema, muchos investigadores, biólogos, científicos visitan la zona ya que al poseer tanta biodiversidad se presta para estudiarla.</p> <p>Esta zona atrae a muchos turistas sobre todo extranjeros, a quienes les encanta practicar deportes acuáticos.</p>

ELABORADO POR: Autora

FUENTE: 46,88

El mapa del Cantón Pedro Vicente Maldonado se encuentra en el Anexo D

2.3 Aceites Esenciales



Gráfico 2.9 Difusor de aceites esenciales y botellas con aceites esenciales

FUENTE: 54

Los aceites esenciales son conocidos también como esencias vegetales, ya que son productos naturales del metabolismo secundario de las plantas.^{18,68,77,30,73,25}

2.3.1 Partes de la planta donde se encuentran:

Se encuentran en forma de pequeñas gotas en el interior de glándulas secretoras de tejidos presentes en raíces, hojas, flores, semillas y frutos.^{32,76}

Estos se forman en todas las partes verdes de la planta, y cuando la planta pasa por la etapa de crecimiento estos pasan a las flores, semillas y frutos.^{18,30,32,76,78}

2.3.2 Funciones en el vegetal:

Los aceites esenciales en los vegetales cumplen con varias funciones:

- Sirven para la defensa de la planta frente al ataque de parásitos, animales herbívoros e insectos.
- Son sustancias de reserva como dador de hidrogeniones* en los procesos de óxido-reducción.
- Ayuda a que el vegetal se adapte frente a cuadros de escasez hídrica.
- Sirven de carnada ya que mediante su aroma atraen a insectos y aves, para que se produzca la polinización.
- Ahuyenta a los insectos perjudiciales.
- Protege a la plantas de otras plantas.^{25,77,30,32,76,78}

2.3.3 Propiedades

Después de diversos estudios se conoce que los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiespasmódica, antiparasitaria, expectorante, antiviral, insecticida, favorecen la digestión, alivian los dolores musculares, relajante, antidepresiva, afrodisíaca, entre otras. Aunque todavía el camino es largo y falta investigar muchas mas propiedades que ellos poseen, debido a que están formados por una gran cantidad de sustancias químicas. No obstante, la más estudiada es su actividad

* **Hidrogeniones:** Átomos de hidrógeno.^{AUTORA}

antibacteriana.^{18,31,76,78,97}

2.3.4 Rendimiento

La cantidad de aceite esencial que posee una planta varia dependiendo de varios factores, como son: época de la recolección de la planta, lugar de crecimiento de la planta, variaciones genéticas de la planta, edad de la planta cuando fue recolectada, órgano del cual se va a extraer el aceite, entre otras. Se calcula que el rendimiento de aceite esencial que se obtiene de las plantas es de alrededor del 0.01 al 10%, siendo esta ultima la obtenida de grandes cantidad de planta.^{25,30,32,97}

2.3.5 Características físicas:

Los aceites esenciales presentan las siguientes características físicas:

- Líquidos fluidos (temperatura ambiente)
- No son grasos
- Son volátiles.
- El color y el olor de estos depende de la planta de la cual se lo extrae.
- Densidad inferior a la del agua.
- Índices de refracción son mayores que el del agua.

- La mayoría son insolubles en agua, pero se disuelven con facilidad en alcohol, éter y entre ellos mismos.^{25,30,31,32,68,77,81,97}

2.3.6 Composición química:

Los aceites esenciales pueden estar formados por una composición fitoquímica* simple o compleja. Siendo los componentes principales los descritos en la tabla 2.5:

Tabla 2.5 Composición química de los Aceites Esenciales

COMPONENTE	COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL
Compuestos terpénicos:	Hidrocarburos	Monoterpenos (C₁₀):
	terpénicos que carecen	- limoneno
Pueden ser:	de oxígeno	- mircenos
acíclicos, monocíclicos o		Sesquiterpenos (C₁₅):
bicíclicos		- β-cariofileno
		- α-farneseno
Derivados del isopreno.	Derivados oxigenados	Alcoholes
(C₅)		- geraniol
		- linalol
		- nerol
		Ésteres:
		- acetato de nerilo

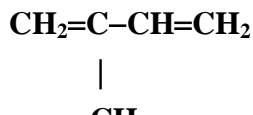


Gráfico 2.10 Fórmula

* **Fitoquímica:** Ciencia que estudia los metabolitos presentes en las plantas. AUTORA

COMPONENTE	COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL	
Estructural del Isopreno FUENTE: AUTORA		- acetato de geranilo	
		Aldehídos:	
		- citrales	
		- fotocitral	
		Cetonas terpénicas:	
		- mentona	
		- irona	
	Compuestos aromáticos:	Fenoles	- eugenol
	Derivados del fenilpropano		
	Diversos:	Ácidos orgánicos en	- enzoico
Se encuentran en cantidades pequeñas	estado libre	- valérico	
	Cumarinas	- isovalérico	
		- bergapteno	
ELABORADO POR: Autora		FUENTE: 5,8,18,25,30,31,32,33,68,77,81	

La ruta biosintética de los aceites esenciales se encuentra descrita en los Anexos A y B.

2.3.7 Obtención y Almacenamiento:

Los aceites esenciales se pueden obtener de diversas formas, ya que depende del

órgano de la planta del cual va a ser extraído, además de que al momento de ser extraído el aceite no pierda sus características organolépticas, ni sus propiedades. Los procesos pueden ser: ^{25,30,32}

2.3.7.1 Destilación:

La parte de la planta de la cual se va a extraer el aceite se sumerge en agua dentro del recipiente que se va a utilizar, el cual es calentado, posteriormente los productos volátiles son arrastrados por una corriente de vapor de agua hacia el refrigerante, en el cual se condensan, separándose el aceite del agua en una trampa de destilación.

Este método no se utiliza en aquellos aceites donde las altas temperaturas les alteran sus características organolépticas. ^{25,30,32,75}

2.3.7.2 Expresión en frío:

Este método se utiliza para extraer el aceite esencial de los frutos de los cítricos, los cuales no soportan las altas temperaturas de la destilación. Mediante una esponja mojada con etanol que tiene alfileres, picar la cáscara de los frutos, va a ir adsorbiendo el aceite, posteriormente se procede a la separación aceite-etanol mediante destilación al vacío. ^{25,32,78}

2.3.7.3 Enfleurage:

Es muy usado para extraer el aceite esencial de las flores. Se colocan las flores

en medio de dos placas de vidrio las cuales se encuentran con grasa, se dejan estas placas a temperatura ambiente durante un mes, cada semana se debe cambiar las flores.

2.3.7.4 Extracción con solvente:

Con este proceso se pone en contacto el aceite con el solvente (éter etílico, hexano, benceno), posteriormente se elimina el solvente a presión reducida y se purifica el aceite con alcohol absoluto.^{25,30,32,78}

Debido a que son volátiles se los debe almacenar en lugares fresco (preferiblemente a bajas temperaturas), oscuros ya que son muy sensibles a la luz y dentro de frasco hermético, el cual debe ser de vidrio y de color oscuro.⁹⁷

2.3.8 Pureza de los Aceites Esenciales

Para distinguir si un aceite esencial es puro o sintético, se toma en cuenta varias características como son:

- El aceite esencial puro tiene un olor igual que el de la planta del cual fue extraído.

- Los aceites esenciales poseen colores claros y no son densos.

- No todos los aceites esenciales tienen el mismo precio en el mercado, ya que hay aceites que son más difíciles de extraer que otros, o las plantas no son fáciles de conseguir.
- Siempre se deben estar contenido en botellas de vidrio oscuras, las cuales deben tener una etiqueta en la cual se indique el nombre común, nombre científico de la planta, propiedades del aceite esencial.^{78,74}

2.3.9 Uso de los Aceites Esenciales:

Los aceites esenciales tienen una gran importancia en diversas áreas como: perfumería, cosmética, farmacéutica, alimenticia, culinaria, licorera, aromaterapéutica y medicina.

Por lo puro que son los aceites se los utiliza en cantidades muy pequeñas.^{15,16,25,29,30,33,73,76,77,78,97}

2.3.10 Normalización de los Aceites Esenciales:

La regulación de los aceites esenciales como de los métodos que se utilizan para extraerlos esta a cargo de los organismos: ISO* y AFNOR*. ⁶⁸

* ISO: International Organization for Standardization⁶⁶

* AFNOR: Association Francaise de Normalisation²²

2.3.11 Los Aceites Esenciales Naturales y la Aromaterapia



Gráfico 2.11 Aromaterapia y los Aceites Esenciales

FUENTE: 77

La Aromaterapia como su palabra nos indica es el tratamiento curativo mediante el uso de las aromas.

Aroma = fragancia ; Terapia = tratamiento

La Aromaterapia parte de la Fitoterapia, que es la ciencia que se dedica al uso medicinal de las plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. La diferencia que existe entre estas dos terapias es, en la Fitoterapia se utiliza los principios activos* de toda la planta, mientras que en la Aromaterapia se utiliza únicamente los principios activos del aceite esencial.^{44,78}

René-Maurice Gattefossé (químico francés), es el padre de la Aromaterapia, quien realizó varias investigaciones en las cuales comprobó los efectos positivos que los

* **Principio Activo:** Sustancia responsable de las propiedades de la planta.⁷⁸

aceites esenciales causan en el cuerpo humano, actúan activando la producción de las hormonas a través del sistema nervioso, favoreciendo el equilibrio del cuerpo.^{16,33,77,78,97}

En la Aromaterapia, los aceites esenciales se utilizan de acuerdo al tipo de padecimiento, los cuales estimulan, relajan o tranquilizan, tanto física, mental y espiritualmente. También se utiliza la aromaterapia en sinergia con otras terapias.
16,33,77,78

2.3.11.1 Formas de usarlos:

Existen varias formas de emplear las propiedades que los aceites esenciales brindan, tales como:

- Mediante masajes que ayudan a la relajación y a la desinflamación de los músculos.
- El uso de los aceites esenciales en la tina de baño ayuda mucho a la relajación, después de un día ajetreado.
- Al realizar vaporizaciones con los aceites esenciales el ambiente se torna armonioso.
- Mediante inhalaciones de los aceites, se producen efectos muy buenos en el cuerpo, dependiendo de las propiedades de estos.^{16,33,77}

2.3.11.2 Precauciones:

El uso de los aceites esenciales cada vez es más amplio, razón por la cual se debe tener cuidado al momento de usarlo, ya que existen aceites que en usos inadecuados resultan tóxicos para el organismo, mientras que otros aceites pueden producir efectos narcóticos o estupefacientes. Antes de usar un aceite esencial de debe tomar en cuenta algunos factores, como:

- El aceite esencial debe ser puro, para lograr su objetivo.
- El aroma del aceite o los aceites debe ser agradable para el paciente.
- La cantidad o dosis y la duración del tratamiento, las cuales debe ser dada por un especialista.
- Se los puede utilizar en forma individual o mezclados (solo 3), pero hay que tener cuidado de usar aquellos que tienen propiedades similares.
- Los aceites esenciales siempre deben usarse en pequeñas cantidades (3 a 4 gotas) y diluidos en aceites bases o vegetal como son: de girasol, maní, soja o germen de maíz.

- No se deben ingerir los aceites esenciales, salvo el caso que el médico tratante lo aconseje. Antes de utilizar un aceite esencial por cualquier vía, se debe realizar una prueba cutánea para saber si se presenta alergia.
- No deben ser usados por mujeres embarazadas, ni por niños menores de 3 años.
- Se debe tener cuidado con los aceites esenciales fototóxicos, es decir, que al exponerse al sol la persona puede adquirir manchas o irritaciones en la piel.^{16,33,68,74,77,78,93}

2.4 Aceite Esencial de Hierba Luisa



Gráfico 2.12 Aceite Esencial de hierba luisa

FUENTE: 55

El aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) se lo obtiene por la destilación de sus hojas, en las cuales se encuentra en una proporción del 0.25 al 0.35%.

Mundialmente al aceite esencial de la hierba luisa se lo conoce con el nombre de

“lemongrass”⁹⁵.

2.4.1 Características físicas del aceite esencial:

Sus características organolépticas son:

- Posee color amarillo pálido.
- Su olor es intenso a limón.^{55,60,62,89,95}
- La densidad relativa a 20°C esta entre: 0,878-0,900.
- El índice de refracción a 20°C esta entre: 1,4830-1,4890.^{60,89,95}
- El pH esta alrededor de:5 – 6.⁸⁹

2.4.2 Propiedades del aceite esencial de hierba luisa:

El aceite esencial de hierba luisa al igual que la planta, posee variadas propiedades, antes ya mencionadas^{18,60,63,86,89,95}

En el presente proyecto se tomaron en cuenta dos propiedades de este aceite esencial: antibacteriana y antimicótica, para lo cual se ha buscado en la bibliografía los diferentes microorganismos como bacterias y hongos sobre los cuales ejerce su poder.

En varios estudios realizados sobre el aceite esencial de la hierba luisa se a demostrado que detiene el crecimiento de ciertos patógenos como son: *Vibrio cholerae* y *Salmonella paratyph*, diferentes dermatofitos: *Epidermophyton floceosum*,

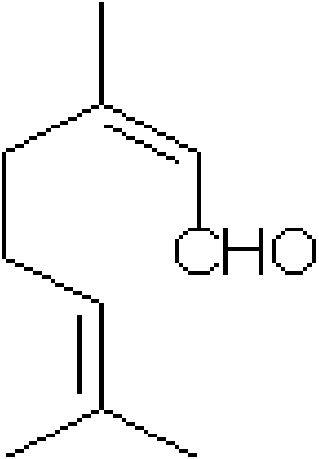
Microsporium canis, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*, inhibe el desarrollo de bacterias como la *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus aureus*. También se ha comprobó que el aceite esencial actúa sobre el *Aspergillum flavus*, siendo más potente que los fungicidas sintéticos.^{95,109}

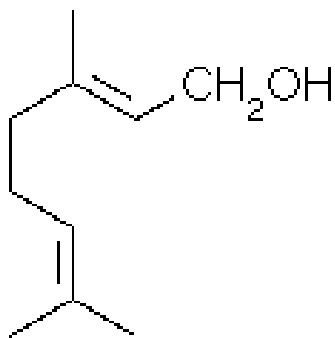
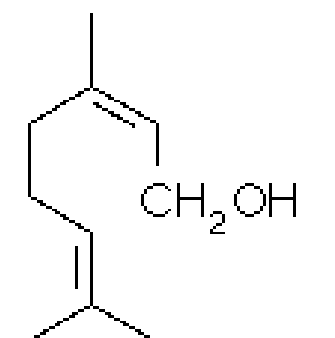
Cave mencionar que también posee propiedades potenciales como anticancerígeno por el contenido de mirceno (el cual actúa junto con otros componentes del aceite, solo no).^{86,95,109}

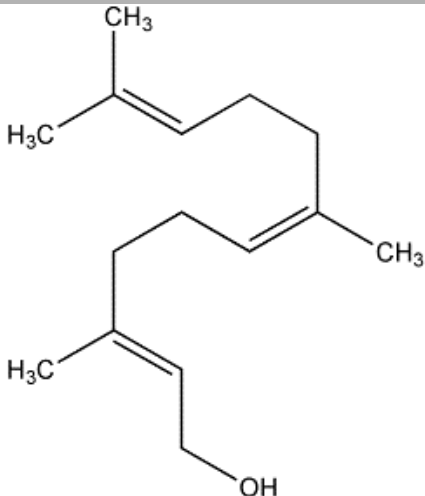
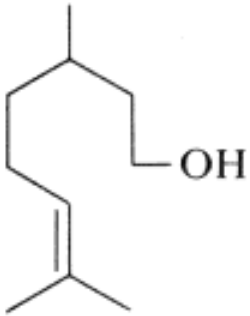
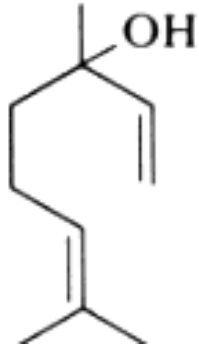
2.4.3 Componentes principales del aceite esencial de hierba luisa:

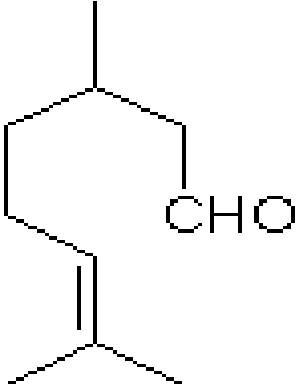
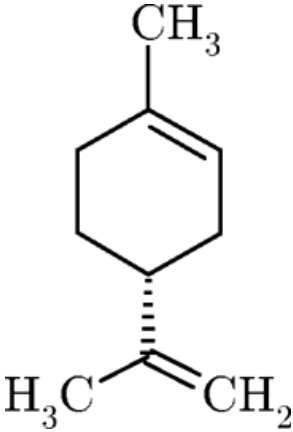
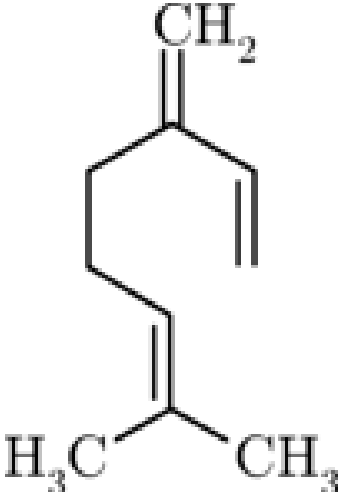
Los componentes principales que se encuentran en el aceite esencial de hierba luisa se describen en la tabla 2.6:

Tabla 2.6 Composición química del Aceites Esenciales de Hierba Luisa

COMPONENTE	PROPIEDADES	FÓRMULA
- Citral:	<p>Es el componente principal del aceite esencial de hierba luisa, se encuentra entre un 70 a 85%.</p> <p>El citral es un aldehído.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antibacteriano. - Antihistamínico. - Fungicida 	<p>Su fórmula molecular es: $C_{10}H_{16}O$</p> 

COMPONENTE	PROPIEDADES	FÓRMULA
- Geraniol:	<ul style="list-style-type: none"> - Expectorante - Anticancerígeno. <p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anticancerígeno - Expectorante - Antiséptico - Antiespasmódico. 	<p>Gráfico 2.13 Fórmula Estructural del Citral</p> <p>FUENTE: 17</p> 
- Nerol:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antiséptico - Antiespasmódico. 	<p>Gráfico 2.14 Fórmula Estructural del Geraniol</p> <p>FUENTE: 39</p> 
		<p>Gráfico 2.15 Fórmula Estructural del Nerol</p> <p>FUENTE: 39</p>

COMPONENTE	PROPIEDADES	FÓRMULA
- Farnesol:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee, la propiedad de dar énfasis al olor en la perfumería.</p>	
		<p>Gráfico 2.16 Fórmula Estructural del Farnesol</p> <p>FUENTE: 83</p>
- Citronelol:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee, la propiedad de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antiséptico 	
		<p>Gráfico 2.17 Fórmula Estructural del Citronelol</p> <p>FUENTE: 39</p>
- Linalool:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anticancerígeno - Antiespasmódico - Antihistamínico - Hipnótico 	
		<p>Gráfico 2.18 Fórmula Estructural del Linalool</p> <p>FUENTE: 39</p>

COMPONENTE	PROPIEDADES	FÓRMULA
- Citronelal:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide</p> <p>Se lo utiliza como componente de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perfumes. - Repelentes de insectos. 	
		<p>Gráfico 2.19 Fórmula Estructural del Citronelal FUENTE: 69</p>
- Limoneno:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Antibacteriano - Anticancerígeno - Antiespasmódico - Expectorante. 	
		<p>Gráfico 2.20 Fórmula Estructural del Limoneno FUENTE: 120</p>
- Mirceno:	<p>Es un metabolito secundario terpenoide.</p> <p>Posee propiedades, como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analgésico - Anticancerígeno. <p>(β-Mirceno)</p>	

COMPONENTE	PROPIEDADES	FÓRMULA
		<p>Gráfico 2.21 Fórmula Estructural del Mirceno</p> <p>FUENTE: 39</p>
<p>Una serie de aldehídos y otros compuestos en concentraciones traza.^{62,86,89}</p>		
<p>ELABORADO POR: Autora</p>		<p>FUENTE:9,60,62,86,89,95,73,15</p>

2.4.4 Duración del Aceite Esencial:

El aceite esencial de hierba luisa tiene un tiempo de vigencia de 3 meses, en un lugar a temperatura ambiente y con poca luz, a partir de esta fecha el aceite tiende a degradarse, ya que es sensible a la exposición a la luz y al aire, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía.^{60,89}

2.4.5 Usos del aceite esencial de hierba luisa:

El aceite esencial se lo utiliza:

- Para la obtención de iononas y metil iononas.⁹⁵
- Para la síntesis de vitamina A y de compuestos aromáticos.^{62,73}
- Para extraer el citral, el cual se lo utiliza como saborizante en la industria alimenticia. También es muy usado en las industrias de perfumería, farmacéutica y en la que se encarga de elaborar desinfectantes.^{62,95}

- En la industria cosmética se lo utiliza como componente para elaborar shampoo contra cabellos grasos y también como componente de cremas contra el acné y pieles con celulitis.^{15,42,95}
- Como repelente de insectos.^{15,95,109}
- En la Aromaterapia se lo utiliza para dar masajes y de esta manera lograr que los músculos se relajen, también se lo utiliza para calmar los dolores producidos por exceso de actividad. Inhalando este aceite mezclado con aceite base sirve para aliviar dolores de cabeza intensos, ayuda a eliminar el stress, ya que logra que el cuerpo se relaje, combate los resfriados, la fiebre.
- Para aliviar los dolores de estomago, mediante compresas.^{15,42,55,77}

2.4.6 Importancia económica:

El aceite esencial de hierba luisa posee un alto valor agregado. Una botella que contenga 10ml esta alrededor de \$ 6.00.^{55,73}

III. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCESOS

3.1 Destilación

La destilación es una de las técnicas más importantes que existen para purificar sustancias volátiles insolubles en agua, de otras no volátiles.

El principio de la destilación es usar la diferencia que existe entre los puntos de ebullición de las sustancias que forman las mezclas. Una sustancia que posee un punto de ebullición bajo es "volátil", en comparación con el resto de sustancias que forman la mezcla.^{77,81,87,90}

En el proceso de destilación existen dos fases, que son:

- Vaporización*

- Condensación*

Hay varios tipos de destilación, la selección de la técnica de destilación dependen principalmente del líquido que se va a purificar.⁸⁷

3.1.1 Destilación por Arrastre con Vapor:

La destilación por arrastre con vapor también se la conoce como hidrodestilación (HD), y tiene como propósito separar sustancias volátiles e insolubles en agua de otras sustancias menos volátiles.

El líquido hierve antes de alcanzar su punto de ebullición, debido a que la presión de vapor del líquido, más la presión de vapor de agua, son superiores a la presión atmosférica, dando lugar al proceso de destilación.^{25,26}

Este método es un buen sustituto de la destilación al vacío, y tiene algunas ventajas, ya que la destilación se realiza a temperaturas bajas.^{77,81}

3.1.2 Extracción de Aceites Esenciales:

* **Vaporización:** Es el cambio del líquido en vapor.⁸⁷

* **Condensación:** Es el cambio de vapor en líquido.⁸⁷

La HD es el método que más utilizado para extraer aceites esenciales. El método es sencillo.^{5,8,14,18,60,73,75,94}

El agua en la cual se encuentra el material vegetal fresco, pasa a través de una trampa de destilación en forma de vapor. Este vapor producido arrastra los aceites esenciales de las plantas hasta el refrigerante el cual se encuentra a temperatura más fría. Este cambio de temperatura hace que el vapor se condense y se vuelva nuevamente líquido (agua y aceite esencial).

En uno de los brazos de la trampa se puede observar como queda el agua y sobre este el aceite, lo cual facilita el momento de la recolección. El aceite debe ser almacenado en frascos de vidrios herméticos oscuros.^{5,8,14,75,94}



Gráfico 3.1 Equipo para destilación de Aceites Esenciales

FUENTE: AUTORA

Se debe tener presente que entre mas cantidad de planta se destile, más aceite esencial se va a obtener. Alrededor de 1ml se obtiene por 100gr. de planta destilada.^{5,94}

El cálculo del porcentaje de rendimiento del aceite esencial se lo hace mediante la ecuación 3.1: ^{5,73}

$$\% \text{ Re} = \frac{Ca}{Mp} \times 100$$

Ecuación 3.1

Donde:

%Re= Porcentaje de rendimiento del Aceite Esencial (%)

Ca = Cantidad de Aceite Esencial extraído (ml)

Mp = Cantidad de planta destilada (g.)

3.2 Características Organolépticas

Son un conjunto de cualidades detectables por los sentidos: color, olor y sabor, indicativos primarios de la calidad de un producto.⁵⁸

3.2.1 Determinación de las características organolépticas de los Aceites Esenciales

En los aceites esenciales las características organolépticas varían dependiendo del tipo de planta del cual se extrae. En el caso del aceite de lemongrass se debe tener presente los siguientes aspectos:

- El color va de amarillo pálido a pardo.
- La apariencia debe ser transparente.
- El olor es igual al que tienen las hojas de hierba luisa.



Gráfico 3.2 Características Organolépticas del Aceite de Lemongrass

FUENTE: AUTORA

3.3 Densidad

La densidad de una sustancia es la relación que existe entre la masa y el volumen de dicha sustancia. Con estos dos datos en cualquier estado que se encuentre la sustancia, sea sólido, líquido o gaseoso, se determina su densidad mediante la ecuación 3.2.⁵⁰

$$\rho = \frac{M}{V}$$

Ecuación 3.2

Donde:

ρ = Densidad (g/ml)

M = masa de la sustancia (g)

V = Volumen de la sustancia (ml)

3.3.1 Determinación de la densidad de un líquido

La densidad de un líquido se establece comparándola contra la densidad de otro líquido, casi siempre es el agua.

Donde, la relación que existe entre las densidades, es igual a la relación que existe entre las masas de dichos líquidos, los cuales ocupan un mismo volumen.^{23,50}

3.3.2 Medición de la densidad relativa de los Aceites Esenciales

Para poder determinar la densidad de los aceites esenciales o de cualquier líquido, es necesario conocer el volumen que estos poseen, para lo cual se utiliza un picnómetro, que ayuda a determinarlo con exactitud.

3.3.2.1 Picnómetro

El picnómetro es un pequeño matraz de fondo plano que se prolonga hacia un lado por un tapón esmerilado alargado, en cuyo centro se encuentra un capilar (tubo delgado), en el que existe una señal marcada para enrasar*, de manera que el volumen ocupado se fije con exactitud. El matraz en su parte central tiene un cuello esmerilado al cual se conecta a un termómetro.

* Enrase: igualar AUTORA



Gráfico 3.3 Picnómetro de 10ml con Aceite Esencial (20°C)

FUENTE: AUTORA

El picnómetro estará enrasado cuando el líquido coincida exactamente con la señal de enrase, lo cual indicara que el picnómetro se encuentra calibrado a la temperatura que marque el termómetro (generalmente 20°C).^{28,50,82}

El cálculo para determinar la densidad relativa de los aceites esenciales se hace mediante la ecuación 3.6:^{28,82}

$$M_L = M_{LP} - M_P \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$M_A = M_{AP} - M_P \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$V_L = V_A \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$$\rho_T = \frac{\rho_L}{\rho_A} = \frac{M_L}{M_A}$$

Ecuación 3.6

Donde:

V_L = Volumen del líquido

V_A = Volumen del agua

ρ_T = Densidad total

ρ_L = Densidad del líquido

ρ_A = Densidad del agua

M_L = Masa del líquido

M_A = Masa del agua

M_{LP} = Masa del líquido dentro del picnómetro

M_{AP} = Masa del agua dentro del picnómetro

M_P = Masa del picnómetro vacío

3.4 Índice de Refracción

Se llama índice de refracción a la relación que existe entre la velocidad de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la muestra cuyo índice se calcula.

La velocidad de la luz a través de la muestra esta relacionada con la clase de grupos funcionales (estructura de las moléculas) que la sustancia posea. Está determinada por la interacción que existe entre las ondas luminosas con los electrones

de orbitales enlazantes* y antienlazantes* de las sustancias.²⁸

3.4.1 Determinación del Índice de Refracción

El índice de refracción es un valor adimensional, cuya fórmula para determinarlo se encuentra la ecuación 3.7:^{52,118,122}

$$\eta = \frac{c}{v} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Donde:

η = Índice de Refracción de la muestra

c = Velocidad de la luz en el vacío (3×10^8 m/s)

v = Velocidad de la luz en la muestra

Como la velocidad de la luz a través de cualquier muestra es menor que en el vacío, el índice de refracción será:⁵¹

- En el vacío es $\eta = 1$.
- En cualquier muestra $\eta > 1$.

* **Orbital Enlazante:** Orbital con menor energía que cualquiera de los orbitales atómicos a partir de los cuales se creó. Se encuentra en estado de atracción.¹²²

***Orbital Antienlazantes:** Orbital con mayor energía, se encuentra en estado de repulsión.¹²²

En la tabla 3.1 se hace referencia a algunos índices de refracción:

Tabla 3.1 Índice de Refracción de ciertas sustancias

SUSTANCIA	ÍNDICE DE REFRACCIÓN (20°C)
- Agua	1.33
- Glicerina	1.47
- Azúcar	1.56
- Hielo	1.31
- Vidrio	1.92
- Alcohol etílico	1.36
- Diamante	2.417
- Acetona	1.36
- Compuestos Orgánicos en general	1.33 – 1.66

ELABORADO POR: Autora

FUENTE:28,60,89,95,118

El valor del índice de refracción depende de la temperatura a la cual se lo este midiendo, ya que por diferencia de 1°C se hace una corrección de 0.0004 unidades.

Cuando la temperatura es menor el índice de refracción es mayor y cuando la temperatura es mas elevada este valor del índice de refracción va disminuyendo.²⁸

Se utiliza el valor del índice de refracción para determinar la pureza de los químicos.^{28,118}

3.4.2 Medición del Índice de Refracción de los Aceites Esenciales

Para poder determinar el índice de refracción de los aceites esenciales o de cualquier sustancia, se utiliza un equipo denominado refractómetro de Abbe.^{5,52,53,60,89,95}

3.4.2.1 Refractómetro

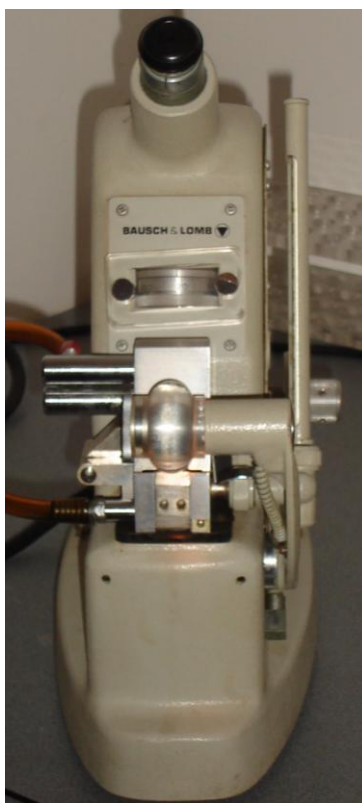


Gráfico 3.4 Refractómetro de ángulo límite (20°C)

FUENTE: AUTORA

El refractómetro es un equipo que permite medir de forma sencilla y rápida el índice de refracción de las sustancias sin necesidad de realizar ningún cálculo.

El campo ocular del refractómetro de ángulo límite, está dividido en dos partes, siendo una de ellas iluminada y la otra sin iluminación. La separación existe entre las dos partes es el rayo límite.⁵³



Gráfico 3.5 Campo Ocular del Refractómetro

FUENTE:79

Cuando existe esta línea de separación en el centro bien marcada, se procede a realizar la lectura del valor del índice de refracción, el cual aparece en el campo de escala, en la escala superior.^{52,53,79,98}

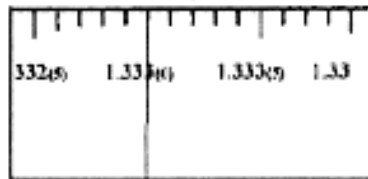


Gráfico 3.6 Campo de Escala del Refractómetro

FUENTE:79

3.5 Potencial Hidrógeno (pH)

Se define el potencial hidrógeno, como el logaritmo negativo de la concentración de los iones de hidrógeno presentes en una sustancia.^{21,123,124}

El cálculo del pH del lo hace mediante la fórmula 3.8:^{123,124}

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Donde:

pH = Valor de pH calculado

H^+ = Concentración de iones de Hidrógeno

3.5.1 Determinación del pH de las sustancias:

Mediante la determinación del pH se expresa la acidez o alcalinidad de una sustancia, usando una escala descrita en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Escala para determinar el pH de una sustancia

pH	SUSTANCIA
1 – 6,99	Ácida
7	Neutra
7,01 - 14	Alcalina

ELABORADO POR: Autora

FUENTE:52,123,124,43

3.5.2 Medición del pH de los Aceites Esenciales

Para poder determinar el pH de los aceites esenciales o de cualquier sustancia, se utiliza un equipo denominado peachímetro o papeles de pH si la medición no es exacta.^{52,89}

3.5.2.1 Peachímetro



Gráfico 3.7 Peachímetro con el electrodo introducido en Aceite Esencial

FUENTE: AUTORA

El peachímetro es un equipo que permite medir de manera automáticamente la

acidez o la alcalinidad que posee una sustancia.

Este equipo posee un circuito eléctrico en el que está intercalada la muestra (solución) y sumergido el electrodo. Mediante resistencias se nivela el puente eléctrico hasta que se consigue el equilibrio, es decir, que no existe pasaje de corriente eléctrica entre los componentes. Lo que permite que en la pantalla se pueda leer el valor de pH que posee la sustancia analizada.^{43,52,}

3.6 Espectroscopia de Infrarrojo

Mediante el uso de la espectroscopia de IR se pueden conocer los principales grupos funcionales que forman la estructura molecular de una muestra. Información que se obtiene por la acción de la radiación IR sobre la muestra, obteniéndose un espectro de absorción en el espectrofotómetro.

El espectro IR se encuentra ente $2.5\mu\text{m}$ a $15\mu\text{m}$ en unidades de longitud de onda, o en 4000 cm^{-1} a 666 cm^{-1} en número de onda.⁷¹

3.6.1 Características de un espectro Ir

El espectro IR de una muestra es una representación gráfica de los valores de números de onda (μm) o de frecuencia (cm^{-1}) ante los valores de % de transmitancia (%T).⁷¹

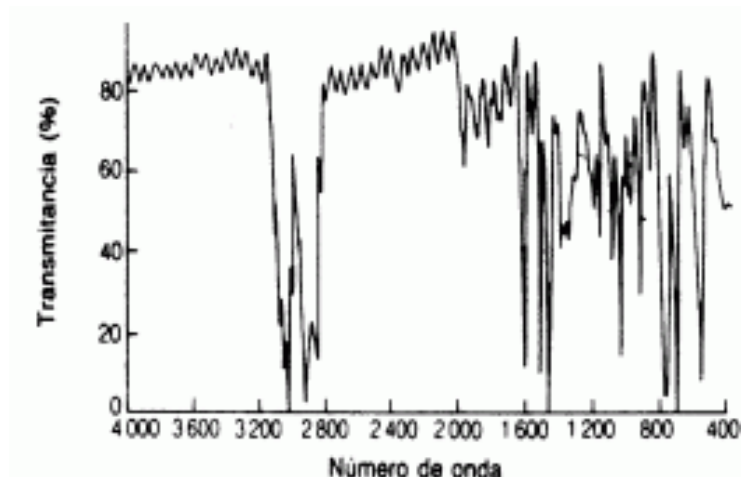


Gráfico 3.8 Espectro IR de una muestra
FUENTE: 104

La absorción de la radiación IR por una muestra a una longitud de onda dada, origina un descenso en el % T, observándose esto en el espectro mediante la formación de unos picos.⁷¹

3.6.1.1 Vibración Molecular

La formación de estos picos son movimientos vibracionales continuos que poseen las moléculas, cuya frecuencia de vibración de los enlaces de ellas, depende de la masa de los átomos que las forman y de la fuerza de unión que existe entre ellos.

Las vibraciones pueden ser de dos tipos:

- De estiramientos (stretching)
- De flexión (bending)

3.6.1.2 Absorción de Energía

La absorción de energía infrarroja por parte de una sustancia, ocurre cuando la energía que incide sobre ella, tiene el mismo valor que la energía de vibración que poseen las moléculas de dicha sustancia.

En el espectro de IR surgen picos de absorción a distintos valores de frecuencia y de longitud de onda, dado que en una molécula existen diferentes átomos que forman distintos enlaces.⁷¹

La información sobre la absorción de grupos funcionales en el IR se encuentra en el Anexo E.

3.6.2 Medición del espectro IR de los Aceites Esenciales

Para poder obtener un espectro IR de los aceites esenciales o de cualquier otra sustancia se utiliza un espectrofotómetro de IR^{5,89}

3.6.2.1 Espectrofotómetro de transformada de Fourier (IR-TF)



Gráfico 3.9 Espectrofotómetro IR-TF
FUENTE: AUTORA

El espectrofotómetro IR-TF se basan en el interferómetro de Michelson, que funciona de la siguiente manera: primero la radiación golpea a un divisor que escinde el haz de la luz en dos partes iguales (espejo semirreflejante). La formación de estos dos haces de luz interfieren en el divisor cuando son reflejados sobre otros dos espejos.

El espejo móvil 1 situado frente a la trayectoria del haz original y el espejo fijo 2 situado perpendicularmente a la trayectoria del haz original En esta trayectoria se dispone la muestra y a continuación el detector IR.



Gráfico 3.10 Esquema de un interferómetro de Michelson

FUENTE: 104

La intensidad resultante de la intercalación de los dos haces es medida en función del desfase del espejo móvil en su desplazamiento respecto la posición intermedia, obteniéndose un interferograma*.

Se utiliza como método matemático la transformación de Fourier, que es la sumatoria de senos y cósenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación. Actualmente existe un programa de ordenador el cual realiza este cálculo matemático, y da resultados exactos y rápidos de las frecuencias elementales contenidas en el interferograma. La transformada de Fourier del interferograma es el espectro IR ordinario obtenido por aparatos convencionales de IR.^{104,115}

A continuación se presente un diagrama de flujo del proceso que realiza un espectrofotómetro de transformada de Fourier IR-TF).

* Interferograma: Gráfico que se obtiene en el espectrofotómetro. AUTORA

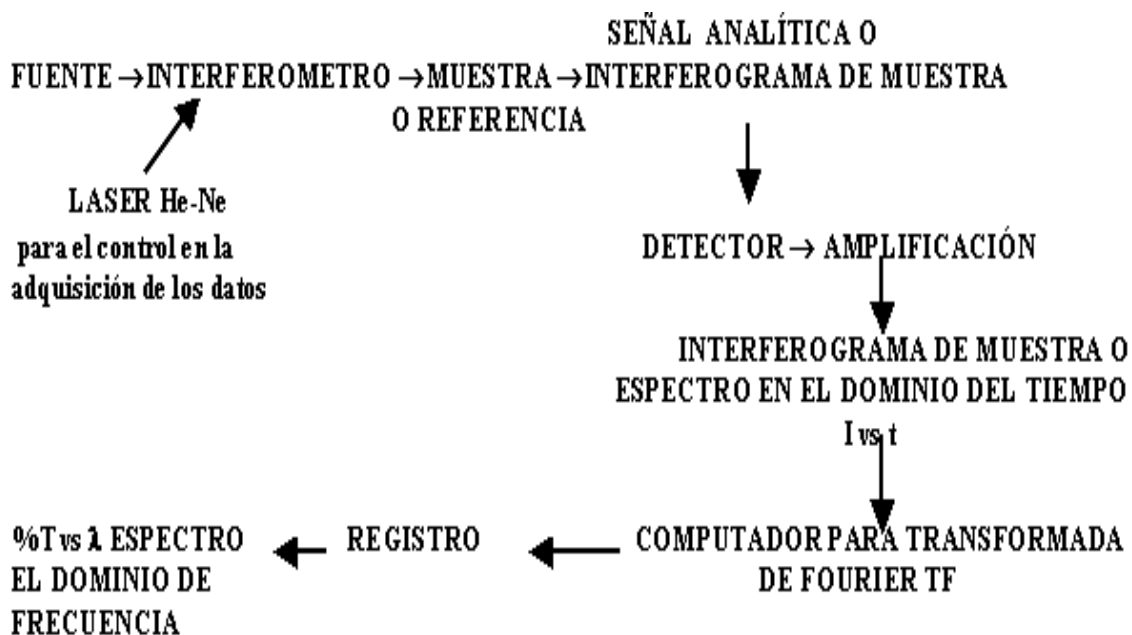


Gráfico 3.11 Diagrama de Flujo del Espectrofotómetro de transformada de Fourier IR-TF
FUENTE: 104

3.7 Caracterización de grupos funcionales (coloración)

Las moléculas orgánicas poseen en su estructura uno o varios grupos funcionales*, los cuales se pueden determinar mediante reacciones de coloración y precipitación.

Entre los grupos funcionales que se determinan tenemos: ^{5,8}

- Aldehídos
- Cetonas

* Grupos funcionales: Son agrupaciones constantes de átomos.⁹⁹

- Carbonilo del Aldehído
- Esteres
- Fenoles
- Insaturaciones
- Compuestos Aromáticos



Gráfico 3.12 Pruebas de Coloración para Aceites Esenciales
FUENTE: AUTORA

3.7.4 Presencia de grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas:

Los aldehídos y las cetonas se identifican mediante la prueba de Brady, en la cual estos grupos funcionales reaccionan con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, formándose las correspondientes 2,4-dinitrofenilhidrazonas.

La prueba es positiva cuando cambia de coloración de cristalino a: amarillo, anaranjado o rojo, que indica la presencia de moléculas que poseen un grupo carbonílico.

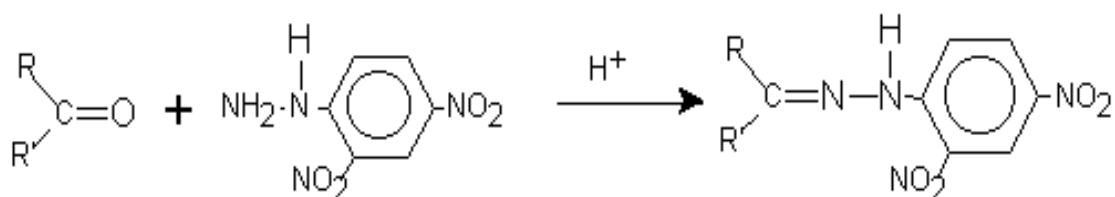


Gráfico 3.13 Reacciones para la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona

FUENTE: 70

Si la prueba es positiva, la diferenciación entre cetonas y aldehídos es posible debido al hecho de que aldehídos se oxidan a ácidos carboxílicos, mientras que no sucede así para cetonas.^{5,8,99,100,102}

3.7.5 Presencia del grupo carbonilo de aldehído:

Para determinar la presencia del grupo carbonilo de un aldehído se realiza la prueba de Tollens y la de Fehling.

3.7.5.1 Prueba de Tollens

El reactivo de Tollens contiene el ion plata en forma de un complejo amoniacal. El ion plata se reduce a plata metálica al reaccionar con el grupo carbonilo de un aldehído, formando un espejo de plata.

Los aldehídos se oxidan hasta los correspondientes ácidos que forman a su vez las sales.^{59,70,99,102}

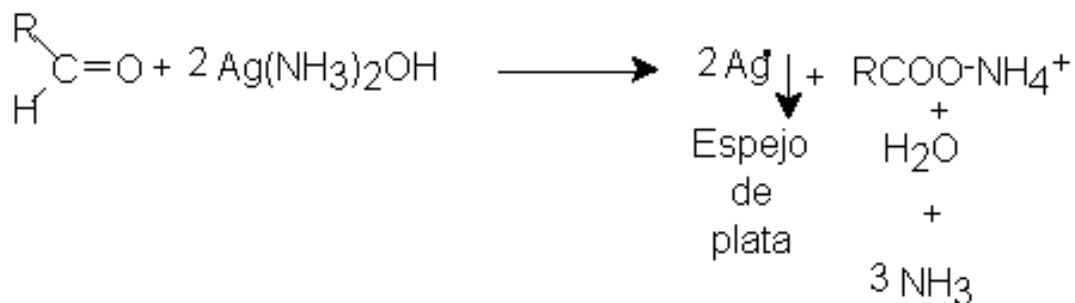


Gráfico 3.14 Reacciones para la reducción de la plata
FUENTE: 70

3.7.5.2 Prueba de Fehling

El reactivo de Fehling proporciona, a partir de la mezcla de dos soluciones al momento de usar, el ion cúprico que en medio alcalino forma un complejo cupro-tartárico, que oxida a los aldehídos pero no a las cetonas, de acuerdo con la siguiente reacción:

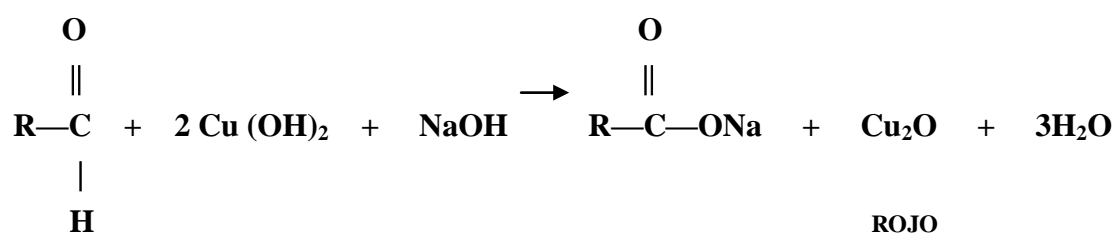


Gráfico 3.15 Reacciones para la formación de un comolejo cupro-tartárico
ELABORADO POR: AUTORA FUENTE: 99

La formación de un precipitado rojo es prueba positiva para aldehídos.^{99,102}

3.7.6 Presencia de Esteres:

Los ésteres reaccionan con la solución alcalina de hidroxilamina para producir ácidos hidroxámicos, que dan una coloración púrpura o roja intensa al agregar unas gotas de FeCl_3 .¹⁰⁰

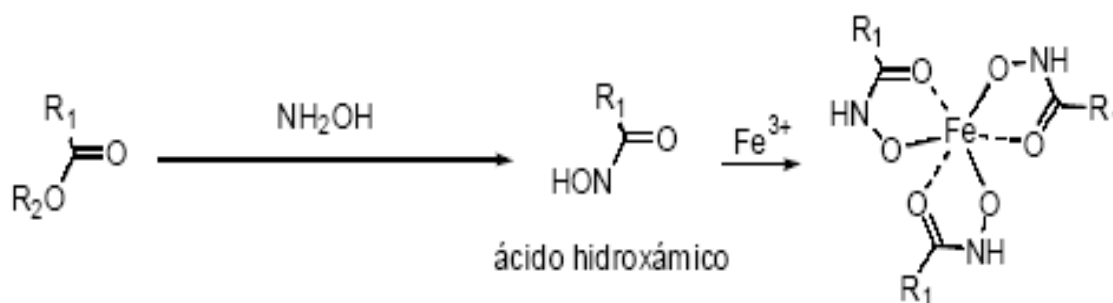


Gráfico 3.16 Reacciones para la formación de ác. hidroxámico
FUENTE: 100

3.7.4 Presencia de Fenoles:

Los fenoles con la solución de FeCl_3 forman complejos cuyos colores característicos son verde, rojo, azul y violeta oscuros.^{5,8,27,102}

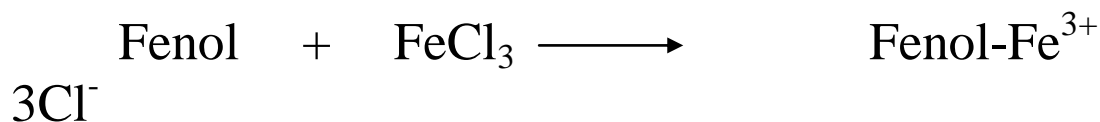


Gráfico 3.17 Reacciones para la formación del complejo Fenol-Fe³⁺
ELAFORADO POR AUTORA FUENTE: 102

3.7.5 Presencia de Insaturaciones (dobles enlaces):

El permanganato de potasio es una sustancia oxidante que reacciona con las insaturaciones de los compuestos orgánicos (dobles enlaces). El permanganato de potasio al unirse al doble enlace de un alqueno lo convierte en 1,2-dioles: dihidroxialcoholes que contienen dos grupos OH en carbonos adyacentes. Su formación se reduce a la adición de dos grupos hidroxilo al doble enlace. Se forma un precipitado café. Se conoce a esta prueba con el nombre de prueba de Bayer.^{5,8,59,65}

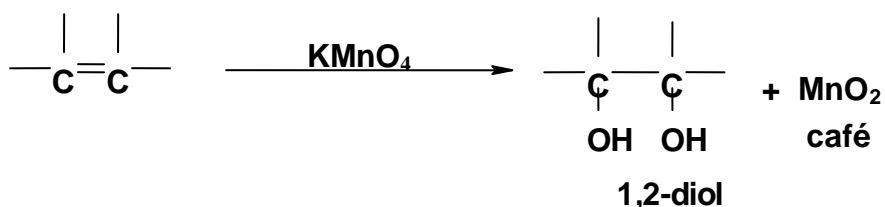


Gráfico 3.18 Reacciones para la formación de 1,2-diol
FUENTE: 65

3.8 Determinación de patógenos en una muestra

La determinación de patógenos en una muestra, tiene como finalidad contar el número de colonias que hayan crecido en una caja petri transcurrido un tiempo y a una temperatura de incubación determinada. La caja petri contiene un medio sólido (apto para el crecimiento de todo tipo de microorganismos) y volumen conocido de la muestra.

Cuando existe crecimiento de estas colonias se calcula el número formadoras de

colonias mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Volumen analizado}} X_{\text{promedio de ufc}} = \frac{\text{ufc}}{\text{ml o g}} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

Donde:

ufc = unidades formadoras de colonia

Factor de dilución 10

Volumen analizado 1

Al realizar estas pruebas se determina la presencia o ausencia de los siguientes microorganismos en el aceite esencial: aerobios totales, mohos, levaduras, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.¹⁰³

3.7.1 Aerobios totales

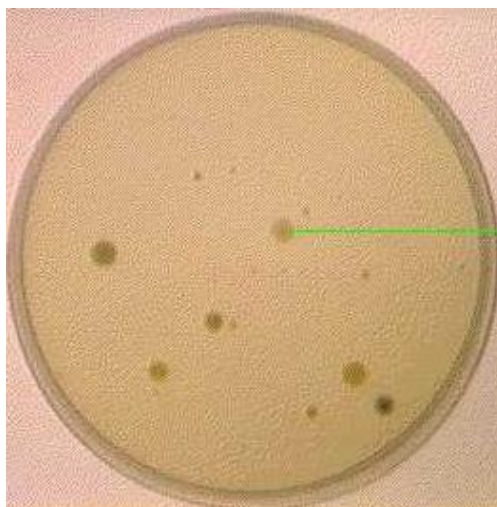


Gráfico 3.19 Colonias de aerobios totales en caja petri (22°C)

FUENTE: 103

Son todos los microorganismos que pueden crecer en presencia de oxígeno a una temperatura de 22 a 37°C.¹⁰³

3.7.2 Mohos



Gráfico 3.20 Colonia de moho en caja petri
FUENTE: 105

El moho es un hongo filamentoso. Crece mejor en condiciones calientes y húmedas, pero tienen la capacidad de adaptarse a condiciones que no todos los microorganismos son capaces de tolerar. Se adaptan a pH de 2 a 9, siendo el pH óptimo aproximadamente 5.6. Su reproducción es mediante esporas. Poseen diversos colores y tamaños.^{45,85,121}

3.7.3 Levaduras



Gráfico 3.21 Colonias de levadura en caja petri

FUENTE: 105

Las levaduras son hongos unicelulares. Son cremosas y poseen colores blancos, beige o un poco más oscuros, por la presencia de carotenoides* algunas presentan colores rosados o rojos. Miden de 2,5 a 10µm de ancho y 1,5 a 21µm de largo.

Tienen formas esféricas alargadas. Se reproducen asexualmente, normalmente por gemación. En el medio de cultivo tardan en crecer de 24 a 48 horas, a 32°C. ¹⁰⁷

3.9 Determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del Aceite Esencial

Para determinar la actividad del aceite esencial de hierba luisa se va a utilizar el siguiente método de valoración de desinfectantes:

3.9.1 Método Valoración de Desinfectantes Método AOAC (Association of official analytical chemists)

* **Carotenoides:** Son pigmentos orgánicos naturales que se forman en plantas y otros organismos como algas, algunas clases de hongos y bacterias.¹¹³

El método de valoración de desinfectantes está fundamentado en poner en contacto las bacterias con el producto a evaluar por un tiempo determinado, y posteriormente se realizará su aislamiento en medios de cultivos específicos para cada cepa.

Con frecuencia se emiten diversas opiniones sobre las bondades o fracasos de un determinado desinfectante; esto encuentra su explicación en la diversidad de factores que deben ser tomados en cuenta para que un desinfectante pueda actuar con toda su capacidad en un proceso de desinfección.

El número y tipo de microorganismos y las características químicas de los desinfectantes, son factores que varían de lugar en lugar y determinan la buena o mala desinfección a pesar de que las otras normas básicas del proceso de desinfección se cumplan a cabalidad.^{2,6}

3.9.2 Bacterias, Levaduras y Hongos ATCC

3.9.2.1 The American Type Culture Collection (ATCC)

Es un recurso privado único, no lucrativo dedicado a la colección, preservación y distribución de las cultivos auténticos de: microorganismos vivos, virus, DNA genomas, plantas, y de células humanas y animales.^{19,20}

3.9.2.2 Bacterias ATCC

3.9.2.2.1 *Escherichia coli*

Es una bacteria anaerobia facultativa*. Se moviliza mediante flagelos (que rodean su cuerpo), no forma esporas.¹¹⁴

3.9.2.2.1.1 Clasificación científica:

A la *Eschetichia. coli* se la clasifica de la siguiente manera:

Reino: *Bacteria*

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gamma Proteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichea*

Especie: *E. coli*¹¹⁴

3.9.2.2.1.2 Localización:

Se encuentra en el tubo digestivo de los mamíferos. En condiciones normales constituye una parte esencial de la flora bacteriana humana.^{37,114}

3.9.2.2.1.3 Utilización:

Se la utiliza la *E. coli* para experimentos de genética y biotecnología

* **Anaerobio facultativo:** Microorganismo que crece tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.¹¹⁰

molecular.¹¹⁴

Ejemplo:

La interacción entre la genética y la biotecnología es importante, ya que al conocer el genoma de un patógeno se puede deducir la estructura de cualquiera de las proteínas que este posee.

Si una de estas proteínas es esencial para el funcionamiento de la especie, se utilizará este conocimiento para tratar de diseñar una sustancia química que interfiera con dicha proteína (antibiótico).¹²³

3.9.2.2.1.4 Cepas patógenas de *Escherichia coli*

Existen cepas de *E. coli* específicas que son patógenas, las cuales provocan alteraciones infecciosas graves en forma de enteritis*. La manera de transmisión es feco-oral.^{37,114}

3.9.2.2.1.5 *E.coli* ATCC 25922

* **Enteritis:** Inflamación del intestino delgado causada por una infección viral o bacteriana que frecuentemente también compromete al estómago y al intestino grueso.⁴⁷

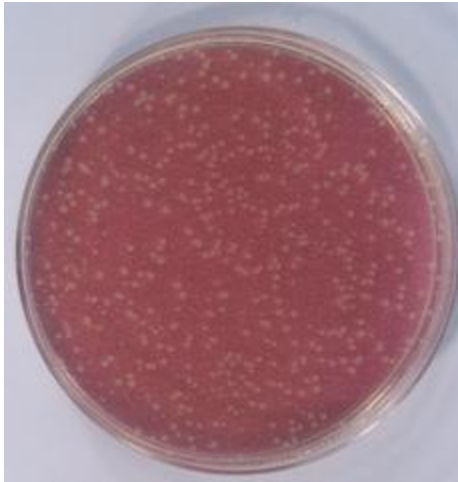


Gráfico 3.22 Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922

FUENTE: 35

Organismo: *Escherichia coli*

Medio de Cultivo: Tryptic soy agar

Condiciones de crecimiento: aerobicas

Temperatura: 37.0 C.²⁰

3.9.2.2.2 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa por lo que puede crecer tanto con oxígeno y sin el mismo.

Tiene forma esférica y crece agrupada en racimos. No posee movilidad. ^{67,125}

3.9.2.2.1 Clasificación científica:

A la *S. aureus* se la clasifica de la siguiente manera:

Reino: *Bacteria*

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Staphylococcaceae*

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*¹²⁵

3.9.2.2.2 Localización

Generalmente se encuentra en los alimentos, producidos por animales infectados con esta bacteria.

Crece hasta con un 10 % de sal común, razón por la cual puede crecer en el agua del mar. Se desarrolla en temperaturas desde 6,5 a 50°C, siendo la temperatura óptima 30-40°C.^{67,125}

3.9.2.2.3 Cepas patógenas *Staphylococcus aureus*

S. aureus y sus diversas cepas patógenas producen infecciones en la piel y en el tracto nasofaríngeo.

3.9.2.2.4 *S.aureus* ATCC 6538

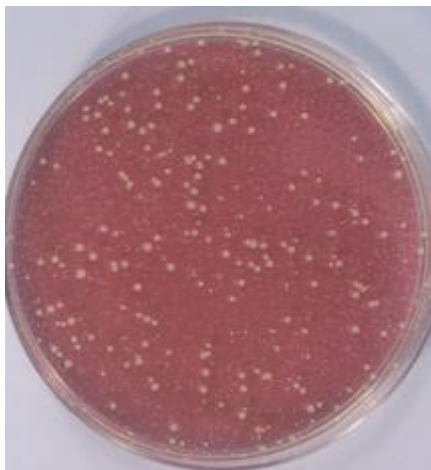


Gráfico 3.23 Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922
FUENTE: 36

Organismo: *Staphylococcus aureus subsp*

Medio de Cultivo: Tryptic soy agar

Temperatura: 37.0 C.²⁰

3.9.2.3 Levaduras y Hongos ATCC

3.9.2.3.1 *Candida albicans*

Es una levadura, con forma esférica.¹¹²

3.9.2.3.1.1 Clasificación científica:

A la *C. albicans* se la clasifica de la siguiente manera:

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Clase: *Saccharomycetes*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Candida*

Especie: *C. albicans*¹¹²

3.9.2.3.1.2 Localización

C. albicans vive en las mucosas oral, gastrointestinal y genital de individuos sanos.^{48,106,112}

3.9.2.3.1.3 Cepas Patógenas *Candida albicans*

C. albicans se convierte en patógeno cuando hay un cambio en la morfología del microorganismo mediante la emisión de un filamento. Esto ocurre en personas en las cuales sus defensas disminuyen.

Una de las infecciones que produce es la candidiasis, la cual puede ser leve en personas sanas, pero muy grave en personas inmunodeprimidas.^{48,106,112}

3.9.2.3.1.4 *Candida albicans* ATCC 10231

Organismo: *Candida albicans* (Robin) Berkhout

Medio de Cultivo: YM agar

Temperatura: 25.0 C. ²⁰

3.9.2.3.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo. Produce ennegrecimientos en vegetales. ¹¹¹

3.9.2.3.2.1 Clasificación científica:

A. niger se lo clasifica de la siguiente manera:

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Clase: *Eurotiomycetes*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

Especie: *Aspergillus niger* ¹¹¹

3.9.2.3.2.2 Cepas Patógenas *Aspergillus niger*

A. niger en grandes concentraciones puede producir aspergillosis, que es una

alteración a nivel pulmonar.¹¹¹

3.9.2.3.2.3 *Aspergillus niger* ATCC 16404

Organismo: *Aspergillus niger van Tieghem*

Medio de Cultivo: Potato dextrose agar (PDA)

Temperatura: 24.0 C.²⁰

Se utilizan estas bacterias, levadura y hongo ya que son los recomendados para demostrar la efectividad de un producto como desinfectante.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de Investigación

El presente proyecto es una investigación documental debido a que se recurrió a fuentes bibliográficas que describen temas similares al investigado en este proyecto, y una investigación experimental debido a que se separó, caracterizó y se comprobó la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa mediante ensayos en el laboratorio.

4.2 Muestra

Se trabajó con 11300 gramos de hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) Staff). La planta fue recolectada de un huerto medicinal perteneciente a la señora

María Orve, localizado en la Parroquia de Pedro Vicente Maldonado (Provincia de Pichincha). En la tabla 4.1 se detalla las fechas y horas de recolección:

Tabla 4.1 Recolección de la planta de hierba luisa

Fecha	Hora (AM)	Cantidad (gr)
05/05/2006	5:00	1820
19/05/2006	5:00	1740
26/05/2006	5:00	2020
02/06/2006	5:00	2020
16/06/2006	5:00	2020
23/06/2006	5:00	1700

ELABORADO POR: Autora

FUENTE:AUTORA

4.3 Materiales:

4.3.1 Reactivos y Medios de Cultivo

- Sulfato de sodio anhidro
- Tricloruro de antimonio
- Nitrato de plata
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de amonio
- Tartrato de sodio y potasio

- Sulfato cúprico
- 2,4-DNFH
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidroxilamina
- Cloruro férrico
- Permanganato de Potasio
- Etanol
- Agua Purificada
- TAT
- TSA
- SAB

4.3.2 Microorganismos

- *E.coli* ATCC 25922
- *S.aureus* ATCC 6538
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus niger* ATCC 16404

4.3.3 Materiales:

- Frascos de vidrio ámbar pequeños
- Vaso de precipitación
- Matraz
- Probeta

- Cajas petri
- Tubos de ensayo
- Cuchillo
- Micropipetas
- Agitador
- Parafilm
- Tijeras
- Recipientes de plástico
- Balanza
- Estufa
- Cronómetro

4.3.4 Equipos:

- Equipo de destilación.
 - Balón de 5 L.
 - Manta de calentamiento
 - Trampa Dean Stark con llave de teflón
 - Refrigerante de bolas
 - Mangueras

- Picnómetro
 - Picnómetro calibrado, con termómetro
 - Balanza Analítica

- IR.
 - Equipo Shimadzu IR
 - Celdas de Cloruro de Sodio
 - Porta celdas

4.4 Procedimiento Experimental

A continuación se describe la metodología que se sigue para realizar cada proceso.

4.4.1 Extracción del Aceite Esencial por HD

- Recolectar la planta en horas de la mañana, y llevarla al lugar donde se va a realizar la extracción del aceite esencial (limpiar la planta).
- Cortar la planta en trozos pequeños (alrededor de 3cm a 5cm), para facilitar la extracción del aceite esencial.
- Pesar la planta cortada y posteriormente lavarla.
- Colocar la planta en el balón de HD y agregar agua purificada.
- Armar el equipo de HD: manta de calentamiento (100°C), sobre la cual va el balón, conectado a la trampa de destilación Dean Stark, la cual servirá para separar el aceite esencial del resto de componentes de la planta y poderlo extraer; unida a la trampa de destilación Dean Stark se encontrará un refrigerante, que permitirá que el proceso se lleve a cabo,

ya que permite el cambio de temperaturas, para que el vapor pase a estado líquido. El proceso de destilación se llevar a cabo durante 2 horas.

- Recoger el aceite esencial en un frasco de vidrio color ámbar.
- Secar el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro.
- Almacenar el frasco a temperatura fría (4°C), hasta realizar las pruebas de caracterización.

En este proceso se realizan los cálculos para determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial mediante la ecuación 3.1.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para la obtención del aceite esencial de hierba luisa por HD:

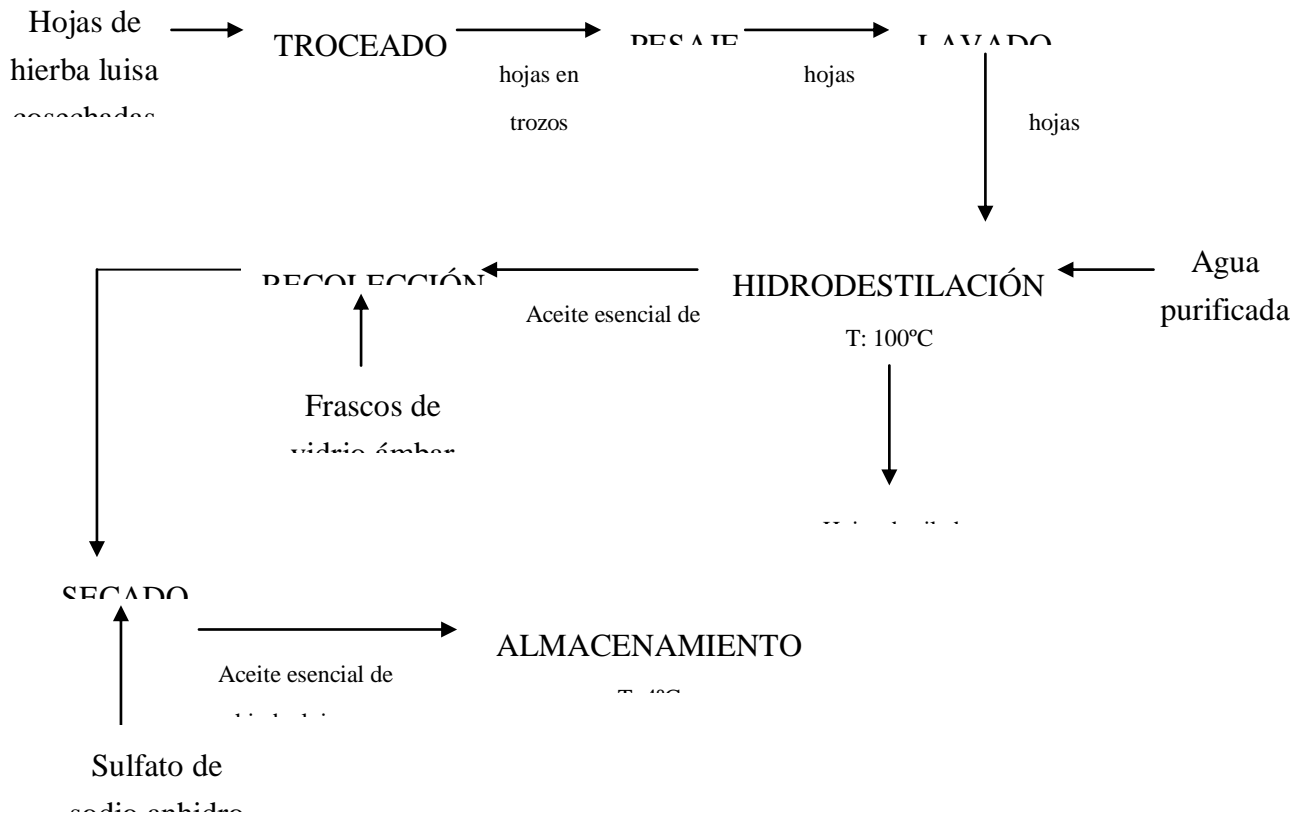


Gráfico 4.1 Diagrama de Flujo del proceso de extracción de aceite esencial de hierba luisa por HD
 ELABORADO POR: AUTORA

4.4.2 Características organolépticas del Aceite Esencial

- Colocar en un vaso de precipitación el aceite esencial de hierba luisa extraído.
- Determinar las características organolépticas: color, apariencia y olor

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar las características organolépticas del aceite esencial:

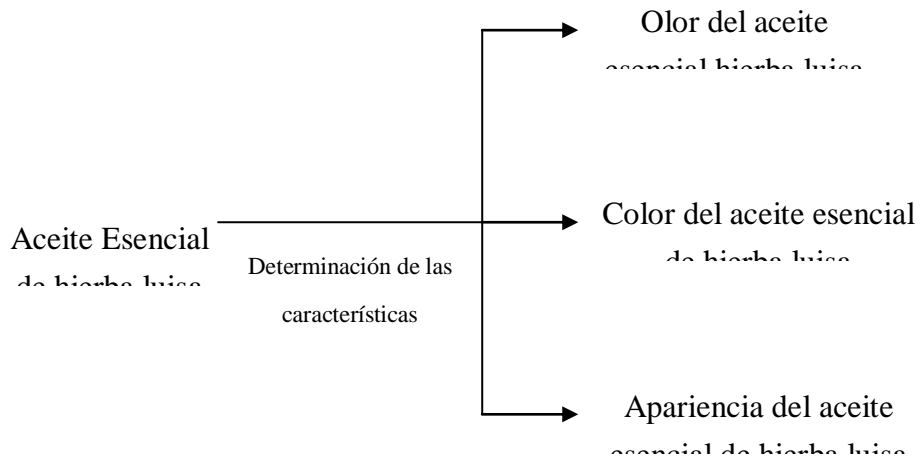


Gráfico 4.2 Diagrama de Flujo del proceso para determinar las características organolépticas del aceite esencial de hierba luisa
 ELABORADO POR: AUTORA

4.4.3 Determinación de la densidad del Aceite Esencial

- Secar bien el picnómetro y pesarlo en la balanza
- Llenar el picnómetro con agua purificada hasta la señal de enrase, ver que el termómetro este a 20°C y pesarlo en la balanza.
- Vaciar el picnómetro y llenar hasta el enrase con el aceite esencial cuya densidad se va a determinar.
- Calcular la masa del aceite esencial con la ecuación 3.3 y calcular la masa del agua con la ecuación 3.4.
- Determinar la densidad relativa del aceite esencial con la ecuación 3.6.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar la densidad relativa del aceite esencial:

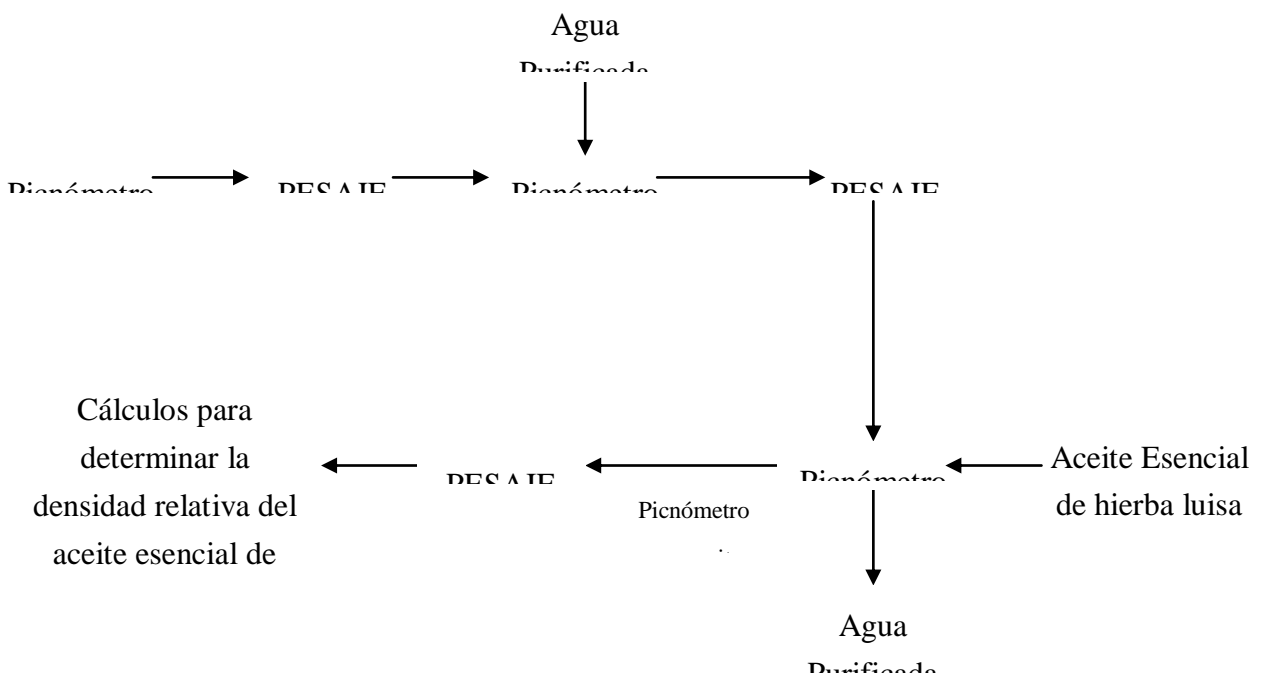


Gráfico 4.3 Diagrama de Flujo del proceso para determinar la densidad relativa del aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.4 Determinación del Índice de Refracción del Aceite Esencial

- Limpiar el prisma del refractómetro
- Colocar una o dos gotas de la muestra sobre el prisma. Cubrirlo con la tapa con cuidado. Al cerrar, la muestra debe distribuirse sobre la superficie del prisma
- Manipular los controles para enfocar los campos oscuros e iluminados.
- Leer el número correspondiente en la escala.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar el índice de refracción del aceite esencial:

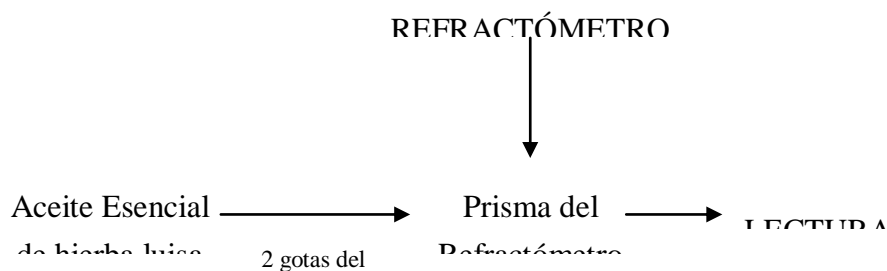


Gráfico 4.4 Diagrama de Flujo del proceso para determinar el índice de refracción del aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.5 Determinación del pH del Aceite Esencial

- Calibrar el peachímetro.
- Colocar el electrodo en el aceite esencial
- Leer en la pantalla el valor de pH determinado.
- Lavar el electrodo con agua purificada y colocarle el capuchón.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar el pH del aceite esencial:

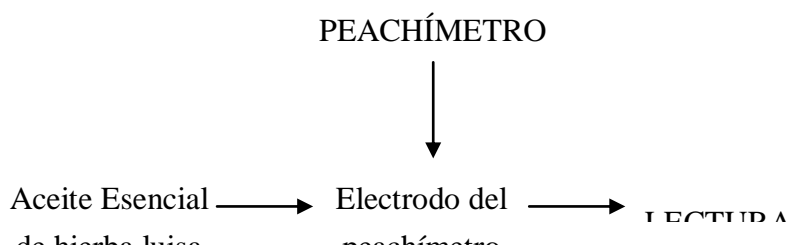


Gráfico 4.5 Diagrama de Flujo del proceso para determinar el pH del aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.6 Medición del espectro IR del Aceite Esencial

- Colocar las celdas de cloruro sodio en el porta celdas, para leer el blanco.
- Colocar 10µl de la muestra en las celdas de cloruro de sodio, y proceder a la lectura.
- Imprimir el espectro IR del aceite esencial obtenido.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para obtener el espectro IR del aceite esencial:

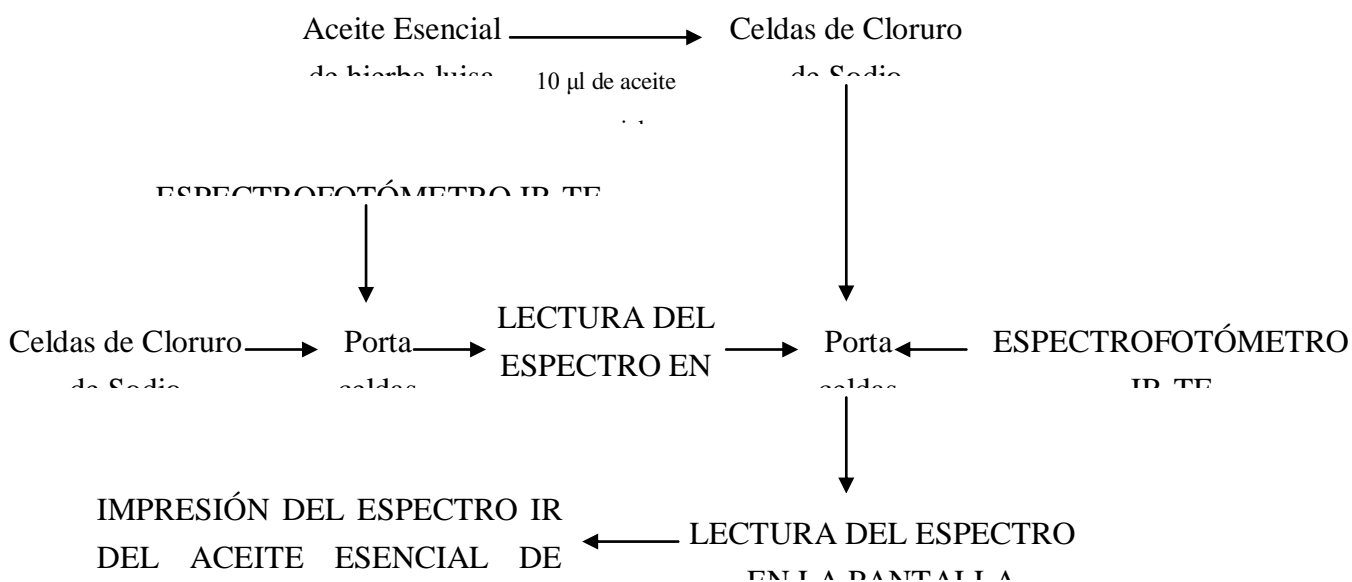


Gráfico 4.6 Diagrama de Flujo del proceso para obtener el espectro IR del aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial mediante pruebas de coloración

En el Anexo G se encuentra la preparación de los reactivos utilizados en las pruebas de coloración.

4.4.7.1 Presencia de grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas (Prueba de Brady):

- Colocar en un tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 4 gotas de 2,4-DNFH.
- Llevar a baño maría por 5min.
- Observar si se forma un precipitado rojo, anaranjado o amarillo, indicará que la prueba es positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo de Aldehídos y Cetonas en el aceite esencial:

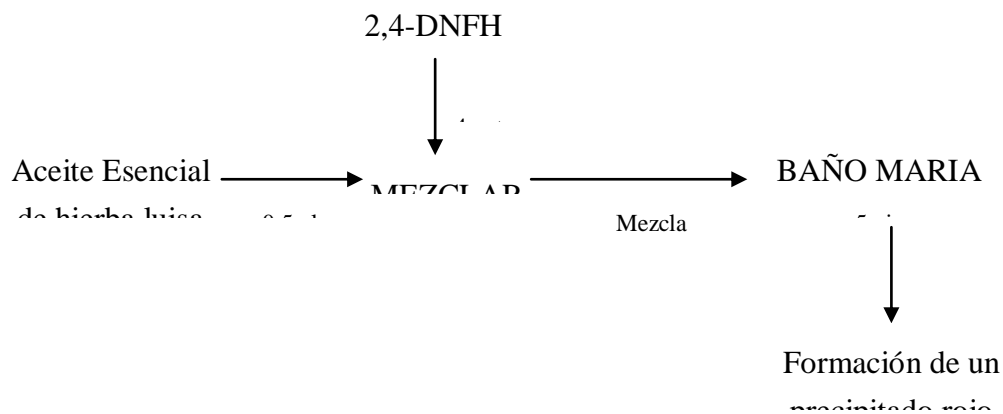


Gráfico 4.7 Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído y cetona en el aceite esencial de hierba luisa

ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.2 Presencia del grupo carbonilo de aldehído:

4.4.7.2.1 Prueba de Tollens

- Colocar en tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 5 gotas del reactivo de Tollens, agitar.

- Si no ocurre reacción, calentar el tubo a baño maría, sin dejar de agitar durante el calentamiento.
- La aparición de un espejo de plata indica prueba positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del Aldehído en el aceite esencial:

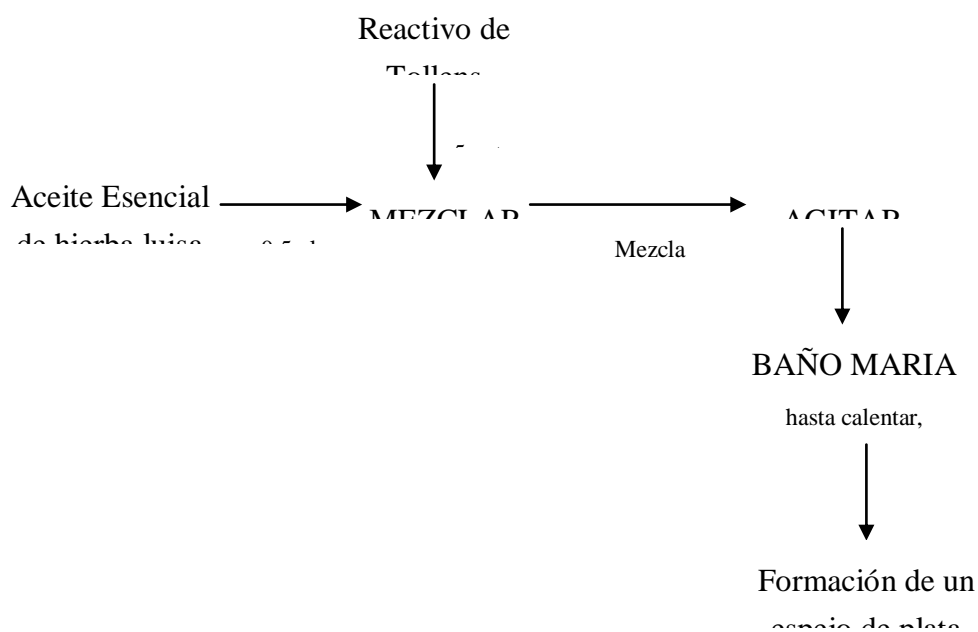


Gráfico 4.8 Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.2.2 Prueba de Fehling

- Colocar en un tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 5 gotas de la solución A y 5 gotas de la solución B, agitar.
- Calentar el tubo a baño maría.

- La aparición de un precipitado indica prueba positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del Aldehído en el aceite esencial:

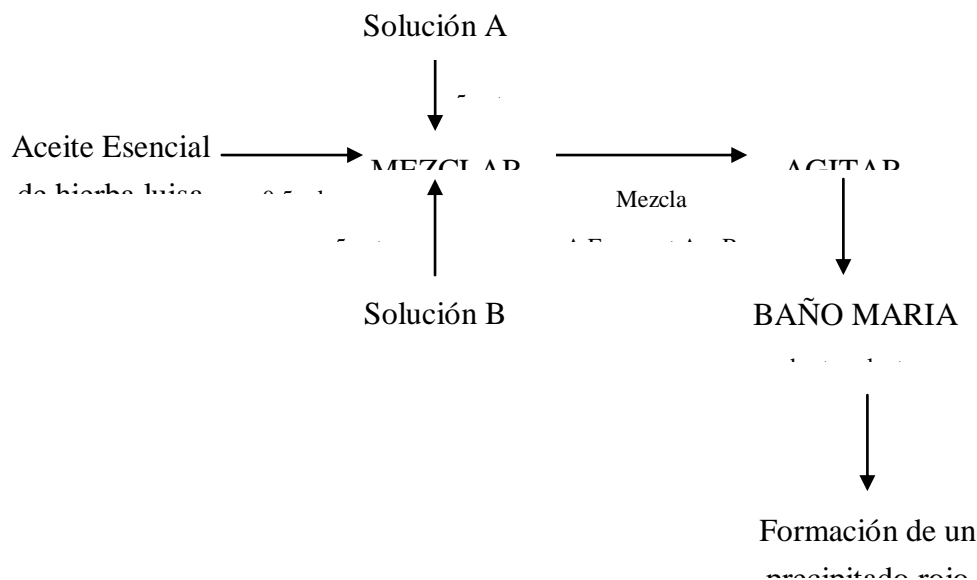


Gráfico 4.9 Diagrama de Flujo del proceso para identificar el grupo carbonilo del aldehído en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.3 Presencia de Esteres:

- Colocar en un tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 4 gotas de la solución alcalina de hidroxilamina, añadir 1gota de FeCl_3 .
- Observar si se forma una solución púrpura o roja, indicativo de que la prueba es positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificarla presencia de esterés en el aceite esencial:

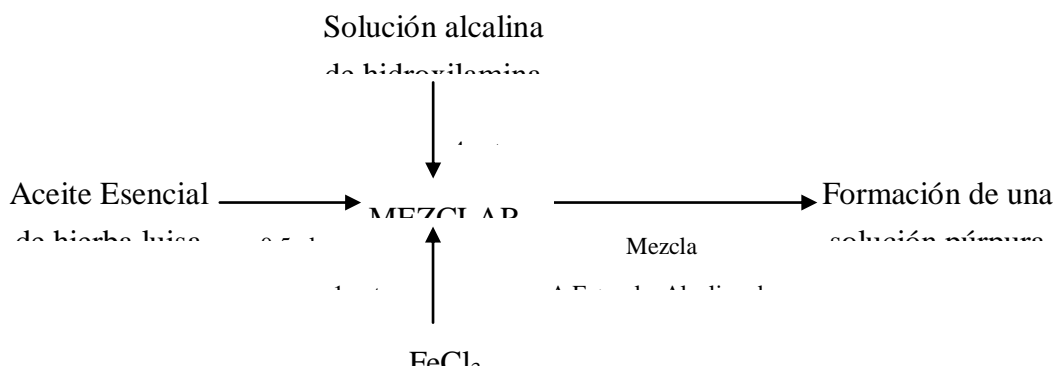


Gráfico 4.10 Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de esteres en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.4 Presencia de Fenoles:

- Colocar en tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 2 gotas de la solución de FeCl₃.
- Observar si se forma una solución azul verdusca, roja verdusca o violeta verdusca, indicativo de que la prueba es positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificarla presencia de fenoles en el aceite esencial

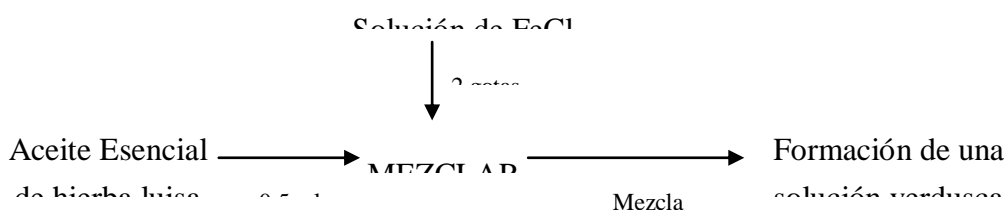


Gráfico 4.11 Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de fenoles en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.5 Presencia de Insaturaciones (Prueba de Bayer):

- Colocar en un tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 2 gotas de la solución de KMnO_4 .
- Observar si se forma un precipitado café, indicativo de que la prueba es positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificarla presencia de insaturaciones en el aceite esencial:

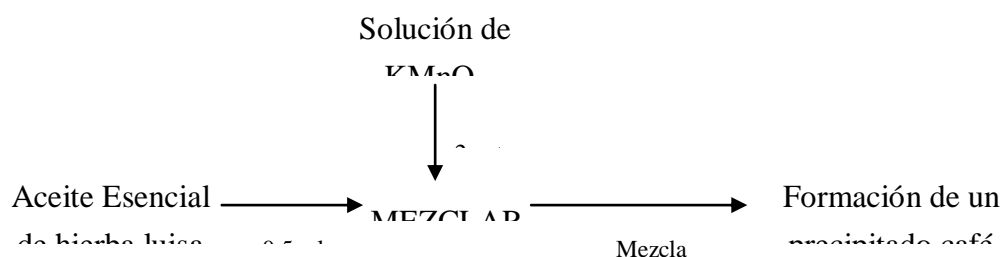


Gráfico 4.12 Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de insaturaciones en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.7.6 Presencia de compuestos aromáticos (triterpenos):

- Colocar en un tubo de ensayo 0.5ml de aceite esencial y 2 gotas de la solución de tricloruro de antimonio.
- Observar si se forma un precipitado rojizo, indicativo de que la prueba es positiva.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para identificarla presencia de insaturaciones en el aceite esencial:

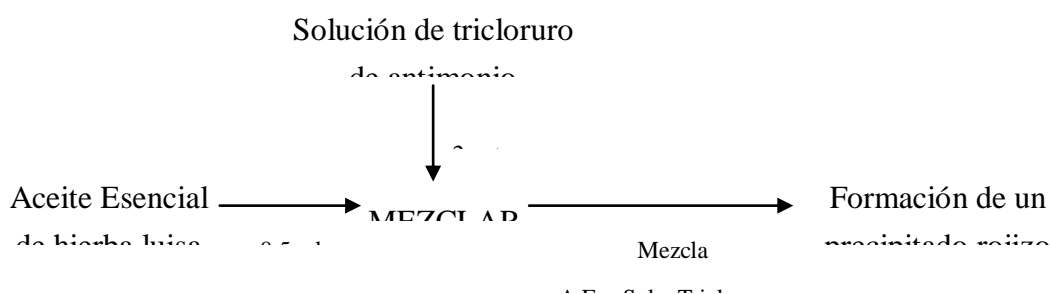


Gráfico 4.13 Diagrama de Flujo del proceso para identificar presencia de compuestos aromáticos en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.8 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial

En el Anexo H se encuentra la preparación de los medios de cultivo utilizados en las siguientes pruebas:

4.4.8.1 Preparación de la muestra:

- Colocar en un tubo de ensayo 1ml de la muestra y 9ml de TAT.
- Agitar el tubo por 15 a 16 minutos en un agitador.

4.4.8.2 Prueba para determinar aerobios totales, mohos y levaduras

- Pasar 1 ml del tubo de ensayo con la muestra a cuatro cajas petri
- Añadir en dos cajas 15 a 20ml del medio TSA.
- Añadir en las otras dos cajas petri 15 a 20ml del medios SAB
- Agitar de forma que se permita una homogenización de la muestra con el medio de cultivo
- Dejar que el medio se solidifique a temperatura ambiente
- Incubar las cajas de TSA en forma invertidas en una estufa de 2 a 4 días a una temperatura de $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Incubar las cajas de SAB en forma invertida por 5 a 7 días a una temperatura de $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Examinar las cajas petri cada 24 horas y determinar si existe crecimiento
- Si existe crecimiento calcular con la ecuación 3.10
- Si no existe desarrollo en ninguna de las cajas reportar como $< 10 \text{ ufc/ ml}$

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar patógenos en el aceite esencial:

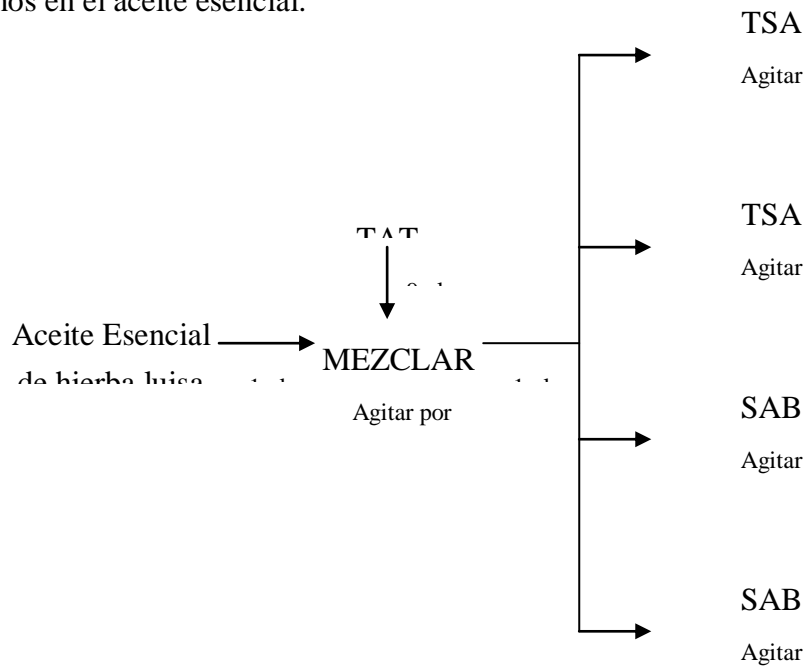


Gráfico 4.14 Diagrama de Flujo del proceso para determinar patógenos en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.8.3 Prueba para *S. aureus* y *E. coli*

- Incubar la botella con el medio TAT, de 16 a 24 horas a una temperatura de $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Con asa estéril, sembrar en el medio VJ *Staphylococcus aureus* y en EMB *Escherichia coli*
- Incubar cada una de las cajas por 24 horas a una temperatura $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$
- Realizar la lectura
- Si existe crecimiento realizar las pruebas de identificación
- Si no existe crecimiento reportar como ausencia.

A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para determinar la presencia de *S. aureus* y *E. coli* en el aceite esencial:

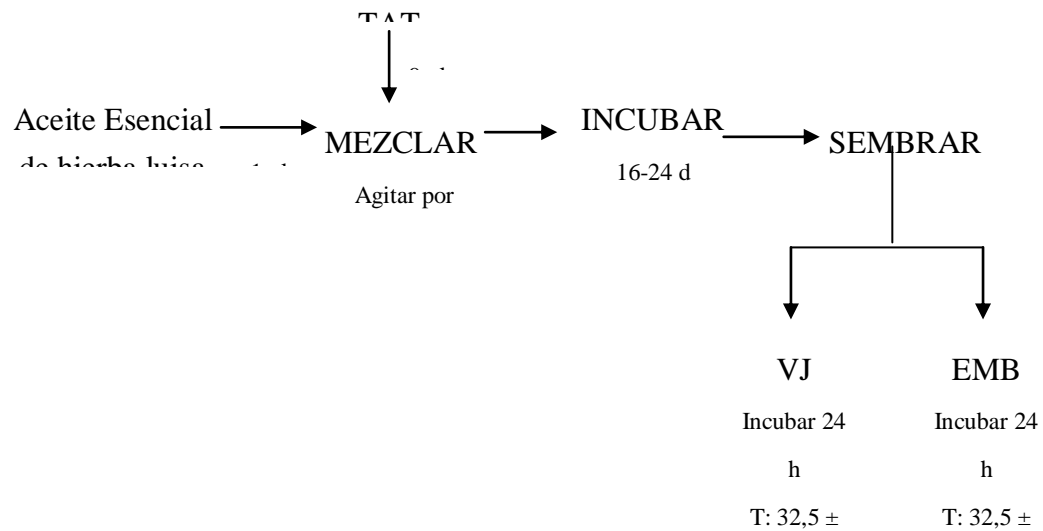


Gráfico 4.15 Diagrama de Flujo del proceso para determinar patógenos en el aceite esencial de hierba luisa
ELABORADO POR: AUTORA

4.4.9 Pruebas para determinar la actividad del Aceite Esencial

4.4.9.1 Fase de adaptación de los microorganismos:

- Colocar cada cepa ATCC liofilizada en tubos de ensayo que contienen caldo TSB.
 - *E.coli* ATCC 25922 (bacteria)
 - *S.aureus* ATCC 6538 (bacteria)
 - *Candida albicans* ATCC 10231 (levadura)
 - *Aspergillus niger* ATCC 16404 (hongo)

- Incubar durante 24 horas, a temperatura de $35 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ las bacterias y la levadura. Incubar durante 48 a 72 horas a temperatura de $20 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$ el hongo.
- Sembrar las cepas ATCC en cajas petri que contienen los medios:
 - o TSA para *E.coli*, *S. aureus* y
 - o SAB para *C.albicans*, *A. níger*.
- Incubar en forma invertida las cajas petri durante 24 horas a temperatura de $35 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$. para *E.coli*, *S. aureus* y *C .albicans*,
- Incubar en forma invertida las cajas de SAB con *A.níger*, durante 48 a 72 horas a temperatura de $20 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$.
- Ver si existe crecimiento.

A continuación se presenta un diagrama de flujo de la fase de adaptación de los microorganismos:

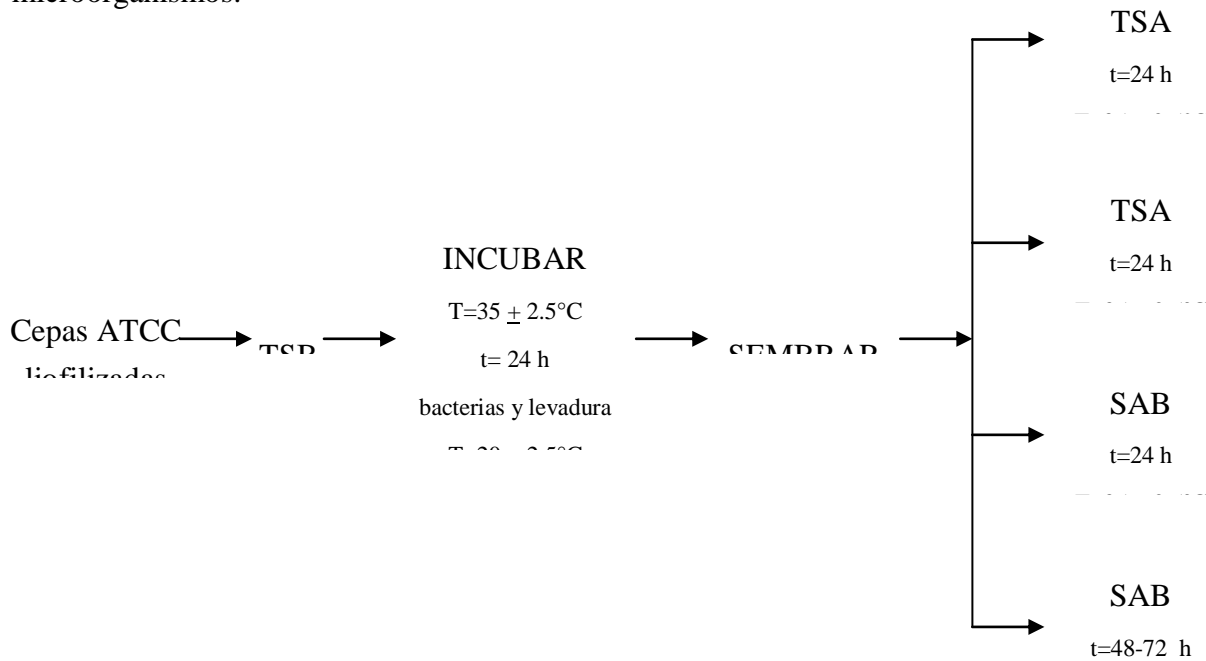


Gráfico 4.16 Diagrama de Flujo de la fase de adaptación de los microorganismos
 ELABORADO POR: AUTORA

4.9.9.2 Fase de crecimiento de los microorganismos:

- En cajas petri que contienen el medio TSA sembrar las cepas *de E.coli* y *S. aureus*, y en el medio SAB sembrar *C. albicans*, e incubar durante 24 horas a temperatura $35 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$.
- En cajas petri que contienen el medio SAB, sembrar las cepas de *A. niger*, e incubar durante 48 a 72 a temperatura $20 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$
- Ver si existe crecimiento
- Sembrar de cada cepa ATCC en tubos de ensayo que contienen caldo TAT, e incubar para bacterias y levaduras durante 24 horas a temperatura $35 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, la cepa ATCC de hongos incubar por 48 horas a temperatura de $20 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$
- Nuevamente sembrar en cajas petri que contienen el medio TSA las cepas *de E.coli* y *S. aureus*, en SAB *C. albicans*, incubar durante 24 horas a temperatura $35 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, y en cajas petri que contienen el medio SAB sembrar las cepas de *A. nígere* incubar por 48 horas a 72 horas a temperatura de $20 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$.
- Ver si existe crecimiento

A continuación se presenta un diagrama de flujo de la fase de crecimiento de los microorganismos:

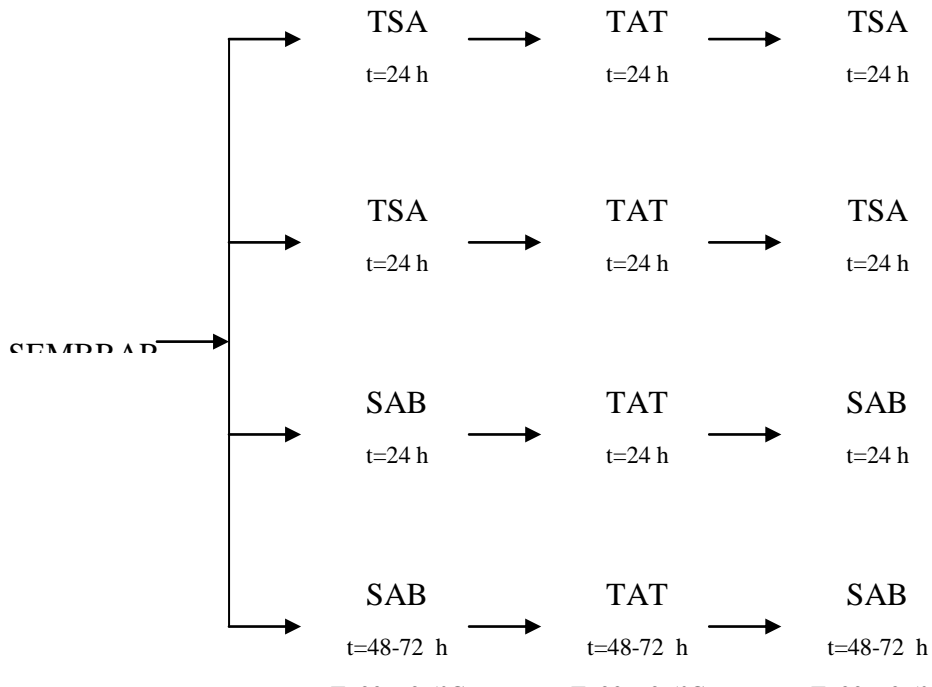


Gráfico 4.17 Diagrama de Flujo de la fase de crecimiento de los microorganismos
ELABORADO POR: AUTORA

4.9.9.3 Prueba para determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de Aceite Esencial:

- Utilizar los tubos de TAT con los microorganismos listos del paso fase de crecimiento
- Colocar en tubos de ensayo que contienen TAT cada uno de los microorganismos a trabajar hasta llegar a una escala Mc. Farland 0,5
- Realizar controles de cada tubo, y de cada caja.
- Dividir cada caja petri en 4 mitades.
- En tubos de ensayo colocar 500µl de TAT con cepas ATCC a escala de Mc. Farland 0.5 y 500µl de aceite esencial.

- Encender el Cronometro
- Sembrar con aza por estriado las cepas ATCC de bacterias con aceite esencial en TSA a: 1min., 2min., 5min. y 10min., e incubar durante 24 horas a temperatura $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.
- Sembrar con aza por estriado las cepas ATCC de hongo y levadura con aceite esencial en el medio SAB a: 1min., 2min., 5min. y 10min., e incubar durante 24 horas la levadura a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ y el hongo durante 48 a 72 horas a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$
- Realizar la correspondiente lectura.
- Si existe crecimiento reportar como positivo en el tiempo encontrado el desarrollo del microorganismo.

En el Anexo I se encuentra la preparación de la escala Mc. Farland.

A continuación se presenta un diagrama de flujo de la fase del proceso para determinar la actividad del aceite esencial:

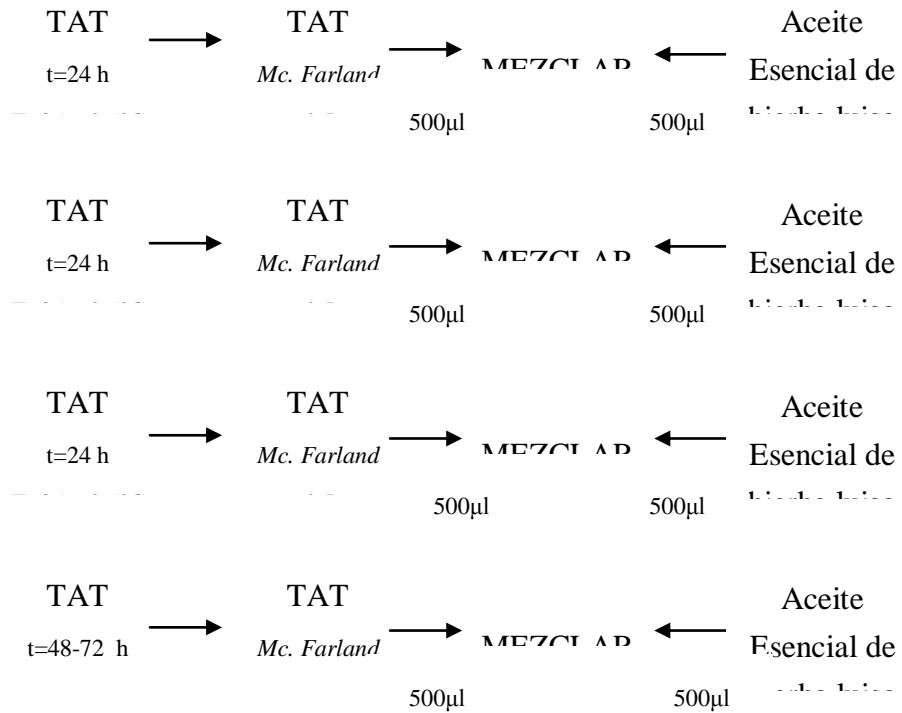


Gráfico 4.18-a Diagrama de Flujo para determinar la actividad del aceite esencial
 ELABORADO POR: AUTORA

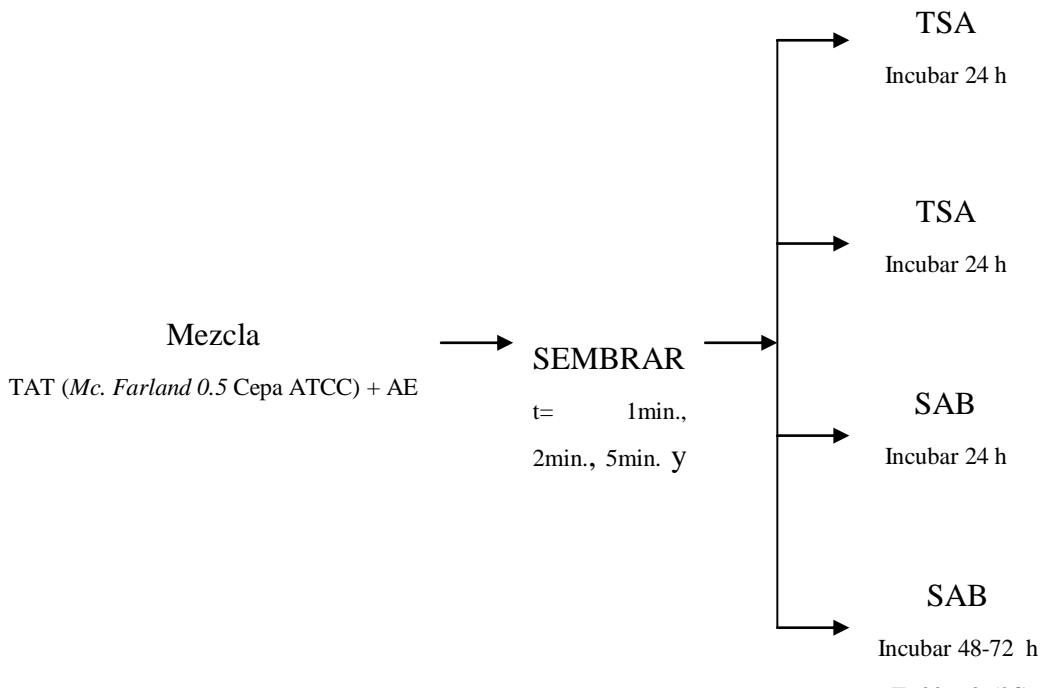


Gráfico 4.18-b Diagrama de Flujo para determinar la actividad del aceite esencial

ELABORADO POR: AUTORA

V. RESULTADOS

5.1 Rendimiento del aceite esencial extraído:

En el Anexo C.2 podemos ver fotografías sobre el proceso de extracción del aceite esencial de hierba luisa. A continuación en la Tabla 5.1 se indica el porcentaje de rendimiento que se obtuvo del aceite esencial recolectado.

Tabla 5.1 Rendimiento del aceite esencial de hierba luisa

INDICADORES	1	2	3	4	5	6
Fecha extracción	07/05/2006	20/05/2006	26/05/2006	03/06/2006	17/06/2006	24/06/2006
Peso de la planta (g.)	1820	1720	2020	2020	2020	1700
Cantidad de aceite(ml.)	13	11	30	24	23,8	19
Rendimiento (%)	0,714	0,640	1,485	1,188	1,178	1,118

ELABORADO POR: Autora

Como se ve en Tabla 5.1 el aceite esencial fue extraído en 6 épocas distintas. De cada muestra se obtuvo el porcentaje de rendimiento, y se realizó un promedio de los rendimientos correspondientes a los indicadores 3, 4 y 5. Se tiene como resultado que de 2020g de hojas de hierba luisa se obtienen 25,93ml de aceite esencial, cuyo rendimiento es de 1,284%

5.1.1 Cálculos:

Peso de la planta: $2020+2020+2020 = 6060$

$$2020 / 3 = \mathbf{2020g}$$

Cantidad de aceite: $30+24+23,8 = 77,80$

$$77,8 / 3 = \mathbf{25,93ml}$$

Rendimiento del aceite esencial:

$$1: \frac{13}{1820}100 = 0,714\% \quad 2: \frac{11}{1720}100 = 0,640\% \quad 3: \frac{30}{2020}100 = 1,485\%$$

$$4: \frac{24}{2020}100 = 1,188\% \quad 5: \frac{23,8}{2020}100 = 1,178\% \quad 6: \frac{19}{1700}100 = 1,118\%$$

$$T: \frac{25,93}{2020}100 = 1,284\%$$

5.2 Características Organolépticas del aceite esencial de hierba luisa:

En el Anexo C.3 podemos ver una fotografía en la cual se aprecian algunas características organolépticas del aceite. A continuación en la Tabla 5.2 se indica las características organolépticas del aceite esencial recolectado.

Tabla 5.2 Características Organolépticas del aceite esencial de hierba luisa

INDICADORES	1	2	3	4	5	6	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	TRANSPARENTE
Color	Amarillo Pálido	Amarillo Pálido	Amarillo Pálido	Amarillo Pálido	Amarillo Pálido	Amarillo Pálido	AMARILLO PÁLIDO
Olor	Fuerte olor a limón	Fuerte olor a limón	Fuerte olor a limón	Fuerte olor a limón	Fuerte olor a limón	Fuerte olor a limón	FUERTE OLOR A LIMÓN

ELABORADO POR: Autora

El aceite esencial posee un fuerte olor a limón. La apariencia del aceite esencial es transparente, y el color del aceite es amarillo pálido.

5.3 Densidad, Índice de Refracción y pH del aceite esencial de hierba luisa:

En los Anexos C.4, C.5 y C.6 podemos ver fotografías de los procesos para calcular la densidad, el índice de refracción y el pH del aceite. A continuación en la Tabla 5.3 se indica los valores calculados de la densidad, el índice de refracción y el pH del aceite esencial recolectado.

Tabla 5.3 Densidad, Índice de Refracción y pH del aceite esencial de hierba luisa

INDICADORES	1	2	3	4	5	6	ESPECIFICACIONES
Densidad Relativa (20°C)	0,8793	0,8978	0,8892	0,8886	0,8743	0,8859	0,8859
Índice de Refracción (20°C)	1,485	1,477	1,483	1,478	1,477	1,478	1,480
pH	5,00	5,36	5,19	5,51	5,50	5,65	5,37

ELABORADO POR: Autora

A cada muestra se le determinó:

- Densidad relativa, posteriormente se realizó un promedio de las 6 densidades relativas obtenidas. Se tiene como resultado que la densidad relativa del aceite esencial de hierba luisa es de 0,8859.
- Índice de refracción, posteriormente se realizó un promedio de los 6 índices de refracción obtenidos. Se tiene como resultado que el índice de refracción del aceite esencial de hierba luisa es de 1,480
- pH, posteriormente se realizó un promedio de los 6 pH obtenidos. Se tiene como resultado que el pH del aceite esencial de hierba luisa está en el rango de 5,00 – 6,00.

5.3.1 Cálculos:

$$\text{Densidad Relativa: } 0,8793+0,8978+0,8892+0,8886+0,8743+0,8859 = 5,3151$$

$$5,3151 / 6 = \mathbf{0,8859}$$

$$\text{Índice de Refracción: } 1,485+1,477+1,483+1,478+1,477+1,478 = 8,878$$

$$8,878 / 6 = \mathbf{1,480}$$

$$\text{pH: } 5,00+5,36+5,19+5,51+5,50+5,65 = 32,21$$

$$32,21 / 6 = \mathbf{5,37}$$

5.4 Espectro IR del aceite esencial de hierba luisa:

En el Anexo C.7 podemos ver fotografías del equipo que se utilizó para obtener el espectro IR del aceite. En el Anexo C.8 tenemos el espectro IR obtenido del aceite esencial.

A cada muestra se realizó la medición del espectro IR, posteriormente se analizó cada espectro y se determinaron los grupos funcionales presentes.

Se tiene como resultado que los grupos funcionales presentes en el aceite esencial de hierba luisa son:

- **Grupo C – H:** Se observa una flexión C-H en la zona de 1440cm^{-1}
- **Grupo C=C de alqueno:** Se puede observar una banda de vibración de tensión en la zona de 1620cm^{-1} de estiramiento
- **Grupo Carbonilo (C=O):** La espectroscopia IR es el método más seguro para reconocer la presencia del grupo carbonilo en la molécula de “Citral” , ya que se puede observar un banda muy intensa y definida de absorción, debido a la vibración de tensión del grupo carbonilo en la zona de 1695 a 1717cm^{-1} . Por ser un estereoisómero* la banda está un poco desplazada.
- **Grupo C – H aldehídico:** Se puede observar una banda de alargamiento del hidrógeno del aldehído característica en la zona 2820cm^{-1} .

* **Estereoisómero:** Es un isómero de una molécula que tiene las mismas conexiones átomo a átomo que dicha molécula, pero difiere en la orientación espacial de los mismos.¹¹⁶

* **Isómeros:** Son moléculas con la misma fórmula química, pero en el que los átomos están dispuestos de diferente forma.¹¹⁹

- **Grupo C – H de alcano:** Se puede observar una banda de alargamiento en la zona de $2850 - 3000\text{cm}^{-1}$.
- **Grupo C – H de alqueno:** Se puede observar una tensión en la zona de $3080 - 3140\text{cm}^{-1}$.
- No posee bandas pronunciadas a campos bajos lo que demuestra que no es un compuesto aromático.

5.5 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial mediante pruebas de coloración

En el Anexo C.9 podemos ver fotografías que indican la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales en el aceite. A continuación en la Tabla 5.4 se indica la ausencia o presencia de algunos grupos funcionales.

Tabla 5.4 Caracterización de grupos funcionales del Aceite Esencial de hierba luisa

INDICADORES	1		2		3		4		5		6		ESPECIFICACIONES
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	
Presencia de Aldehídos y Cetonas													
Formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas (test de Brady).	X		X		X		X		X		X		El aceite esencial presenta grupos carbonilos de aldehídos y cetonas.
Carbonilos de aldehídos:													
Prueba de Tollens	X		X		X		X		X		X		El aceite esencial presente grupos carbonilos de aldehídos

INDICADORES	1		2		3		4		5		6		
Carbonilos de aldeídos:	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	ESPECIFICACIONES
Prueba de Fehling	X		X		X		X		X		X		El aceite esencial presenta grupos carbonilos de aldeídos
Presencia de Ésteres	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	ESPECIFICACIONES
Solución alcalina de hidroxilamina con FeCl ₃		X		X		X		X		X		X	El aceite esencial no presenta ésteres con grupos aromáticos
Presencia de Fenoles	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	ESPECIFICACIONES
Solución de FeCl ₃		X		X		X		X		X		X	El aceite esencial tiene ausencia de grupos fenoles
Presencia de Insaturaciones (dobles enlaces)	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	ESPECIFICACIONES

INDICADORES	1		2		3		4		5		6		
Solución de KMnO ₄	X		X		X		X		X		X		El aceite esencial presenta insaturaciones (dobles enlaces).
Presencia de compuestos aromáticos (triterpenos)	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	ESPECIFICACIONES
Solución de tricloruro de antimonio		X		X		X		X		X		X	El aceite esencial no presenta triterpenos

ELABORADO POR: Autora

P= POSITIVO

N=NEGATIVO

A cada muestra de aceite esencial se le realizaron las pruebas de coloración, obteniéndose:

- Formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas (test de Brady): Prueba positiva, se observó la formación de un precipitado rojo. Lo cual indica que las moléculas poseen un grupo carbonilo de un aldehído o de una cetona, la reacción de oxidación se produjo inmediatamente sin necesidad del baño maría.

- Prueba de Tollens: Prueba positiva, formación de un espejo de plata en la base del tubo de ensayo. Indicativo de que en el aceite esencial existen moléculas que poseen grupos carbonilos de aldehídos.

- Prueba de Fehling: Prueba positiva, formación de un precipitado rojo. Indicativo de que en el aceite esencial existen moléculas que poseen grupos carbonilos de aldehídos.
- Solución alcalina de hidroxilamina con FeCl_3 : Prueba negativa, no existió cambio del color de la solución a púrpura o rojo. Indicativo de que el aceite esencial no tiene presencia de ésteres con núcleo aromático.
- Solución de FeCl_3 : Prueba negativa, no cambio el color de la solución. Indicativo de ausencia de grupos fenoles en el aceite esencial.
- Solución de KMnO_4 : Prueba positiva, formación de un precipitado café oscuro en fondo del tubo. Indicativo de que las moléculas presentes en el aceite esencial poseen dobles enlaces.
- Solución de tricloruro de antimonio: Prueba negativa, no se formó un precipitado rojo. Indicativo de que el aceite esencial no existe moléculas triterpenoides, debido a que en la extracción por arrastre con vapor, los triterpenos son compuestos pesados y son difícilmente arrastrados por la corriente de vapor.

5.6 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial

En el Anexo C.10 podemos ver fotografías que indican la ausencia de patógenos en el aceite esencial de hierba luisa. A continuación en la Tabla 5.5 se indica los resultados que se obtuvieron.

Tabla 5.5 Pruebas para determinar patógenos en el Aceite Esencial de hierba luisa

INDICADORES	1		2		3		4		5		P
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	
Bacterias		X		X		X		X		X	
Mohos y Levaduras		X		X		X		X		X	
Patógenos		X		X		X		X		X	

ELABORADO POR: Autora

P= POSITIVO

N=NEGATIVO

A cada muestra se le realizaron las pruebas de patógenos. Se tiene como resultado que el aceite esencial no presenta patógenos.

5.7 Prueba para determinar la actividad antimicótica y antibacteriana de Aceite Esencial:

En el Anexo C.11 podemos ver fotografías que indican la actividad antimicótica y antibacteriana del aceite esencial de hierba luisa. A continuación en la Tabla 5.6; 5.7; 5.8 y 5.9 se indican los resultados que se obtuvieron.

Tabla 5.6 Determinación de la actividad antibacteriana del Aceite Esencial de hierba luisa contra *E. coli*

<i>E. coli</i> ATCC 25922	1min.		2min		5min.		10min.		ESPECIFICACIONES
	P	N	P	N	P	N	P	N	
F1	X		X		X			X	A los 10 minutos el aceite esencial de hierba luisa muestra actividad antibacteriana ya que inhibe el crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i>
F2	X		X		X			X	
F3	X		X		X			X	
F4	X		X		X			X	
F5	X		X		X			X	
F6	X		X		X			X	

ELABORADO POR: Autora

Tabla 5.7 Determinación de la actividad antibacteriana del Aceite Esencial de hierba luisa contra *S. aureus*

<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1min.		2min		5min.		10min.		ESPECIFICACIONES
	P	N	P	N	P	N	P	N	
F1	X		X		X			X	A los 10 minutos el aceite esencial de hierba luisa muestra actividad antibacteriana ya que inhibe el crecimiento de la bacteria <i>S. aureus</i>
F2	X		X		X			X	
F3	X		X		X			X	
F4	X		X		X			X	
F5	X		X		X			X	
F6	X		X		X			X	

ELABORADO POR: Autora

Tabla 5.8 Determinación de la actividad antimicótica del Aceite Esencial de hierba luisa contra *C. albicans*

<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1min.		2min		5min.		10min.		ESPECIFICIDAD
	P	N	P	N	P	N	P	N	
F1		X		X		X		X	El aceite de hierba luisa es importante para la actividad antimicótica ya que inhibe el crecimiento de la levadura desde el primer día.
F2		X		X		X		X	
F3		X		X		X		X	
F4		X		X		X		X	
F5		X		X		X		X	
F6		X		X		X		X	

ELABORADO POR: Autora

Tabla 5.9 Determinación de la actividad antimicótica del Aceite Esencial de hierba luisa contra *A. niger*

<i>A. niger</i> ATCC 16404	1min.	2min	5min.	10min.	ESPECIFICIDAD
----------------------------	-------	------	-------	--------	---------------

	P	N	P	N	P	N	P	N	
F1		X		X		X		X	El aceite hierba luisa importante antimicótica inhibe el cre hongo <i>A. n</i> primer minu
F2		X		X		X		X	
F3		X		X		X		X	
F4		X		X		X		X	
F5		X		X		X		X	
F6		X		X		X		X	

ELABORADO POR: Autora

P= POSITIVO

N=NEGATIVO

A cada muestra se les realizó las pruebas para determinar la actividad antibacteriana y antimicótica. Se tiene como resultado que el aceite esencial de hierba luisa es un potente antimicótico ya que inhibe el desarrollo de hongos y levaduras en un tiempo muy corto. También se demostró que posee actividad antibacteriana pero inhibe el desarrollo de las bacterias es un tiempo más largo.

VI. DISCUSIÓN

De acuerdo con los análisis y los datos obtenidos en la parte experimental que se indican en la Tabla 5.2, el mejor método para extraer el aceite esencial de las hojas de hierba luisa es a través de una destilación por arrastre con vapor, ya que no se modifican las características organolépticas del aceite esencial.

El rendimiento del aceite esencial varía con la época de recolección de la planta y siendo las fechas de cosecha y extracción distintas con espacios largos de tiempo, el rendimiento es variable dependiendo de la temperatura ambiental durante este proceso y debido a que al poseer compuestos con elevada volatilidad éste se va perdiendo en el aire. Además que en la fase de lavado de la planta también existe una pequeña pérdida de aceite esencial. Cabe señalar que solo se pudo sacar una comparación del rendimiento del aceite esencial de 3 indicadores, como se observa en la Tabla 5.1 ya que solo en esas fechas se recolectó la misma cantidad en peso de las hojas de hierba luisa, debido a que el huerto medicinal del cual se cosechó la planta era muy pequeño y en las otras fechas no existía la suficiente cantidad de planta. Es muy importante señalar que este dato de rendimiento del aceite esencial no forma parte de los objetivos que se trazaron para esta investigación.

Hay que señalar que en nuestro país en este año el clima ha variado mucho y que el mismo día se tiene clima calido en la mañana y en la tarde el clima es frío, o viceversa, dicho factor también afecta mucho en el rendimiento del aceite esencial, debido a que la planta genera más aceite esencial en clima cálido, mientras que en clima frío aumenta la cantidad de agua en las hojas, disminuyendo la producción del aceite

esencial.

Las pruebas de coloración y el análisis del Espectro IR del aceite esencial indican la presencia de un compuesto que posee un grupo carbonilo libre y de acuerdo con la bibliografía corresponde a la molécula de citral el mismo que está presente en concentraciones altas, este aldehído se encuentra junto a otros compuestos con grupos funcionales diferentes presentes en menor concentración.

El análisis de Espectroscopia de Masas que se encuentra en el Anexo I el cual fue realizado por ingenieros del Laboratorio de Espectroscopia de Masas de la Universidad Salesiana, muestra que en la composición del aceite esencial están presentes los siguientes compuestos: 1R β -pineno, linalol, trans crisanterma, β citral, lemonol, citral c, geranil acetato. Estos compuestos juntos le dan la actividad antimicrobiana que posee el aceite esencial de hierba luisa. Algunos datos que se obtienen en la bibliografía de otros estudios que se le han realizado al aceite esencial de hierba luisa, indican el que la molécula de citral sola no actúa como antimicrobiana.

En nuestro país se tienen huertos con plantas medicinales, para usarlas diariamente en productos de consumo popular en las comúnmente llamadas “aguitas de vieja”, si se explotara y aprovechara todas las propiedades que tienen estas plantas, se obtendrían productos 100% naturales que nos sirvan como en el caso de este aceite esencial de hierba luisa que puede ser utilizado como desinfectantes.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones:

- El aceite esencial de hierba luisa obtenido mediante destilación por arrastre con vapor conservó todas sus características organolépticas durante cuatro meses, almacenándolo a 4°C y con protección de la luz ultravioleta del sol.
- El aceite esencial de hierba luisa presenta altas concentraciones del aldehído citral que junto con otras moléculas con grupos funcionales en menores proporciones: β -pineno, linalol, trans crisanterma, lemonol, geranil acetato, le dan la actividad antimicrobiana que posee el aceite esencial.
- El aceite esencial de hierba luisa posee una mayor actividad antimicótica que antibacteriana, ya que inhibió totalmente el crecimiento de la levadura *C. albicans* ATCC 10231 y del hongo *A. nigers* ATCC 16404.
- El aceite esencial extraído de la planta de hierba luisa ecuatoriana posee una alta actividad antimicótica inhibiendo el crecimiento de la levadura *C. albicans*, a diferencia de los datos obtenidos en la bibliografía del aceite esencial proveniente de la planta de hierba luisa cubana que no inhibe el crecimiento de este microorganismo.

- El porcentaje de rendimiento del aceite esencial de hierba luisa varía entre los meses de Mayo (0,714% - 1,485%) a Junio (1,188% - 1,178%), debido a factores como las condiciones climáticas al momento de la cosecha las cuales iban variando de templado-húmedo a cálido-húmedo, o viceversa, la cantidad de planta recolectada y el tiempo que transcurrió desde que la planta fue cosechada hasta el momento de la destilación. Siendo el clima más apto para cosechar la planta de hierba luisa el cálido-húmedo (dato obtenido en la bibliografía)
- Los datos obtenidos en el aceite esencial de hierba luisa de: densidad relativa, índice de refracción y pH concuerdan con los datos encontrados en la bibliografía.
- La investigación del aceite esencial de hierba luisa es muy importante para la obtención de productos 100% naturales como antimicrobiales, pero debido a factores económicos este proyecto se ve limitado al estudio de la planta cultivada en la Sierra Ecuatoriana.

7.2 Recomendaciones:

- Se debe destilar las hojas de hierba luisa el mismo día que se las cosecho para evitar disminución en el rendimiento del aceite esencial.
- Se debe limpiar la planta antes de pesarla, para evitar contaminantes.

- Controlar la temperatura a la cual va a ser extraído el aceite esencial para evitar que este pierda sus características organolépticas.
- Las condiciones de almacenamiento deben ser apropiadas como bajas temperaturas y protegidos de los rayos UV para evitar reacciones que cambien las características propias del aceite por un periodo determinado de tiempo.
- No se aconseja el consumo (oral o cutáneo) del aceite esencial puro, pues constituye un producto de alta concentración y puede ser perjudicial para la salud, debido a que al estar tan concentrado puede producir quemaduras, manchas, entre otras molestias. Razón por la cual siempre se lo debe diluir en un aceite base.
- Para tener un estimado real del rendimiento de aceite esencial de la planta de hierba luisa, se debe realizar un estudio tomando en consideración factores como la fecha de cosecha (un mínimo de 6 cosechas variando de mes) cantidad de planta recolectada, el clima, el cultivo, entre otros.
- Sería muy interesante continuar la investigación del aceite de hierba luisa y realizar una comparación de la actividad y rendimiento del aceite esencial de las tres regiones del país, haciendo un control de malezas, riego y abono para determinar los factores temperatura y altura en la concentración y actividad que estos pueden presentar.

BIBLIOGRAFÍA

Libros:

1. ACOSTA, Misael. 1995, “Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador”, 1ª Edición, Editorial Ediciones Abya –Yala, Quito-Ecuador, pág: 164.
2. “ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC)”. 2000, 17ª edición, Editorial Association of Official Analytical Chemists, Virginia-Estados Unidos, pág: 133-142.
3. BERNAL, Henry. 1995, “270 Plantas Medicinales Iberoamericanas”, 1ª Edición, Editorial Presencia Ltda., Santafé de Bogota-Colombia, pág: 308-309.
4. BREMNESS, Lesley. 1997, “Hierbas Aromáticas”, 1ª. Edición, Editorial Grupo Zeta, Barcelona-España, pág: 22-23.
5. DOMINGUEZ, Xavier. 1973, “Métodos de Investigación Fitoquímica”, 1ª Edición, Editorial Limusa, México, pág: 229-238; 225-226.
6. GAVIRIA, Blanca. 1993, “Manual de Prácticas de Control Microbiológico en la Industria Alimenticia”, 1ª. Edición, Editorial de la Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, pág:0-0.
7. JORGENSEN, Peter; LEÓN Susana. 1999, “Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador”, Volumen 75, Editorial Missouri Botanical Gardel Press, Missouri-Estados Unidos, pág: 815-816.
8. LOCK, Olga. 1988, “Investigación Fitoquímica”, 1ª Edición, Editorial Fondo, Perú, pág: 21-40.

9. NEIL, Mayadele; SMITH Ann; HECKELMAN Patricia. 2004, "The Merck Index", 13va edición, Editorial Staff, Estados Unidos, pág: 405-406.
10. RUEDA, Darwin. 2001, "Botánica Sistemática", 2ª Edición, Editorial Grupo Compunor, Quito-Ecuador, pág: 134
11. THOMSON, William. 1980, "Guía práctica ilustrada de las Plantas Medicinales", 1ª Edición, Editorial Blume, Barcelona-España, pág: 25-26.
12. WHITE, Alan. 1981, "Hierbas del Ecuador", 1ª Edición, Editorial Ediciones Libri Mundi, Quito-Ecuador, pág: 165-166.

Web:

13. ABLAZE GARDENS. Lemongrass Recipes. [online]. 2006 [citado 11 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.gardensablaze.com/HerbLemonGrassRec.htm>>
14. ACOSTA, María, GONZÁLE, María, VELAZCO, Elsa. Medicina Tradicional Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Rev de la Facultad de Farmacia*. [online].2003, vol. 45, no.1 [citado 06 Junio 2006], p.19-24.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistafarmacia/vol45/acosta_m.pdf>
15. ALIMENTACION SANA. Aceites esenciales puros. [online]. 2006 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.alimentacion->

sana.com.ar/Portal%20nuevo/compresano/plantillas/aceites%20puros%20catalogo.htm>

16. ALIMENTACION SANA. Aceites esenciales puros para Aromaterapia. [online]. 2006 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.alimentacion-sana.com.ar/Portal%20nuevo/compresano/plantillas/aceites%20puros.htm>>

17. ALLE STRUKTURFORMELN. Citral. [online]. 2006 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.fslemi.uni-bonn.de/gewuerze/html/stralshtml/citral.html>>

18. ALZAMORA, [Libertad](#), MORALES, Liliana, ARMAS, Lourdes *et al.* Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *An. Fac. Med.* [online]. 2001, vol 62, no. 2 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0

Disponible en la World Wide Web:

<http://medicina.unmsm.edu.pe/biblioteca/anales/Vol62_N2-2001/6202200107.pdf> ISSN 1025 - 5583

19. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Biosafety Levels. [online]. 2006. [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.

Disponible en la World WideWeb:

<<http://www.atcc.org/common/technicalInfo/BiosafetyLevels.cfm>>

20. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. The American Type Culture Collection. [online]. 2006 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.

Disponible en la World WideWeb:

<<http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/descat1.html>>

21. ASSIS, Daniel. pH. [online]. 2005 [citado 05 Agosto 2006], p.1-12.

- Disponible en la World Wide Web:
<http://html.rincondelvago.com/ph_concentracion-de-iones-de-hidrogeno-en-una-disolucion.html>
22. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION. AFNOR. [online]. 2004 [citado 23 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.afnor.fr/portail.asp>>
23. AYMA, Wilton, NAVARRO, Adrián, PRADO, Lucas. Determinación de Constantes Físicas. [online]. 2002 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.monografias.com/trabajos15/constantes-fisicas/constantes-fisicas.shtml>>
24. AZCANADA, Lemongrass. [online]. 28 Enero 2004 [citado 11 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.azcanada.com/weblog/archives/000099.html>>
25. BIBLIOTECA DIGITAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. Aceites Esenciales. [online]. 2005 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2c/montesm02/20.html>
26. BIBLIOTECA DIGITAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. Destilación por arrastre de vapor. [online]. 2005 [citado 28 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/ap-teclabquim-12/27.html>

27. BIBLIOTECA DIGITAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. Detección analítica de fenoles. [online]. 2005 [citado 15 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-org2b/c139.html>
28. BIBLIOTECA DIGITAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. Picnómetro. [online]. 2005 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/ap-teclabquim-11/23.html>
29. CHÁIDEZ, C., JACQUEZ, I., RUBIO, W., ANGULO, M. Actividad bacteriana de Extractos Acetónicos de Semillas de *Swietenia humillis* y *Azadirachta indica* Juss. contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. [online]. 2004 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.ciad.mx/boletin/mayjun02/Actividad%20Bactericida.PDF>>
30. CAIRO, Maria Angel. Aceite esencial a partir de la corteza del limón (citrus limonium). [online]. 1997 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.monografias.com/trabajos12/aceitesc/aceitesc.shtml>>
31. CATALÁN, [Antonio](#). [Introducción a los Aceites Esenciales](#). [online]. 2003 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.aranela.com/es/esc/aces.php>>
32. CATTANEO, Adriana. Aceites Esenciales. [online]. 2005 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
< <http://html.rincondelvago.com/aceites-esenciales.html>>

33. CERDÁ, [Virginia. Composición Química de los Aceites Esenciales.](#) [online]. 13 Septiembre 2002 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.geocities.com/aceites_esenciales/quimica.htm>
34. CERDÁ, [Virginia. La Aromaterapia.](#) [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.geocities.com/aceites_esenciales/>
35. CHANGMYOUNG. Escherichia coli ATCC 25922. [online]. 2001 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.changmyoung.com/antibiosis/antibiosis_main.htm>
36. CHANGMYOUNG. Staphylococcus aureus ATCC 6538. [online]. 2001 [citado 21 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.changmyoung.com/antibiosis/images/fiti_pic05_s.jpg>
37. CONSUMASEGURIDAD.COM. Escherichia coli. [online]. 7 Noviembre 2003 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/11/07/9262.php>
38. COTO, O., CRUZ, M., POLANCO, J. Guía Técnica del cultivo "Zacate Limon" [online]. 1983 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.agronegocios.gob.sv/comoproducir/guias/zacatelimon.pdf>>
39. CYBERLIPID CENTER. Monoterpenos. [online]. 2006 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.cyberlipid.org/simple/simp00041.htm>>

40. DEFINICIO.ORG. Definición de carminativo. [online]. 2000 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.definicion.org/carminativo>>

41. DEFINICIO.ORG. Definición de diaforético. [online]. 2000 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.definicion.org/diaforetico>>

42. DEON. Hierba Limonera. *Rev. Crecimiento Interior*. [online]. 2002, vol. 19, no.1 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://deon.com.ar/19aromaterapia.html>>

43. DIVISION PROTECCIÓN AMBIENTAL. Peachímetro. [online]. 2005 [citado 05 Agosto 2006], p.1-12.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.policiafederal.gov.ar/esp/dep/supfedbom/supbomberos/seguridadco ntraincendios/ambiental/Peachimetro.htm>>

44. DOMINGUEZ, Carlos. Fitoterapia. [online]. 2006 [citado 23 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM>>

45. DOSCHIVOS. Los Mohos. [online]. 2005 [citado 18 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.doschivos.com/trabajos/Biologia/66.htm>>

46. EDUFUTURO. Cantones de Pichincha. [online]. 2006 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.edufuturo.com/imprime.php?c=2684>>
47. ENCICLOPEDIA MEDICA EN ESPAÑOL. Enteritis. [online]. 08 Febrero 2005 [citado 18 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001149.htm>>
48. ENCICLOPEDIA MEDICA EN ESPAÑOL. Infección Vaginal por Levaduras. [online]. 06 Junio 2006 [citado 21 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001511.htm>>
49. FARMACOGNOSIA. Ruta del Ácido Mevalónico. [online]. 2003 [citado 23 Julio 2006], p.1-3.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/mevalonico.pdf>>
50. FFI. Medidas de Densidad. Picnómetros. [online]. 2005 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://alojamientos.us.es/deupfis1/FFI/practicas/Picnometro_des.pdf>
51. FIBRAS OPTICAS. Índice de Refracción. [online]. 2005 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.yio.com.ar/fo/indiceref.html>>
52. FILGUEIRA, Fernando. Refractómetro y la Medición de luz. [online]. 2005 [citado 05 Agosto 2006], p.1-4.
Disponible en la World Wide Web:

- <http://www.cep.edu.uy/InformacionInstitucional/InspecDivDptos/Deptosyservicios/Tecnologia/Conserva_alimentos/Mod_5/M5_35.pdf>
53. FISICANET. Refractómetro. [online]. 2000 [citado 05 Agosto 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<http://www.fisicanet.com.ar/fisica/f3Ib01/Ibf3_24c_Refractometro.php>
54. FUNDACION CHANKUAP. Aceites Esenciales. [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www.catgen.com/chankuap/ES/100000744.html>>
55. FUNDACION CHANKUAP. Aceite Esencial de Hierba Luisa. [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www.catgen.com/chankuap/ES/100000747.html>>
56. FUNDACIÓN MCCH. Flora y Fauna del Ecuador. [online]. 2001 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponibile en la World WideWeb:
<<http://www.fundmcch.com.ec/recursos.php>>
57. FUNDACIÓN ONCE. Idiosincrasia. [online]. 2006 [citado 23 Julio 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www.discapnet.es/Discapnet/Castellano/Glosario/I/IDIOSINCRASIA.htm>>
58. GARCÍA, Diana. [Características Organolépticas](#). [online]. 27 Abril 2005 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www.habanaradio.cu/modules/mysections/singlefile.php?lid=130>>

59. GARCÍA, Miguel. Identificación de grupos funcionales orgánicos. [online]. 2002 [citado 15 Agosto 2006], p.21-34.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/quimica/GARCIA_SANCHEZ_MI_GUEL_ANGEL_Manual_de_practicasmquim_orgI.pdf>
60. GUERRA ORDONEZ, Marta, RODRIGUEZ JORGE, Mayra, GARCIA SIMON, Gastón *et al.* Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Rev Cubana Plant Med.* [online]. Mayo-Ago. 2004, vol.9, no.2 [citado 17 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962004000200005&script=sci_arttext&tlng=es>. ISSN 1028-4796.
61. HERBOTECNIA. Destilación de aceites esenciales. [online]. 2004 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-esencias.html>>
62. HERBOTECNIA. Lemon Gras. [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-lemongras.html>>
63. INFOJARDIN. Caña santa, Caña de limón, Té limón, Cañuela santa, Cañita de limón, Belgata, Caña limonaria, Cañita de malojillo, Cañita santa, Hierba limón, Limoncillo, Limonera, Malojillo, Pasto limón, Patchulí falso, Vergata, Zacate limón, Zacatelimón, Zorra de limón. [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.infojardin.net/fichas/plantas-medicinales/cymbopogon-citratos.htm>>
64. INFOJARDIN. [Planta Herbácea](#). [online]. 2000 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.infojardin.net/glosario/ph/planta-herbacea.htm>>

65. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR CHEMICAL SCIENCES IN DEVELOPMENT. Alquenos II. [online]. 2002 [citado 15 Agosto 2006], p.21-34.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://organica1.pquim.unam.mx/qo1/Mo-cap8.htm>>

66. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO. [online]. Agosto 2004 [citado 23 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage>>

67. ISP. Staphylococcus aureus. [online]. 2005 [citado 21 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://www.ispch.cl/lab_amb/serv_lab/aerobios_staphylococcus.html>

68. JIMENEZ, Pedro. Aceites Esenciales. [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.alambiques.com/aceites.htm>>

69. KAC, Javor. *Melissa Officinalis*. [online]. 10 Mayo 2006 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www2.arnes.si/~mborion4/fkg/seminar/melissa.htm>>

70. LABORATORIO DE ORGANICA. Identificación de aldehídos y cetonas. [online]. 2002 [citado 15 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://132.248.56.130/organica/lab2/97.htm>>

71. LABORATORIO DE ORGÁNICA. Taller de Espectroscopia. [online]. 2002 [citado 14 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://132.248.56.130/organica/lab2/21.htm>>
72. LANDAUER, Harald, CORPEI. HIERBAS AROMATICAS Y PLANTAS MEDICINALES. [online]. Septiembre. 2001 [citado 21 Junio 2006], p.1-44.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.biocomercioecuador.org/biocomercio/docs/12_3Plantas_medicinales.doc>
73. LINARES, S., GONZALEZ, N., GÓMEZ, E. et al. Efecto de la fertilización, densidad de siembra y tiempo de corte sobre el rendimiento y calidad del aceite esencial extraído de *Cymbopogon citratus* Stapf. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. [online]. 24 Septiembre 2004, vol. 22, no.1 [citado 16 Julio 2006], p.250-263.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/julio_septiembre2005/s_linares.pdf>
74. LINDISIMA. [La Pureza de los Aceites Esenciales](#). [online]. 2000 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.lindisima.com/propiedades.htm>>
75. LOFFREDA, Constanza. Aceites Esenciales. *Rev. Ciencia, Culto y Religiones*. [online]. 2002, no.8 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.mantra.com.ar/contenido/zona/frame_aceites.html>
76. MARTÍNEZ, J., SULBARÀN, B., OJEDA, G. et al. Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. [online]. 30 Junio 2003, vol. 20, no.1 [citado 16 Julio 2006], p.502-512.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre_diciembre2003/Ra40310.pdf>

77. MARTÍNEZ, N.. Los aceites esenciales naturales y la Aromaterapia. [online]. 2005 [citado 16 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.marnys.com/artic/art02-02.asp>>
78. MAZZONI, Magdalena. Qué es la Aromaterpia. [online]. 2002 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.holistica2000.com.ar/speacharoma.html>>
79. MORALES, Fernando. Uso del Refractómetro de Abbe. [online]. 2005 [citado 05 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://depa.pquim.unam.mx/IQ/balances/anexo1.htm>>
80. MOREA, Lucas. Genoma. [online]. 1997 [citado 23 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.monografias.com/trabajos14/genoma/genoma.shtml>>
81. OCHOA, Adriana. Aceites esenciales. [online]. 1998 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://aupec.univalle.edu.co/informes/julio98/aceites.html>>
82. OLIVER, Antonio. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE UN LÍQUIDO CON EL PICNÓMETRO. [online]. 2005 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://html.rincondelvago.com/picnometro_densidad-de-liquidos.html>
83. PAN, Pesticides Database. Farnesol. [online]. 2002 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:

<http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33198>

84. PARDOS, Fernando. Antimicótico. [online]. 2001 [citado 17 Julio 2006], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:
<http://cvc.cervantes.es/obref/congresos/valladolid/ponencias/nuevas_fronteras_del_espanol/2_el_espanol_de_la_ciencia/pardos_f.htm >
85. PERUPROM. Los Hongos y Mohos. [online]. 2005 [citado 18 Agosto 2006], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.peruprom.com/hogar/hongos.html>>
86. PIZARRO, Arelis. *Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf (Caña Santa). [online]. 2005 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0. Disponible en la World WideWeb
<<http://www.monografias.com/trabajos29/cana-santa/cana-santa.shtml>>
87. QUÍMICA ORGÁNICA. Métodos físicos de separación y purificación. [online]. 2003 [citado 28 Julio 2006], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:
<http://es.geocities.com/qo_11_sepypur/>
88. QUITO. Pichincha Ecuador. [online]. 2005 [citado 24 Julio 2006], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.in-quito.com/uio-kito-qito-kyto-qyto/spanish-uio/pichincha.htm>>
89. RODRIGUEZ CHANFRAU, Jorge E, FUENTES, Leticia, PARDO RUIZ, Zenia *et al.* Estabilidad de extractos fluidos al 70 % de *Cymbopogon citratus*. *Rev Cubana Plant Med.* [online]. Mayo-ago. 2003, vol.8, no.2 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0. Disponible en la World Wide Web:
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000200002&script=sci_arttext&tlng=es>. ISSN 1028-4796

90. ROMANO, Jairo. Métodos de Separación. [online]. 2005 [citado 28 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.monografias.com/trabajos10/mese/mese.shtml>>
91. ROMERO, María, SANCHIS, Ángel. El Jardín de Linneo. [online]. 2004 [citado 11 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.uv.es/metode/anuario2004/232_2004.htm>
92. SAKAI, Masataka. Lemongrass. [online]. 1997 [citado 11 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www2q.biglobe.ne.jp/~sakai/lemongrass.html>>
93. SERRA, Joan Ma Mandri. Toxicidad y Contraindicaciones de los aceites esenciales. [online]. 2003. [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.farmaciaserra.com/Revista/Articulo_Pr.asp?i=6s4df6a494&Cl=5000&C=5000>
94. SIMITÍ. Travesía en busca de aromas. [online]. 2005 [citado 28 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.bogota.gov.co/galeria/25agosto1.doc>>
95. SOTO, Rafaela. Agrotecnología para el cultivo de la caña santa o zacate limón (*Cymbopogon citratus*). [online]. 2002 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.monografias.com/trabajos14/zacate-limon/zacate-limon.shtml>>
96. SOTO, Rafaela, VEGA, Gilberto, TAMAJÓN, Aldo. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Rev Cubana Plant Med.* [online]. Febrero. 2002, vol.7, no.2 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:

- <http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vo17_2_02/pla07202.pdf > ISSN 89-95
97. SUAREZ, Mayte. Aromaterapia. Curar con esencias. [online]. Enero 2003 [citado 17 Julio 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<http://64.233.187.104/search?q=cache:4XoSedDiwxgJ:www.buscasalud.com/buletin/analisis/2003_01_11_17_09_32.html+aceites+esenciales&hl=es&gl=ec&ct=clnk&cd=4>
98. UNAM. Refractómetro de Abbe. [online]. 2005 [citado 05 Agosto 2006], p.1-2.
Disponibile en la World Wide Web:
<http://entren.dgsca.unam.mx/liqbame/interior/prac1/prac1_refractometroperac.html>
99. UNIVERSIDAD DE BOGOTA. Reconocimiento de alcoholes, aldehídos y cetonas. [online]. 2002 [citado 15 Agosto 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<http://www.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/organica/guia_5_reconocimiento_alcoholes_aldehidos_cetona.pdf >
100. UNIVERSIDAD DE CADIZ. Identificación de grupos funcionales orgánicos. [online]. 2001 [citado 15 Agosto 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www2.uca.es/grup-invest/corrosion/integrado/P15.pdf> >
101. UNIVERSIDAD DE CORDOBA. Raíz de hierba luisa. [online]. 2001 [citado 05 Julio 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:
<<http://www.uco.es/dptos/prod-animal/libro/agricultura/imagenes/raiz.jpg>>
102. UNIVERSIDAD DE GRANADA. Identificación de grupos funcionales. [online]. 2002 [citado 15 Agosto 2006], p.0-0.
Disponibile en la World Wide Web:

<http://www.ugr.es/~quiorred/doc/p14.pdf>

103. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Análisis Microbiológico de Muestras. [online]. 2003 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://coli.usal.es/web/aguas/aerobios.html>>
104. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Espectroscopia. [online]. Enero 2001 [citado 14 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/lecciones/Cap21/06_01_01.htm>
105. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES. Toma de muestras de manipuladores. [online]. 2002 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://www.vet.unicen.edu.ar/Tecnologia/TP5.htm>>
106. VEGA, Natalia. Anticuerpos inhibidores de la adhesión de Candida. [online]. 25 Febrero 2004 [citado 22 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<http://www.basqueresearch.com/tesia_irakurri.asp?Gelaxka=12&Kodea=34&hizk=I&Lehiaketa_Urtea=2004>
107. VETERINARIOS. Levaduras. [online]. 22 Marzo 2002 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:
<<http://canal-h.net/webs/sgonzalez002/Micologia/LEVADURAS.appt.htm>>
108. VIERA, Maryselva. Análisis Bromatológico. [online]. 2006 [citado 11 Julio 2006], p.0-0.
Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.ciatbo.org/PYS/Analisis%20Bromatologico.htm>>

109. WEBCOLOMBIA. Limonsillo. [online]. 2006 [citado 18 Mayo 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://www.webcolombia.com/plantascurativas/Limonsillo.htm>>

110. WIKIPEDIA. Anaerobio facultativo. [online]. 4 Junio 2006 [citado 17 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Anaerobio_facultativo>

111. WIKIPEDIA. Aspergillus niger. [online]. 27 Octubre 2005 [citado 23 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger>

112. WIKIPEDIA. Candida albicans. [online]. 23 Julio 2006 [citado 21 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans>

113. WIKIPEDIA. Carotenoide. [online]. 27 Julio 2006 [citado 23 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Carotenoide>>

114. WIKIPEDIA. Escherichia coli. [online]. 13 Julio 2006 [citado 14 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>

115. WIKIPEDIA. Espectrofotómetro de transformada de Fourier. [online]. 13 Julio 2006 [citado 14 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro_de_transformada_de_Fourier>

116. WIKIPEDIA. Estereoisómero. [online]. 02 Julio 2006 [citado 23 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Estereois%C3%B3mero>>

117. WIKIPEDIA. Imagen del ácido acético. [online]. Octubre 2005 [citado 23 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Acetic_acid_structures4.png>

118. WIKIPEDIA. Índice de Refracción. [online]. 11 Julio 2006 [citado 05 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%8Dndice_de_refracci%C3%B3n>

119. WIKIPEDIA. Isómero. [online]. 15 Junio 2006 [citado 23 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Is%C3%B3mero>>

120. WIKIPEDIA. Limoneno. [online]. 16 Julio 2006 [citado 24 Julio 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Limoneno>>

121. WIKIPEDIA. Moho. [online]. 23 Julio 2006 [citado 18 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Moho>>

122. WIKIPEDIA. Orbital Molecular. [online]. 14 Julio 2006 [citado 01 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Orbital_molecular>

123. WIKIPEDIA. pH. [online]. 03 Agosto 2006 [citado 05 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/PH>>

124. WIKIPEDIA. Química. [online]. 11 Julio 2006 [citado 05 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Qu%C3%ADmica>>

125. WIKIPEDIA. Staphylococcus aureus. [online]. 23 Julio 2006 [citado 21 Agosto 2006], p.0-0.

Disponible en la World Wide Web:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus>