

REPÚBLICA DEL ECUADOR



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TEMA:

“EFICACIA *in vitro* DE UN DESINFECTANTE DE USO AGROINDUSTRIAL ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)”

Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial

Autor: López G. Lenin F.

Directora: Dra. Scalvenzi Laura

Puyo- Ecuador

Febrero, 2013

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Directora del informe de investigación sobre el tema: **“EFICACIA *in vitro* DE UN DESINFECTANTE DE USO AGROINDUSTRIAL ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)”** del autor Lenin Félix López Grefa, estudiante de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por.....

Puyo, de Febrero del 2013

DIRECTORA

.....

Dra. Scalvenzi Laura

AUTORIA DEL TRABAJO

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación: **“EFICACIA *in vitro* DE UN DESINFECTANTE DE USO AGROINDUSTRIAL ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)”** como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor de este trabajo de grado.

Puyo, 18 de Marzo del 2013

AUTOR

.....

López G. Lenin F.

DERECHOS DE AUTOR

El autor cede sus derechos, para que la Institución pueda hacer uso en lo que estime conveniente, siempre y cuando sea para fines investigativos o de consulta.

Puyo, 18 de Marzo del 2013

AUTOR

.....

López G. Lenin F.

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del tribunal examinador aprueban el informe de investigación, sobre el tema: **“EFICACIA *in vitro* DE UN DESINFECTANTE DE USO AGROINDUSTRIAL ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)”**, del autor de nombres y apellidos Lenin Félix López Grefa, estudiante de la carrera de Ingeniería Agroindustrial.

Puyo, 18 de Marzo del 2013

Para constancia firman

.....
Msc. Magdalena Barreno

.....
Msc. Angélica Tasambay

.....
Ing. Juan Elías González

PRESIDENTE

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre, quien me ha demostrado que con valentía, sabiduría, amor, dedicación e inteligencia se puede lograr con éxito una meta planteada en beneficio de la colectividad; y a mis familiares, de quienes he recibido el apoyo incondicional para poder graduarme con éxito.

AGRADECIMIENTO

Con cariño expreso mis sinceros agradecimientos:

A mi madre Janet Grefa C, por todos esos valiosos consejos;

A mi familia, por el apoyo incondicional que supo brindarme;

A la Universidad Estatal Amazónica, por todos los conocimientos que pude adquirir durante la etapa de mi vida estudiantil;

A todos mis amigos, profesores y compañeros, quienes en su momento supieron compartir sus habilidades y destrezas.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	i
AUTORIA DEL TRABAJO	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. ACEITES ESENCIALES.....	6

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	9
3.2. CONDICIONES METEOROLÓGICAS	10
3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y MANEJO DEL EXPERIMENTO	10
3.3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ISHPINK (<i>Ocotea quixos</i> Lam. Kosterm).....	12
3.3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (<i>Ocotea quixos</i> Lam. Kosterm)	13

3.3.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>O. quixos</i> MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	17
3.3.4. FORMULACIÓN DEL DESINFECTANTE CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Ocotea quixos</i>	22
3.4. FACTORES DE ESTUDIO.....	24
3.4.1. DETERMINACIÓN DE LAMÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC) DEL DESINFECTANTE A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Ocotea quixos</i>	24
3.5. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO EXPERIMENTAL	28
3.5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL DIAGRAMA DE FLUJO	28
3.6. ANÁLISIS ECONÓMICO	30

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. RENDIMIENTO EN ACEITE ESENCIAL DE <i>O. quixos</i>	32
4.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>O. quixos</i> MEDIANTE TLC.....	36
4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL DESINFECTANTE ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE <i>O. quixos</i>	38
4.4. RESULTADO DEL ANÁLISIS ECONÓMICO	41

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES.....	43
6. RECOMENDACIONES	44
7. RESUMEN.....	46
8. SUMMARY	47
9. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de reactivos e ingredientes utilizados en la fase experimental de la presente tesis.	10
Tabla 2. Lista de equipos utilizados en la fase experimental de la presente tesis. ...	11
Tabla 3. Lista de materiales de laboratorio utilizados en la fase experimental de la presente tesis.	11
Tabla 4- Ejemplo de ingredientes utilizados en la formulación de desinfectantes industriales.....	22
Tabla 5- Ingredientes usados en la formulación del desinfectante de uso agroindustrial a base de aceite esencial de <i>O. quixos</i>	23
Tabla 6- Factor de estudio y niveles del factor de estudio, tomados en cuenta en la elaboración de un desinfectante a base de aceite esencial de <i>O. quixos</i>	27
Tabla 7- Comparación de datos de las tres destilaciones consideradas como repeticiones para determinar el mejor tiempo de destilación.....	32
Tabla 8- Valores de aceite esencial de <i>O. quixos</i> obtenidos en cada destilación y mililitros totales (expresados en mL)	34
Tabla 9- Comparación de los valores de densidad del aceite esencial de <i>Ishpink</i> obtenido en la presente tesis con la muestra de la Fundación Chankuap	35
Tabla 10- Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del desinfectante, contra la bacteria <i>Echerichia coli</i>	40
Tabla 11- Comparación de productos desinfectantes en cuanto al volumen de la presentación comercial y precio	42
Tabla 12- Análisis económico para la producción de 100 litros de desinfectante a base de aceite esencial de <i>O. quixos</i>	42
Tabla 13 Relación Beneficio/Costo para la producción de 100 litro de desinfectante a base de aceite esencial de <i>O. quixos</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Ubicación de la localidad de estudio: Ciudad de Puyo, Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, Ecuador	9
Figura 2- Árbol, frutos y hojas de <i>Ocotea quixos</i>	12
Figura 3 - Cosecha manual de <i>O. quixos</i> y detalle de las hojas	13
Figura 4- Comparación de modelos de destiladores de aceites esenciales. Izquierda: destilador con generador de vapor externo e ingreso inferior. Derecha: destilador adaptado para el trabajo de tesis con alimentación superior del vapor	14
Figura 5- Destilador de aceites esenciales adaptado,utilizado en la presente tesis. Detalle de las hojas de <i>O. quixos</i> después de la destilación	16
Figura 6- Esquema demostrativo de la cromatografía de capa fina (TLC – Thin Layer Chromatography)	17
Figura 7- Preparación de las placas de vidrio para TLC. Placas de vidrio, estufa, placas con silica gel en fase de secado, preparación de las placas en laboratorio.	19
Figura 8- Análisis TLC del aceite esencial de <i>O. quixos</i> : puesta de aceite esencial mediante capilar, saturación del ambiente interno, revelado con ácido sulfúrico	20
Figura 9- Ejemplo de la determinación colorimétrica de los componentes químicos de un aceite esencial.....	21
Figura 10- Esquema del método de las diluciones sucesivas	25
Figura 11- Esquema del método de las diluciones sucesivas para determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) del desinfectante a base de aceite esencial de <i>Ishepink</i>	26
Figura 12- Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) del desinfectante con aceite esencial de <i>Ishepink</i>	27
Figura 13- Proceso de elaboración de desinfectante a base de aceite esencial de <i>O. Quixos</i>	28
Figura 14 - Análisis económico de la formulación de 100 L de desinfectante a base de aceite esencial de <i>O. quixos</i>	30
Figura 15- Detalles de la calibración del equipo de destilación. Curva de rendimiento y análisis de varianza según la prueba de Tukey al 0.05%.....	33
Figura 16 - Resultados de los ensayos realizados para determinar el mejor eluyente. De izquierda a derecha: mejor eluyente (cloroformo), peor eluyente (cloroformo + tolueno).....	37
Figura 17- Comparación del aceite esencial de <i>Ishepink</i> de la presente tesis con el aceite esencial de la Fundación Chankuap.....	38
Figura 18- Verificación de la presencia y ausencia de turbidez para la concentración mínima inhibitoria del desinfectante	40

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La agroindustria procesa alimentos y bebidas para el consumo humano y tiene la responsabilidad de llevar estos procesos de una forma tal que los alimentos producidos sean inocuos para la salud del Hombre. De hecho, uno de los mayores problemas globales es el acceso a alimentos inocuos además que saludables y nutritivos. Se estima que en el año 2100 la población mundial será de 10.000 millones de personas y este crecimiento ejercerá una fuerte presión sobre los sistemas productivos, de transformación y distribución de los alimentos, sobre todo en los países en vía de desarrollo o emergentes. En algunas situaciones la implementación de normativas de producción alimenticia o su respectivo sistema de control no logran garantizar la inocuidad de los alimentos. Dicha situación puede llevar a que la demanda de alimentos sea asociada a graves problemas en cuanto a su calidad e inocuidad. A pesar de esta situación, es un derecho de toda persona tener un acceso normal a cantidades suficientes de alimentos de buena calidad, para que esté garantizada una nutrición apropiada. Este tema fue ampliamente reconocido por la FAO durante la Conferencia Internacional sobre Nutrición (CIN), que se ha tenido en Roma en el año 1992.

Consumir alimentos de mala calidad puede llevar varios peligros para la salud humana. Las causas de estos peligros son la mala e incorrecta manipulación de las materias primas utilizadas, durante la transformación, almacenamiento, transporte y venta en el punto final de distribución. Los peligros principales son representados por la contaminación microbiana durante la elaboración y conservación del alimento transformado, las micotoxinas que se generan por el mal almacenamiento y los residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios.

La Organización Mundial para la Salud (OMS) estima que las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) representan hoy en día el mayor peligro para la salud del Hombre, a nivel mundial (OMS, 2007). Con la finalidad de reducir los peligros de enfermedades causadas por la ingestión de alimentos de mala calidad, las empresas adoptan las normas internacionales de producción alimentaria descritas en el Codex Alimentarius adoptando Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) así como el empleo del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC).

El presente trabajo de tesis tiene el objetivo de elaborar un prototipo de desinfectante agroindustrial a base de aceite esencial de *Ishepink* (*Ocotea quixos*), para ser utilizado en la desinfección de áreas de trabajo en las agroindustrias. Siendo la contaminación microbiana de los alimentos una de las principales causas de enfermedad en el Hombre, es importante utilizar productos de desinfección que puedan garantizar el cumplimiento de las BPF. Adicionalmente es importante que estos productos tengan un bajo impacto ambiental al momento de ser enjuagado y por ello se realiza un prototipo de producto con el aceite esencial de *O. quixos* que de acuerdo a la literatura científica tiene elevadas propiedades antibacterianas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Comprobar la eficacia *in vitro* de un desinfectante de uso agroindustrial elaborado a base de aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) mediante destilación por arrastre de vapor;
- Realizar la caracterización química del aceite esencial de *O. quixos* mediante cromatografía en capa fina (TLC);
- Formular el desinfectante a base de aceite esencial de *O. quixos*;
- Determinar *in vitro* la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del prototipo de desinfectante a base de aceite esencial de *O. quixos*.

1.2.HIPÓTESIS

- El aceite esencial de Ishpingo (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) cuenta con propiedades antimicrobianas capaces de ser empleadas en la formulación de un desinfectante de uso agroindustrial.

CAPITULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los mayores problemas globales es el acceso a alimentos inocuos además que saludables y nutritivos. Se estima que en el año 2100 la población mundial será de 10.000 millones de personas y este crecimiento ejercerá una fuerte presión sobre los sistemas productivos, de transformación y distribución de los alimentos, sobre todo en los países en vía de desarrollo o emergentes. En algunos países la implementación de normativas de producción alimenticia no logra garantizar la inocuidad de los alimentos. Los alimentos son la principal fuente de exposición a enfermedades, las cuales a su vez son causadas sobre todo por microorganismos. Los microorganismos pueden tolerar condiciones extremas del ambiente y por eso se han adaptado a vivir en todos los rincones de la Tierra. En función de la forma como se alimentan, como se reproducen y sobre todo del efecto que pueden producir en los seres vivos, se los han clasificado en patógenos y benéficos (Tortora, 2007).

Consumir alimentos de mala calidad puede llevar varios peligros para la salud humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que 1,8 millones de seres humanos mueren cada año debido a enfermedades diarreicas, que son provocadas sobre todo por el consumo de alimentos o agua contaminados (OMS, 2007). Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son denominadas de esta forma porque el alimento es el vector de transmisión de microorganismos dañinos o sustancias tóxicas para el ser humano. Las ETA pueden darse por tres causas principales: 1) infecciones, causadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, 2) intoxicaciones, causadas por la presencia de toxinas originadas por microorganismos presentes en el alimento, 3) toxi-

infección, enfermedad causada por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos y toxinas producidas por estos (Castillo, 2009).

La Organización Mundial para la Salud (OMS) estima que las enfermedades transmitidas por alimentos representan hoy en día el mayor peligro para la salud del Hombre, a nivel mundial. Solo en Estados Unidos se registran cada año entre 3,3 y 12,3 millones de casos de infecciones alimentarias, provocadas por solo pocos microorganismos patógenos como: *Escherichia coli* (produce una toxina mortal, y es de origen fecal), *Staphylococcus aureus* (produce una toxina que causa vómito, se la encuentra en alimentos ricos en proteínas mal conservados), *Listeria monocytogenes* (causa la enfermedad listeriosis, se encuentra en carne cruda y mal cocinada, productos del mar) y *Campylobacter jejuni* (causa diarrea, se encuentra en carne cruda o mal cocinada, leche cruda y agua sin tratamiento) (OMS, 2007).

De acuerdo a lo anteriormente citado, es evidente la importancia de contar con alimentos inocuos a nivel mundial. Las entidades que se dedican a la elaboración y venta de alimentos son aún más responsables de ofrecer al consumidor la sanidad y calidad requerida. Este tema fue ampliamente reconocido por la FAO durante la Conferencia Internacional sobre Nutrición (CIN), que se ha tenido en Roma en el año 1992. Con la finalidad de reducir los peligros de enfermedades causadas por la ingestión de alimentos de mala calidad, las empresas adoptan las normas internacionales de producción alimentaria descritas en el Codex Alimentarius adoptando Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) así como el empleo del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC).

Toda industria productora de alimentos es responsable de aplicar normas de higiene que garanticen la elaboración de alimentos inocuos para la salud. De acuerdo a esto es fundamental bajar el nivel de microorganismos patógenos

en las plantas procesadoras dentro de límites que no afecten a la salud humana. Uno de los aspectos más importantes es la desinfección de las áreas de trabajo, a fin de reducir las fuentes de contaminación por microorganismos. A razón de esto existe, en el mercado, una amplia variedad de desinfectantes con diferentes principios activos responsables de la acción bactericida. Entre los ingredientes principales de los desinfectantes se encuentran el amonio cuaternario y el nonil fenol.

Con la desinfección se busca eliminar o reducir el nivel de microorganismos indeseables en equipos y superficies para minimizar la contaminación o colonización bacteriana, convirtiéndolos en equipos y superficies de trabajo seguros (Alba & Araujo, 2008).

En la actualidad, el uso de sustancias naturales con propiedades antimicrobianas se ha incrementado considerablemente por ser más amigable con el medio ambiente (Noriega & Dacarro, 2008).

Entre dichas sustancias se conocen los aceites esenciales.

2.1. ACEITES ESENCIALES

Químicamente los aceites esenciales son compuestos hidrofóbicos con aroma, obtenidos de las plantas mediante varios procesos como la destilación por arrastre de vapor, la hidrodestilación, la extracción con fluidos supercríticos, la extracción por prensado, la extracción con solventes y el enfleurage (Sánchez, 2006). Hoy en día, se está difundiendo mucho el uso de aceites esenciales como ingredientes funcionales en la elaboración de alimentos, bebidas, cosméticos, productos de higiene, fitofármacos y desinfectantes. Eso es debido tanto por el creciente interés de los consumidores hacia ingredientes más naturales, como por los potenciales

problemas ocasionados por los aditivos de síntesis. Los aceites esenciales se caracterizan por tener elevada propiedad antimicrobiana, es decir la capacidad de inhibir o eliminar el crecimiento de bacterias y/o hongos. Debido a esa propiedad su potencial aplicación es extremadamente grande (Sacchetti, 2005).

Muchas investigaciones se realizan también sobre aceites esenciales extraídos de plantas amazónicas, gracias a la gran biodiversidad de esta región del mundo. Un caso por destacar es el aceite esencial de la planta vascular *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. Esta especie pertenece a la familia botánica Lauraceae y es conocida en Ecuador con los nombres de Canelón, Ishpingo, Ishpingu, Ishpink o Canela de Quijos (Noriega & Dacarro, 2008).

El hábitat natural de este árbol es el bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana, encontrándose entre 310 y 1.250 msnm y destacándose por ser endémico de estos lugares (Páez, 1960).

Algunos datos sobre el Ishpink se remontan al primer viaje de Cristobal Colón hacia América. Él pensaba haber encontrado árboles parecidos a la apreciada especie de las Indias *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae), conocida y utilizada en la preservación y aroma de la comida. Se dió cuenta posteriormente que las suposiciones habían sido equivocadas. Pizarro había enfrentado un peligroso viaje, con una tropa de 4000 hombres, hacia el desconocido Oriente ecuatoriano en 1539, en búsqueda del legendario país de la canela. La expedición no tuvo el éxito deseado porque *O. quixos*, aunque tenía un agradable aroma, nunca hubiera podido competir con la calidad del condimento obtenido de *C. zeylanicum*. En 1653, Bernabé Cobo afirmó: “*En las provincias que por la parte oriental confinan con la diócesis de Quito, que aún están por pacificar, nace gran copia de unos árboles muy grandes que llamamos de canela (...). Pero lo que más se estima que estos*

árboles son unos capullos que dan, cuyo sabor y olor más se asemeja al de la canela (...) más no es su sabor tan vivo y gustoso como el de la canela de la India Oriental'. La canela es usada desde tiempos precolombinos en la Amazonía ecuatoriana así como en los Andes, donde ha sido introducida gracias a las transacciones que se daban entre los pueblos de las dos regiones. Hoy en día, la especie obtenida de la molienda de los calices es utilizada en la elaboración de la colada morada, la típica bebida ecuatoriana para el día de los difuntos (Ulloa, 2006).

El aroma de sus calices y de sus hojas es muy parecido al de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*, Fam. Lauraceae) conocida en todo el mundo por el característico aroma de su corteza.

Con la presente investigación se pretende demostrar la alternativa que se tiene en el uso del aceite esencial de Ishpink, *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm, en la formulación de un desinfectante de uso agroindustrial que inhiba la proliferación especialmente de *Echerichia coli*. Existen estudios que respaldan la capacidad de inhibición que tiene el aceite esencial de *Ocotea quixos* (Noriega & Dacarro, 2008). Debido a las comprobadas propiedades antimicrobianas del aceite esencial de Ishpink se considera oportuno formular un desinfectante agroindustrial a base de dicho aceite y determinar *in vitro* su actividad de desinfección.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en los laboratorios de química y biología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en la ciudad del Puyo (Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza). El trabajo experimental se ha realizado en un lapso de aproximadamente diez meses.

Figura 1- Ubicación de la localidad de estudio: Ciudad de Puyo, Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, Ecuador



Fuente: Fuente: Dirección de Planificación - GPP

3.2. CONDICIONES METEOROLÓGICAS

La ciudad del Puyo se encuentra en la región oriental de Ecuador representada por la Amazonía (RAE – Región Amazónica del Ecuador). Por lo tanto su clima es de tipo tropical, se encuentra a 960msnm, a una latitud de 013027S y longitud de 775638W, la precipitación promedio anual es de 5000mm y la humedad relativa es del 85% (Inamhi, 2012).

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y MANEJO DEL EXPERIMENTO

Todos los materiales utilizados en el presente trabajo de tesis se enumeran en las siguientes tablas:

Tabla 1. Lista de reactivos e ingredientes utilizados en la fase experimental de la presente tesis.

N°	REACTIVOS E INGREDIENTES	Cantidad	medida	USO
1	ácido sulfúrico	30	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
2	Dimetilsulfóxido	50	Mililitros	CMB
3	Sílica gel en polvo	500	Gramos	Análisis cualitativo en CCF
4	Etanol	500	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
5	Agar nutritivo	90	Gramos	Análisis CMI
6	Tetracloruro de carbono	50	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
7	Etanol 90%	50	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
8	Tolueno	50	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
9	Cloroformo	50	Mililitros	Análisis cualitativo en CCF
10	Agua destilada	3	litros	Análisis cualitativo en CCF
11	Nonilfenol	30	Mililitros	Formulación
12	Amonio Cuaternario	30	Mililitros	Formulación
13	Aceite esencial de Ishpink	30	Mililitros	Formulación

Fuente: Lopez L. 2012

Tabla 2. Lista de equipos utilizados en la fase experimental de la presente tesis.

N°	EQUIPOS			USO
		cantidad	medida	
14	Destilador adaptado	1	Unidades	Extracción de aceite esencial
15	Balanza digital(OHAUS)	1	Unidades	Pesado muestras
16	Estufa BINDER ED 53	1	Unidades	Preparación Placa TLC
17	plato agitador IKA C-MAG HS 10	1	Unidades	Preparación de muestras
18	Incubadora MEMMERT VNB500	1	Unidades	Análisis C.M.I
19	Cámara de flujo laminar BIOMEDIS IIBSC	1	Unidades	Análisis C.M.I

Fuente: Lopez L. 2012

Tabla 3. Lista de materiales de laboratorio utilizados en la fase experimental de la presente tesis.

N°	MATERIALES			
		cantidad	medida	
20	placas de vidrio	12	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
21	Erlenmeyer 500ml	1	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
22	Erlenmeyer 250ml	1	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
23	tubos de ensayo 10ml	50	Unidades	Análisis CMI
24	cajas petri	50	Unidades	Comparación desinfectantes
25	frascos de vidrio de 60-100ml	10	Unidades	Preparación desinfectantes
26	Probeta de 100ml	1	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
27	pipetas 0.5ml, 0.1ml, 0.2ml	4	Unidades	Formulación
28	Pinza metálica	4	Unidades	Extracción de aceite esencial
29	varilla de agitación (vidrio)	1	Unidades	Formulación
30	gradilla metálica	1	Unidades	Análisis CMI
31	Embudo de separación	1	Unidades	Extracción de aceite esencial
32	tubo refrigerante	1	Unidades	Extracción de aceite esencial
33	mangueras conducción de agua	4	metros	Extracción de aceite esencial
34	gotero de vidrio	2	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
35	Pera para pipeta	1	Unidades	Análisis cualitativo en CCF
36	papel filtro	0.05	Metros	Extracción de aceite esencial
37	soporte universal	4	Unidades	Extracción de aceite esencial
38	Adaptadores (destilación) de vidrio	3	Unidades	Extracción de aceite esencial

Fuente: Lopez L. 2012

3.3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)

El bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana alberga una gran variedad de especies endémicas, entre ellas está la canela amazónica (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) que pertenece a la familia Lauraceae. En Ecuador se conoce con varios nombres comunes como por ejemplo Canela de Quijos o Canela americana, Canelo, Ishpink, Ispink y/o Ishpingo. Esta especie se desarrolla desde los 310 hasta los 1.250 msnm. Fructifica cuando alcanza la edad adulta, lo cual ocurre después de aproximadamente quince años de edad y la producción de frutos se da cada dos años. El árbol varía en cuanto a su altura, de hecho puede alcanzar de 8 a 12 metros.

La medida promedio de las hojas es de 14,5-23,5 cm de largo y 3,5-6 cm de ancho. La especie presenta una flor hermafrodita de color blanco-verdosa con cáliz persistente de seis sépalos, olor característico a canela y un fruto ovalado de 4 cm de longitud (Pennington, 2004).

Figura 2- Árbol, frutos y hojas de *Ocotea quixos*



Fuente: Lopez L. 2012

3.3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm)

El aceite esencial de Ishpink se obtuvo mediante el método de destilación por arrastre de vapor a partir de hojas adultas de la planta. El material vegetal fue cosechado en la Comunidad de Canoa Yacu (Cantón Tena, Provincia de Napo). La recolección de hojas adultas se realizó mediante una podadora manual, con la cual se han podido alcanzar también las partes más altas del árbol (Figura 3).

Figura 3 - Cosecha manual de *O. quixos* y detalle de las hojas



Fuente: Lopez L. 2012

Antes de ejecutar el proceso de destilación como tal, se calibró el destilador tomando en cuenta que la capacidad del mismo es de 0,5 kg. Las hojas frescas fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1cm, se consideraron cuatro diferentes tiempos de destilación (1, 2, 3 y 4 horas) y se

consideraron tres repeticiones para cada tiempo de destilación; las cantidades de aceite obtenidas en las distintas destilaciones se unieron al final de cada proceso de destilación. Para determinar el tiempo que dio el mejor rendimiento se procedió a calcular los datos en el programa estadístico Infostat mediante un ADEVA simple con la Prueba de Tukey al 0,05%. De la misma forma se elaboró la curva de rendimiento en base al valor promedio de aceite esencial obtenido.

La destilación se realizó usando un destilador de aceites esenciales adaptado por el autor, según las especificaciones mostradas por Fontecha (2007), debido a la no disponibilidad en la institución de un equipo de destilación (Figura 4). La adaptación consistió en conectar el generador de vapor y el contenedor de materia prima en la parte superior de este último, mediante una manguera de alta presión (parte derecha de la Figura 4). En cambio en los destiladores tradicionales, el vapor ingresa por la parte inferior (parte izquierda de la Figura 4).

Figura 4- Comparación de modelos de destiladores de aceites esenciales. Izquierda: destilador con generador de vapor externo e ingreso inferior. Derecha: destilador adaptado para el trabajo de tesis con alimentación superior del vapor



Fuente: Fontecha & Lizarazo, 2007

Fuente: López L, 2012

El destilador está compuesto por (i) una fuente de calor, que generalmente es algún tipo de combustible (gas natural y leña, en su mayoría),(ii) un generador de vapor que transforma el agua líquida en vapor de agua, (iii) una entrada de vapor que inyecta este último hasta el contenedor de la materia prima a destilar, (iv) un tubo refrigerante donde mediante una transferencia de calor entre dos fluidos los vapores de agua y aceite condensan y (v) un separador de aceite que puede ser un separador tipo florentino (separador de aceite-agua mediante flujo continuo), una probeta graduada o un embudo de separación.

La destilación por arrastre de vapor se fundamenta en el hecho que los compuestos olorosos en las plantas pueden ser arrastrados por el vapor de agua y luego separados por condensación. Ese tipo de destilación consiste en una vaporización de los compuestos químicos volátiles presentes en la matriz vegetal, por efecto de una corriente directa de vapor de agua; ese vapor es generado por calentamiento directo del agua presente en el fondo del destilador en un caldero externo que luego permite inyectar ese vapor en el destilador. Este segundo diseño es el que ha sido utilizado en esta tesis (Figura 5). La mezcla de vapor de agua y vapor de aceite esencial sube hacia el cuello de cisne del destilador, para luego atravesar el condensador donde ocurre el enfriado de los vapores que regresan a la fase líquida. De esta manera los dos compuestos inmiscibles, es decir el aceite esencial y el agua, se separan en la bureta graduada puesta al final del destilador. El condensador es un intercambiador de calor en el cual ocurre el cambio de estado vapor-líquido gracias a la transferencia de calor de los vapores a un refrigerante, que en la mayoría de los casos es el agua.

Figura 5- Destilador de aceites esenciales adaptado, utilizado en la presente tesis.
Detalle de las hojas de *O. quixos* después de la destilación



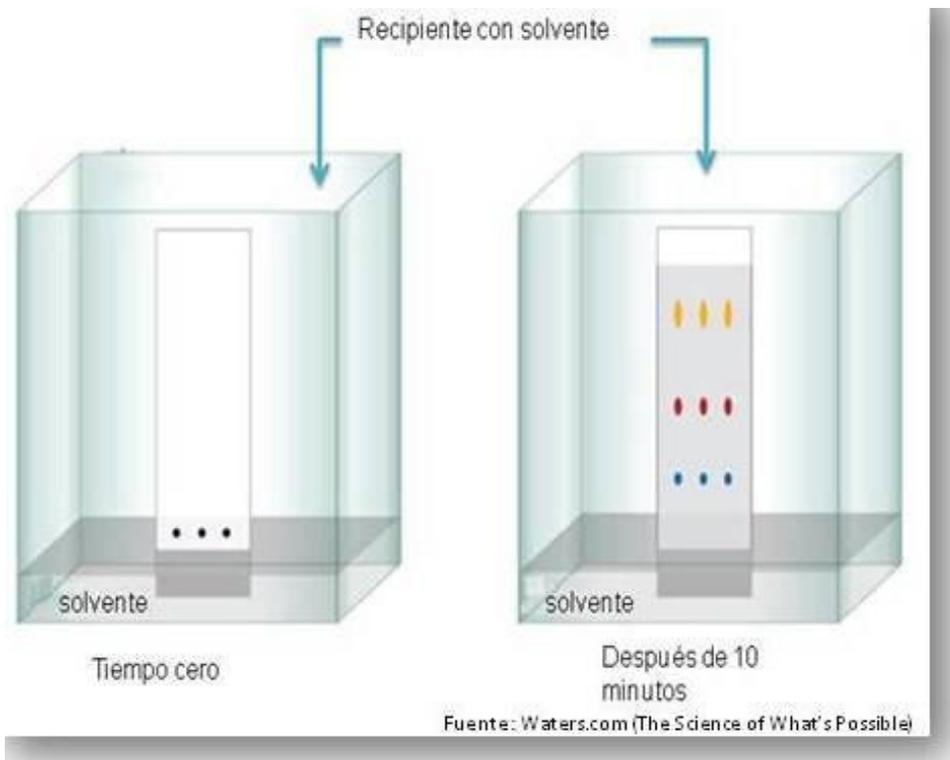
Fuente: Lopez L. 2012

Mediante el destilador de aceites esenciales adaptado, fueron destilados 7,5 kg de hojas de *Ishpink* en lotes de 500 gr debido a la capacidad del destilador. Cada destilación duró dos horas, siendo este el mejor tiempo de destilación comprobado en la calibración previa del destilador. El total del aceite esencial obtenido fue considerado como único lote de estudio. El vapor fue generado en un caldero externo (Figura 4) formado por un contenedor de aluminio que llevaba 2,5 litros de agua/destilación. El agua del caldero fue calentada mediante el uso de un mechero de gas. El rendimiento en porcentaje del aceite esencial de las hojas de *Ishpink* se ha determinado calculando la proporción entre el volumen de aceite obtenido y el peso fresco de la materia prima procesada.

3.3.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *O. quixos* MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Para la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial de *O. quixos* se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina (TLC-Thin Layer Chromatography), de acuerdo al esquema indicado en la Figura 6. La TLC es una técnica cromatográfica basada en el hecho que los diferentes compuestos de una mezcla tienden a separarse de manera diferente entre dos fases, estacionaria y móvil, dependiendo de su afinidad con cada una de estas. La fase estacionaria generalmente es un sólido o un gel mientras la fase móvil es un líquido o un gas. La fase móvil fluye sobre la estacionaria arrastrando consigo los compuestos que mayor afinidad llevan con ella. El resultado es la separación visible de los compuestos que integran la muestra analizada. La TLC es usada para análisis cualitativos o semi-cuantitativos.

Figura 6- Esquema demostrativo de la cromatografía de capa fina (TLC – Thin Layer Chromatography)



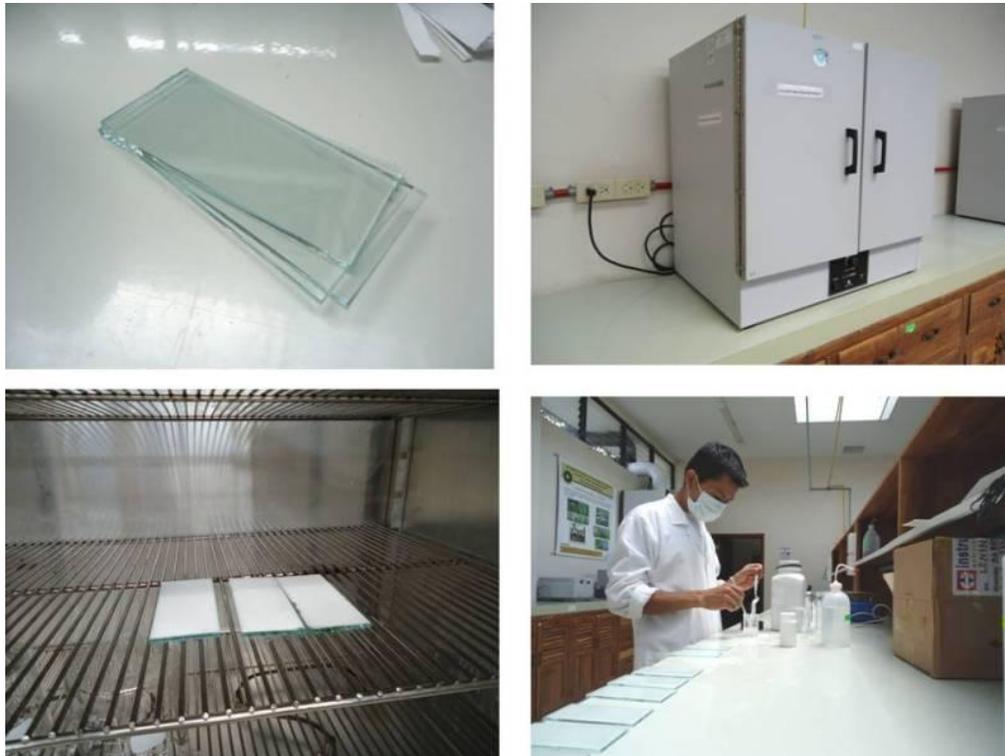
Fuente: Waters.com 2012

Con la finalidad de encontrar la adecuada combinación de las dos fases se realizaron algunas variaciones en cuanto a las fases móvil y estacionaria. Los eluyentes (fase móvil) utilizados para los ensayos fueron 6 en total: 1) etanol al 99%, 2) cloroformo, 3) tetra cloruro de carbono, 4) tolueno, 5) cloroformo y tolueno (1/1), y 6) etanol 99% y tetra-cloruro de carbono (1/1). El revelado se realizó con ácido sulfúrico diluido en agua destilada (1/1). El aceite esencial fue caracterizado químicamente por TLC, con dos repeticiones para cada eluyente ensayado.

La TLC se ha realizado utilizando placas de vidrio debidamente preparadas en el laboratorio. Para la preparación de las placas de TLC se procedió inicialmente con la fase de lavado y sucesivamente con la fase de secado en estufa por cinco minutos a 180°C. Luego en un vaso de precipitación se mezcló la silicagel en polvo con agua en una proporción de 1:2. La silicagel líquida se hizo fluir sobre las placas de vidrio con la precaución de distribuirla de forma homogénea sobre toda la superficie. Sucesivamente las placas se dejaron secar al ambiente durante 30-45 minutos y luego fueron puestas en la estufa a 121°C durante 45 minutos (Figura 7) (Pasto, 2003).

Una vez encontrado el mejor eluyente se procedió a realizar un ensayo comparativo con el aceite esencial de *Ishepink* que se adquirió en la Fundación Chankuap, para posteriormente compararlo con una tabla colorimétrica. La Fundación Chankuap es una ONG ecuatoriana que se dedica a apoyar a comunidades amazónicas de Morona Santiago y Pastaza, implementando cadenas de valor basadas sobre recursos de la biodiversidad. Entre otros productos, extraen y venden aceites esenciales.

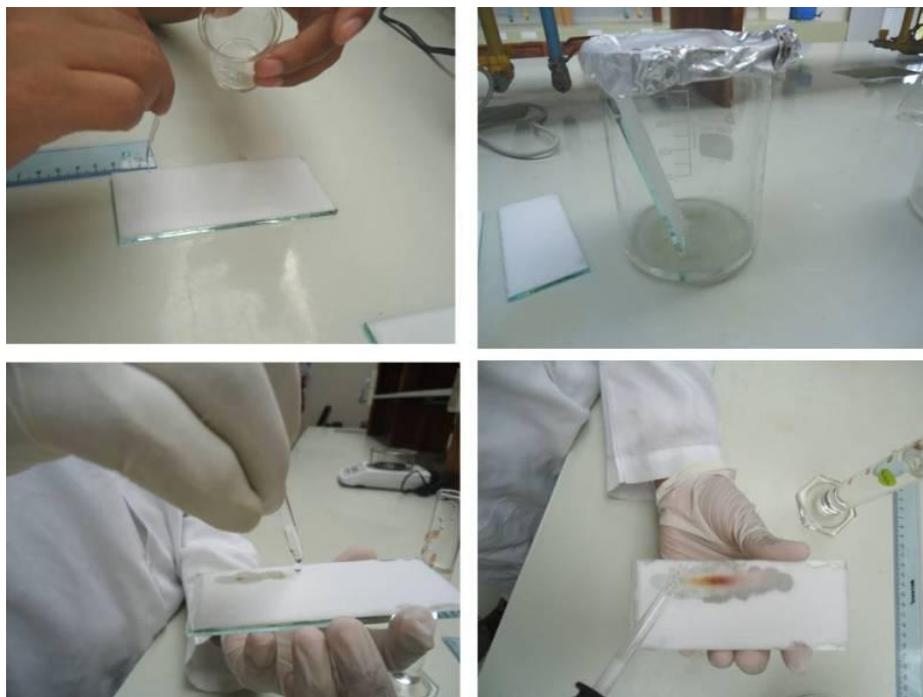
Figura 7- Preparación de las placas de vidrio para TLC. Placas de vidrio, estufa, placas con silica gel en fase de secado, preparación de las placas en laboratorio.



Fuente: López L, 2012

Para realizar la TLC del aceite esencial de *Ishpink*, se procedió a colocar una pequeña cantidad de aceite esencial mediante un capilar de vidrio en la parte inferior de la placa a 2 cm de distancia del borde. Luego se introdujo la placa en un vaso de precipitación de un litro con 30 mL de eluyente de ensayo; el recipiente se tapó con papel aluminio para que se sature la parte interna del vaso. Después de haber comprobado que el eluyente recorriera cada placa por capilaridad, se extrajeron dejándolas secar al ambiente. Finalmente se revelaron las placas con la utilización de ácido sulfúrico (diluido en agua con una proporción 1:1) (Figura 8).

Figura 8- Análisis TLC del aceite esencial de *O. quixos*: puesta de aceite esencial mediante capilar, saturación del ambiente interno, revelado con ácido sulfúrico



Fuente: López L, 2012

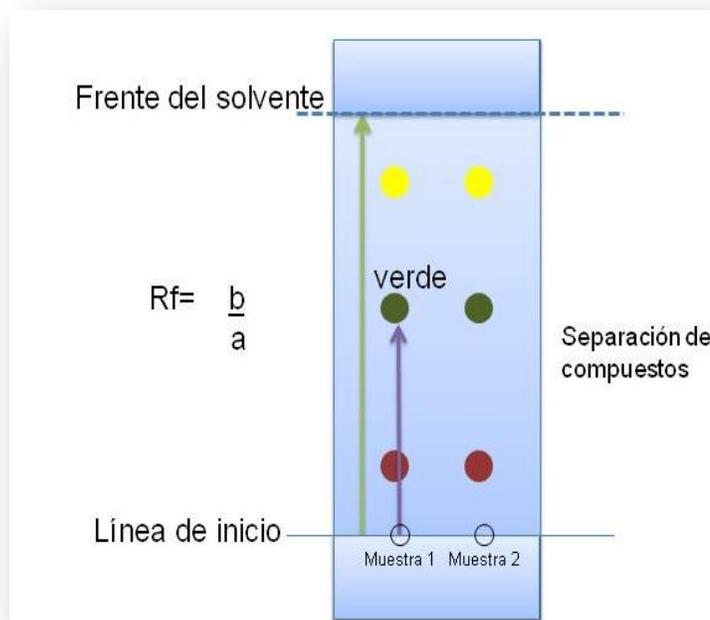
El análisis cromatográfico del aceite esencial de *Ishpink* se comparó con aquello de la Fundación Chankuap de Macas (Morona Santiago, Ecuador), debido a que ese aceite esencial ha sido objeto de una publicación científica en la cual se ha determinado su composición química (Bruni, 2004). Por lo tanto se ha considerado el aceite esencial de *O. quixos* de la Fundación Chankuap como patrón. La determinación de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial se ha determinado por comparación colorimétrica, usando la tabla de reconocimiento de mono-terpenos por cromatografía de capa fina de Martínez (2003).

Los aceites esenciales, al ser mezclas complejas de compuestos alifáticos de bajo peso molecular, (monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos) requieren de variados métodos de identificación, los cuales se basan en procedimientos experimentales que permiten reconocer por separado estos

componentes volátiles. De la misma forma un aceite esencial puede contener también más de 100 compuestos diferentes, que sería muy complejo identificar individualmente mediante la metodología de la TLC.

Por ende nos enfocamos en identificar cualitativamente los compuestos más característicos del aceite, basándonos en la tabla de reconocimiento de Martínez (2003) con el fin de comparar cualitativamente el aceite extraído con aquello del patrón comercializado por la Fundación Chankuap. Según la tabla de reconocimiento de Martínez, los compuestos son identificados por su coloración al reaccionar con diferentes reactivos, y por sus Factores de Retención ($R_f = \text{Retention Factor}$). Los R_f resultan de la proporción entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el eluyente, como se muestra en la Figura 9.

Figura 9- Ejemplo de la determinación colorimétrica de los componentes químicos de un aceite esencial



Fuente: López L, 2012

3.3.4. FORMULACIÓN DEL DESINFECTANTE CON ACEITE ESENCIAL DE *Ocotea quixos*

Para la formulación del desinfectante se tomó como referencia el método de González (2012), aportando algunas modificaciones que permitieran, al mismo tiempo, cumplir con la Directiva de la Unión Europea 2003/53/CE (referente a la limitación de la comercialización y el uso de sustancias peligrosas). En la Tabla 4 se describen los ingredientes utilizados para la formulación del desinfectante y las respectivas concentraciones. Al utilizar como ingrediente el aceite esencial de *O. quixos*, se buscó aumentar la capacidad bacteriostática del producto, ya que éste compuesto, como la mayoría de aceites esenciales, tiene comprobadas y elevadas propiedades antibacterianas (Bruni, 2004).

Tabla 4- Ejemplo de ingredientes utilizados en la formulación de desinfectantes industriales

Ingredientes desinfectante industrial (González & Lozada)	Cantidades permitidas
NONIL FENOL (Germicida y antiseptico)	< 0,1%* (en masa)
AMONIO CUATERNARIO (Desinfectante, fungicida, bactericida y desodorante)	<1,28% [♦]
ACEITE ESENCIAL DE ISHPINK (Antimicrobiano)	0,09% < x <1,25% ^{♦*}
AGUA DESTILADA	Hasta completar 100%

Fuente: López L, 2012

* = Directiva Unión Europea n. 2003/53/CE

[♦]= Arévalo, 1998

^{*}= Noreiga & Dacarro, 2008

En el trabajo de tesis se preparó una cantidad de desinfectante equivalente a 100 mL como fórmula base. Para la elaboración se midieron 50 mL de agua desmineraliza, a los cuales se agregaron posteriormente 0,2 mL de nonil

fenol, 0,2 mL de amonio cuaternario y 0,1 mL de aceite esencial de *IsHPink* (Tabla 5). Sucesivamente se agregaron los mililitros de agua desmineralizada faltantes, completando, de esta forma, los 100mL. Todo el proceso se realizó manteniendo el producto en constante agitación. El desinfectante elaborado se dejó en reposo durante 24 horas.

Tabla 5- Ingredientes usados en la formulación del desinfectante de uso agroindustrial a base de aceite esencial de *O. quixos*

Ingrediente	Porcentaje
Nonilfenol (10 moles)	0,20 %
Amonio Cuaternario	0,20 %
Aceite esencial <i>O. quixos</i>	0,10 %
Agua destilada	99,50 %

Fuente: López L, 2012

Los amonios cuaternarios como los nonil fenoles son solubles en agua y alcohol. La acción microbicida de ambos se la atribuye a la desnaturalización de las enzimas bacterianas y puede actuar ya desde concentraciones cercanas al 0,02%. En cuanto a los amonios cuaternarios las concentraciones pueden también superar la cantidad señalada debido a que no tienen limitaciones por su baja toxicidad (Arévalo, 1998).

En cambio el compuesto que tiene una restricción de uso es el nonil fenol, ya que existen estudios que relacionan este y muchos otros compuestos derivados de biocidas, plaguicidas y algunos derivados plásticos, con la alteración del equilibrio hormonal animal. En efecto el nonil fenol actúa como un disruptor endocrino, es decir un compuesto capaz de incorporarse a las células de un organismo vivo a nivel hormonal y causar alteración (Félix, 2009).

El aceite esencial de *IsHPink* (*O. quixos*), tiene actividad antimicrobiana contra los siguientes microorganismos patógenos humanos: *Candida*

albicans, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus piogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. A la concentración de 1,25% tiene actividad contra *E. coli* y a concentraciones de 0,09% hasta 1,25% contra las demás bacterias (Noriega & Dacarro, 2008).

3.4. FACTORES DE ESTUDIO

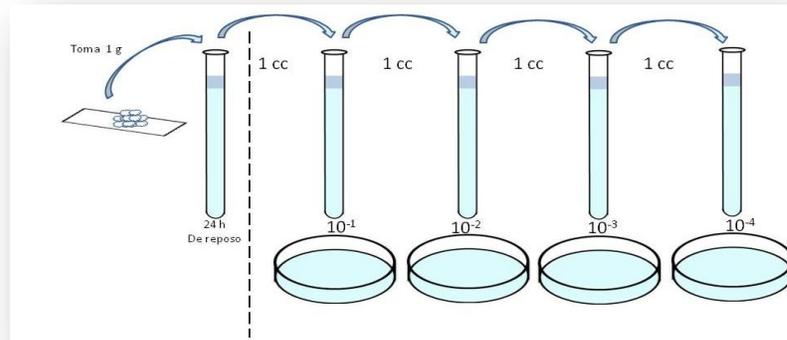
Los factores de estudio de esta tesis han sido por un lado la cantidad de aceite esencial extraída de las hojas (expresada en mililitros) y las concentraciones de desinfectante (expresadas en microlitros) elaborado a base de aceite esencial de ishpink.

3.4.1. DETERMINACIÓN DE LAMÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC) DEL DESINFECTANTE A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE *Ocotea quixos*

Para evaluar la actividad desinfectante de la formulación objeto de estudio, se determinó su Mínima Concentración Inhibitoria (MIC). La MIC corresponde a la concentración más baja del producto, capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo después de haber sido incubado (Andrews, 2001).

El ensayo se realizó con la bacteria patógena *Escherichia coli*. El primer paso fue preparar el inóculo inicial de la bacteria y determinar la concentración de la bacteria por mililitro de solución. A tal fin se transfirió 0,1 mL de cultivo madre conservado en glicerol en 1 mL de agua peptonada al 1% (DIFCO). El caldo inoculado se dejó en incubadora (Memmert UNB500) a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de la bacteria. Sucesivamente se realizó el conteo bacteriano mediante el método de las diluciones sucesivas (Figura 10), a fin de determinar exactamente las UFC/mL (Unidades Formadoras Colonias) (Malbrán, 2001).

Figura 10- Esquema del método de las diluciones sucesivas

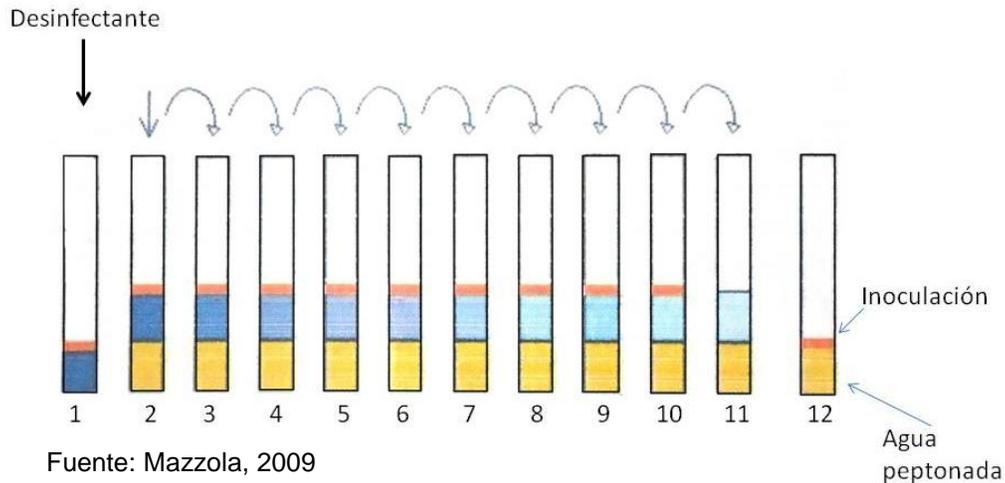


Fuente: Mazzola, 2009

La dilución sucesiva es cualquier dilución en la cual la concentración del microorganismo disminuye de la misma cantidad en cada paso sucesivo. El método de las diluciones sucesivas prevé realizar diluciones en progresión geométrica (1/10, 1/100, 1/1000, etc.) de la muestra líquida de la bacteria. Se preparan tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada estéril al 1%, en número correspondiente a las diluciones que se quieren realizar. Con una pipeta estéril se retiró 1 mL de suspensión bacteriana, después de 12 horas de incubación y se transfirió en el tubo 1 (dilución 10^{-1}). Luego del tubo 1 se retiró 1 mL de solución y se agregó al tubo 2 (dilución 10^{-2}) y así hasta el tubo 4 con una dilución de la muestra inicial de 1/10.000. Sucesivamente se sembró por triplicado 0,1 mL de muestra de cada dilución en cajas Petri con agar nutritivo (DIFCO), previamente esterilizado, anotando en cada caja la respectiva dilución. El número de bacterias por mililitro se obtiene multiplicando el promedio de bacterias de las tres repeticiones para el inverso de la dilución

Después de haber determinado la concentración de bacteria se pasó a determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) del desinfectante (Figura 11).

Figura 11- Esquema del método de las diluciones sucesivas para determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) del desinfectante a base de aceite esencial de Ishpink



Fuente: Mazzola, 2009

A tal fin se tomaron 12 tubos de ensayo, se colocó 1 mL de agua peptonada al 1% en cada tubo, menos en el tubo 1. Un mililitro de desinfectante fue puesto en el primer tubo y otro en el segundo tubo. El tubo 2 fue agitado y 1 mL de su solución fue agregada al tubo 3; lo mismo se repitió hasta el tubo 11. Cada tubo, excluyendo el número 11, fue inoculado con 100 μL de *E. coli* a la concentración de 1×10^8 UFC/mL, utilizando una micropipeta. El tubo 12 representa el control positivo (agua peptonada+inoculo), mientras el tubo 1 representa el control negativo (desinfectante+inoculo). Los tubos fueron puestos en incubadora a 37°C durante 48 h. Después de este tiempo se observó el nivel de turbidez de las soluciones de cada tubo (Figura 12). La MIC correspondió a la concentración del tubo con la dilución más alta en el cual había ausencia de crecimiento microbiano (ausencia de turbidez) (Mazzola, 2009).

El factor de estudio considerado fue el desinfectante a diferentes concentraciones. En lo específico se han tomado en cuenta 11 concentraciones correspondientes a 11 tratamientos. Cada tratamiento se

realizó por triplicado, por lo tanto se ha trabajado con 33 unidades experimentales. Los resultados son expresados en base a la presencia (+) o ausencia (-) de turbidez (Tabla 3).

Tabla 6- Factor de estudio y niveles del factor de estudio, tomados en cuenta en la elaboración de un desinfectante a base de aceite esencial de *O. quixos*

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[DES]* μL/mL	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,80	3,90	1,95	0,99	0
[AE]** μL/mL	100	50	25	12,5	6,25	3,10	1,56	0,80	0,40	0,19	0,09	0
Rep.1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rep.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rep.3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Fuente: López L, 2012

*=Concentración del desinfectante expresada en μL/mL (Factor de estudio), y concentración por cada tubo (Niveles del factor de estudio)

**=Concentración de aceite esencial expresada en μL/mL en cada dilución

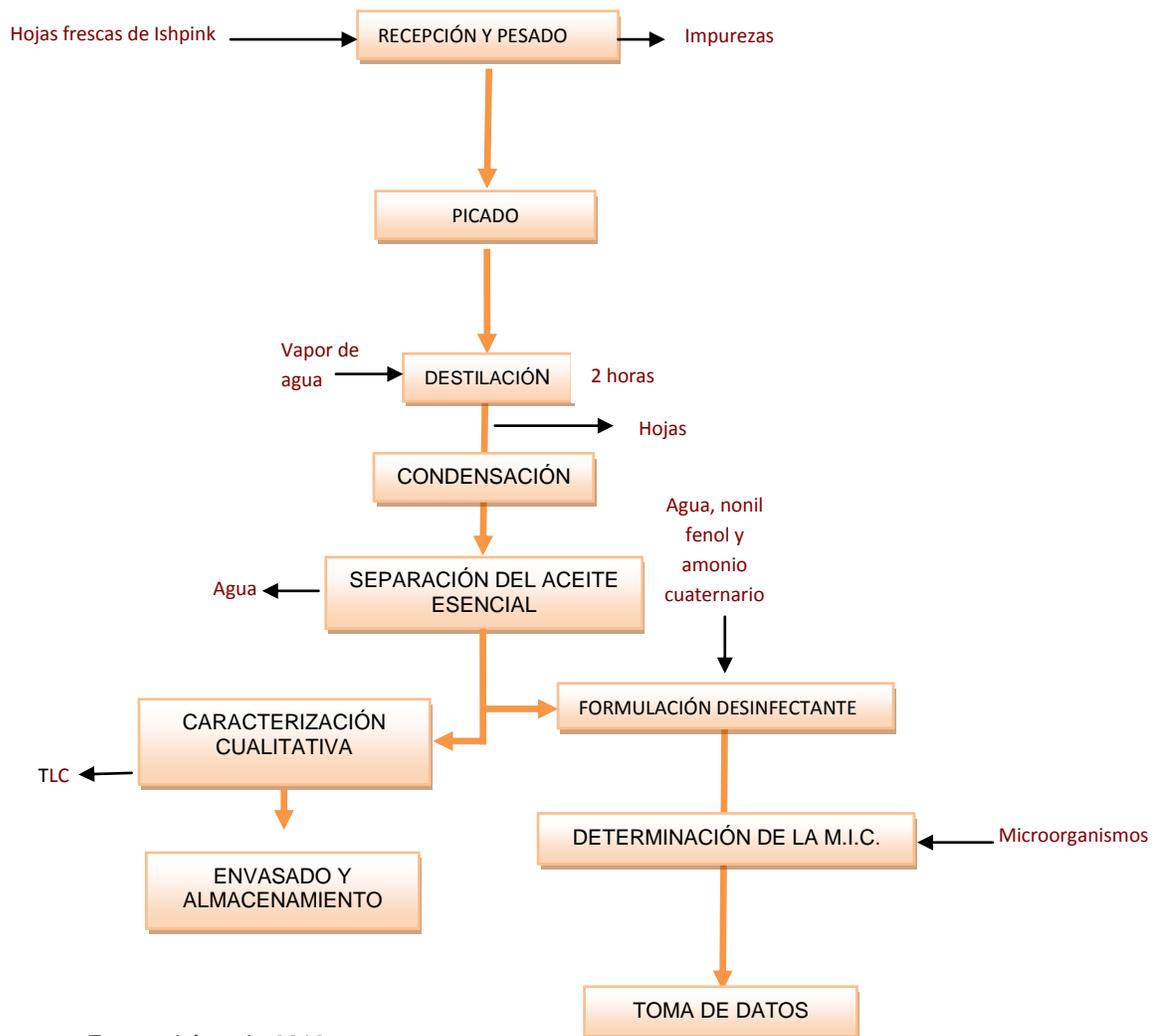
Figura 12- Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) del desinfectante con aceite esencial de *Ishpink*



Fuente: López L, 2012

3.5. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO EXPERIMENTAL

Figura 13- Proceso de elaboración de desinfectante a base de aceite esencial de *O. Quixos*



Fuente: López L, 2012

3.5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL DIAGRAMA DE FLUJO

a) **Recepción y pesado.** Una vez recolectadas las hojas de *O. quixos*, estas fueron llevadas al laboratorio de Agroindustrias de la U.E.A, donde se procedió a pesarlas;

b) **Picado.** Las hojas previamente pesadas, con la ayuda de una tijera de metal, fueron cortadas en trozos de aproximadamente 1cm, con el fin de facilitar el paso del vapor en el tejido vegetal, durante la sucesiva fase de destilación;

c) **Destilación.** Las hojas cortadas fueron atravesadas por vapor de agua, inyectado desde la parte superior del equipo de destilación, durante dos horas. Durante la destilación se produce una mezcla de vapor de agua y vapor de aceite;

d) **Condensación.** Este proceso se da simultáneamente a la destilación. La mezcla de vapores de agua y aceite esencial atraviesa el tubo refrigerante a base de agua, donde, gracias a la transferencia de calor entre agua fría y vapores, se obtiene la condensación de agua y aceite;

e) **Separación del aceite esencial.** El agua y el aceite respectivamente condensados salen del tubo refrigerante y chorrean en un embudo de separación, donde posteriormente son separados y medido mediante el uso de una bureta graduada;

f) **Caracterización cualitativa.** Una muestra de aceite esencial fue analizada químicamente para caracterizar su composición mediante cromatografía en capa fina (TLC). Adicionalmente se procedió a comparar la composición química del aceite esencial de *O. quixos* obtenido con una muestra patrón de aceite de la Fundación Chankuap;

g) **Envasado y almacenamiento.** El aceite esencial de *O. quixos* fue conservado en botellas de vidrio ámbar, en lugar fresco y seco;

h) **Formulación del desinfectante.** Para la formulación del desinfectante se consideraron las normativas americanas y europeas en cuanto a la elección de los ingredientes. Para ello se utilizaron el 0,2% de nonil fenol (10 moles),

0,2% de amonio cuaternario y 0,1% de aceite esencial de Ishpink, mezclándolos homogéneamente y dejándolos reposar por 24 horas;

i) **Determinación de la MIC.** Para la determinación de la MIC se aplicó el procedimiento de Mazzola, (2009) mediante diluciones sucesivas;

j) **Toma de datos.** La toma de datos se realizó de forma cualitativa, según la presencia (+) o ausencia (-) de turbidez en los tubos de ensayo (concentración que no inhibe o inhibe el crecimiento bacteriano).

3.6. ANÁLISIS ECONÓMICO

Para el análisis económico se consideró el precio de los materiales e ingredientes utilizados para la elaboración del desinfectante, en base a las cantidades permitidas según las normativas vigentes señaladas en la Tabla 4. De la misma forma se consideraron los costos de mano de obra, de servicios básicos y la depreciación de los equipos empleados, considerando una producción estimada de 100 litros, como se muestra en la Figura 14. Los demás costos (administrativos, de venta, propaganda entre otros) no se consideraron en esta tesis de grado, siendo enfocada a la parte técnica de elaboración del desinfectante.

Figura 14 - Análisis económico de la formulación de 100 L de desinfectante a base de aceite esencial de *O. quixos*

Presupuesto o Costo total de Producción

Costo de producción		USD/100 L
Detalle		
Ingredientes		55.12
Servicios básicos		10.00
Mano de obra directa		5.00
Depreciaciones		20.00
Total		70.12

Costo ingredientes		
Detalle	Cant.(Litros)	USD/100 L
Nonilfenol	0.20	0.66
Amonio Cuaternario	0.20	0.66
Aceite esencial	0.10	44.00
Agua tratada	99.50	10.00
TOTAL	100.00	55.12

Fuente: López L, 2012

La rentabilidad de la inversión se calculó mediante el análisis de la relación entre la ganancia y el costo que surgen al preparar 100 litros de desinfectante, ya que el desinfectante como tal debe inhibir el crecimiento de la mayoría de bacterias presentes en el medio agroindustrial.

Para la determinación del precio de venta unitario (Pu) se calculó primero el costo unitario (Cu) de cada litro de desinfectante, estimando una utilidad del 25% del costo variable unitario (V); este valor se obtiene de la división del presupuesto total de producción para la cantidad de desinfectante producido (Gutiérrez L. & Rodríguez G. 2009).

El costo unitario se calculó aplicando la siguiente fórmula:

Costo unitario:
$$Cu = \frac{CT}{\text{Cant. Producto}}$$

Costo unitario:
$$Cu = \frac{CT}{100 \text{ L}}$$

Donde:
 Cu= costo unitario
 CT= Costo total
 V= Costo variable unitario
 Pu = Precio unitario
 Rentabilidad = 1-0.25

El precio de venta unitario (Pu) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

Precio unitario=
$$\frac{Cu}{1 - \text{rentabilidad}/100}$$

Precio unitario:
$$Pu = \frac{Cu}{1-0.25}$$

El beneficio bruto (BB) se obtuvo multiplicando la cantidad producida (100 L) por el precio de venta unitario (Pu). Mientras que el beneficio neto (BN) se calculó restando el costo total de producción a la ganancia total:

Beneficio Neto:
$$BN = \text{Ganancia total} - \text{Costo total producción}$$

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTO EN ACEITE ESENCIAL DE *O. quixos*

Previamente a la destilación del aceite esencial de *O. quixos*, se realizaron pruebas de calibración del destilador a fin de determinar el mejor tiempo de destilado. El tiempo de destilación más provechoso, tanto en términos de rendimiento en aceite esencial que de tiempo de destilación, corresponde a dos horas (Tabla 7). Después de 4 horas de destilación el rendimiento máximo promedio en aceite esencial es de 1,13 mL; Sin embargo se observa que ya a las dos horas de destilación se obtiene un rendimiento muy parecido y correspondiente a 1,07 mL. Por ende, considerado que hay una diferencia mínima en rendimiento entre destilar 2 horas y 4 horas, se eligió considerar como mejor tiempo de destilación las 2 horas.

A partir de 7,5 Kg de hojas de *O. quixos* se obtuvieron 21,9 mL de aceite esencial.

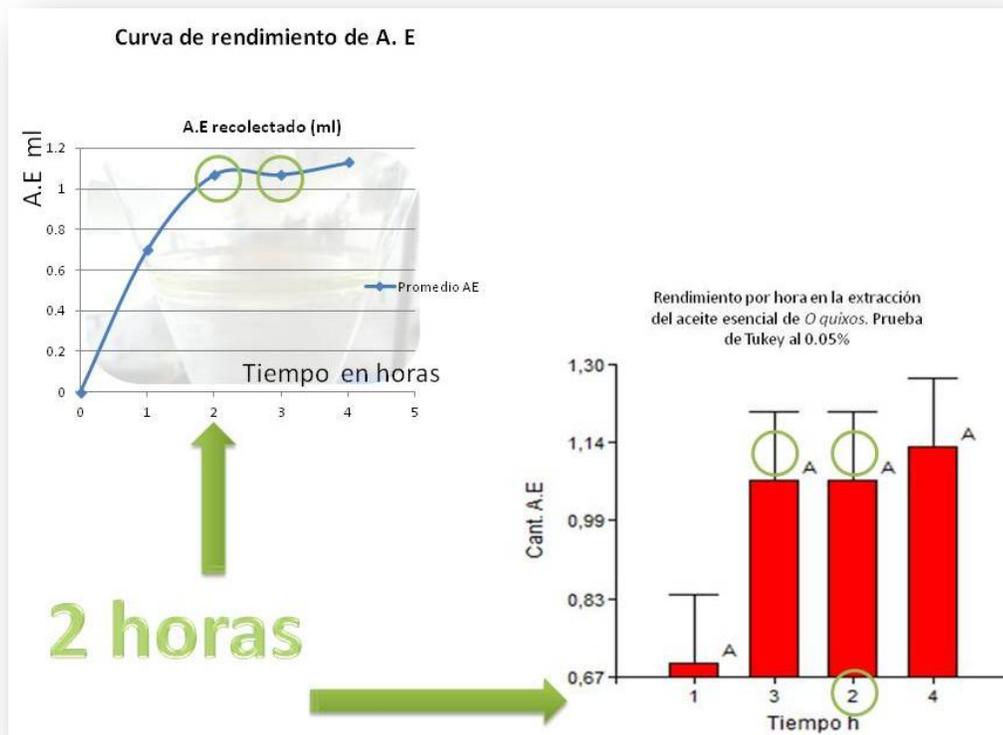
Tabla 7- Comparación de datos de las tres destilaciones consideradas como repeticiones para determinar el mejor tiempo de destilación

TIEMPO		1 hora		2 horas		3 horas		4 horas	
Repetición		Hojas (kg)	A.E. (ml)						
	1	0.50	0.50	0.50	0.80	0.50	1.20	0.50	1.00
	2	0.50	0.70	0.50	1.30	0.50	0.70	0.50	1.10
	3	0.50	0.90	0.50	1.10	0.50	1.30	0.50	1.30
total		1.50	2.10	1.50	3.20	1.50	3.20	1.50	3.40
Promedio A.E.		0.50	0.70	0.50	1.07	0.50	1.07	0.50	1.13

Fuente: López L, 2012

Según la prueba de Tukey al 0,05% se puede notar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (horas). Eso implica que sería igual destilar durante dos o tres horas, aunque numéricamente ya se puede observar que entre estos rangos de tiempo ya no varía significativamente la cantidad de aceite que se extrae. Entonces en vista de que se busca eficiencia, se descartan los tiempos muy prolongados (3 y 4 horas), puesto que al final se obtiene el mismo resultado en mililitros de aceite esencial.

Figura 15- Detalles de la calibración del equipo de destilación. Curva de rendimiento y análisis de varianza según la prueba de Tukey al 0.05%



Fuente: López L, 2012

Tabla 8- Valores de aceite esencial de *O. quixos* obtenidos en cada destilación y mililitros totales (expresados en mL)

Destilaciones	A.E. (mL)
1	1.1
2	1.8
3	1.3
4	1.4
5	1.5
6	1.6
7	1.4
8	1.4
9	1.5
10	1.4
11	1.6
12	1.5
13	1.4
14	1.5
15	1.5
total	21.9

Fuente: López L, 2012

En el presente trabajo de tesis se destilaron 7,5 Kg de hojas de *IsHPink*, en quince destilaciones de 0,5kg cada una. En la Tabla 8 se observan los mililitros de aceite esencial obtenidos en cada destilación así como el valor total.

Un parámetro importante a ser evaluado en el aceite esencial fué la densidad; esta se calculó mediante la fórmula $d=m/v$ (densidad = masa/volumen). En la Tabla 9 se comparan los valores de densidad del aceite esencial de *IsHPink* de la presente tesis con los de la Fundación Chankuap. Ambos aceites tienen un valor de densidad de 0,94 gr/mL.

Tabla 9- Comparación de los valores de densidad del aceite esencial de Ishpink obtenido en la presente tesis con la muestra de la Fundación Chankuap

	A.E. Chankuap	A.E. (Tesis)
Masa (gr)	26,29	10,28
Volumen (mL)	28,00	10,00
Densidad (gr/mL)	0,94	0,94

Fuente: López L, 2012

El rendimiento en aceite esencial se puede también presentar en términos porcentuales, para obtener este dato se realizaron los siguientes cálculos:

$$\%R = \text{Peso del producto} / \text{peso de la materia prima} \times 100$$

El peso del producto, es decir del aceite esencial, se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$M = d/v = 0,94 \text{ mL/gr} \times 21.9 \text{ mL} = \mathbf{20,58gr}$$

Con el valor de la masa se pudo calcular el rendimiento porcentual:

$$\%R = \frac{\text{peso del producto}}{\text{peso mat. prima}} \times 100 = \frac{20,58 \text{ gr}}{7500 \text{ gr}} \times 100 = \mathbf{0,27\%}$$

Con el aceite esencial de Chankuap se hicieron los mismos cálculos, utilizando 30 mL de aceite esencial:

$$M = dxv = 0,94 \text{ mL/gr} \times 30 \text{ mL} = \mathbf{28,20 \text{ gr}}$$

$$R\% = \frac{28,20 \text{ gr}}{10000 \text{ gr}} \times 100 = \mathbf{0,28\%}$$

Comparando el rendimiento en aceite esencial de *O. quixos* obtenido por Noriega & Dacarro (2008), el rendimiento alcanzado en la extracción (0.27% ó 2.92mL/kg) con el equipo adaptado se que los rendimiento se acerca al de los autores citados.

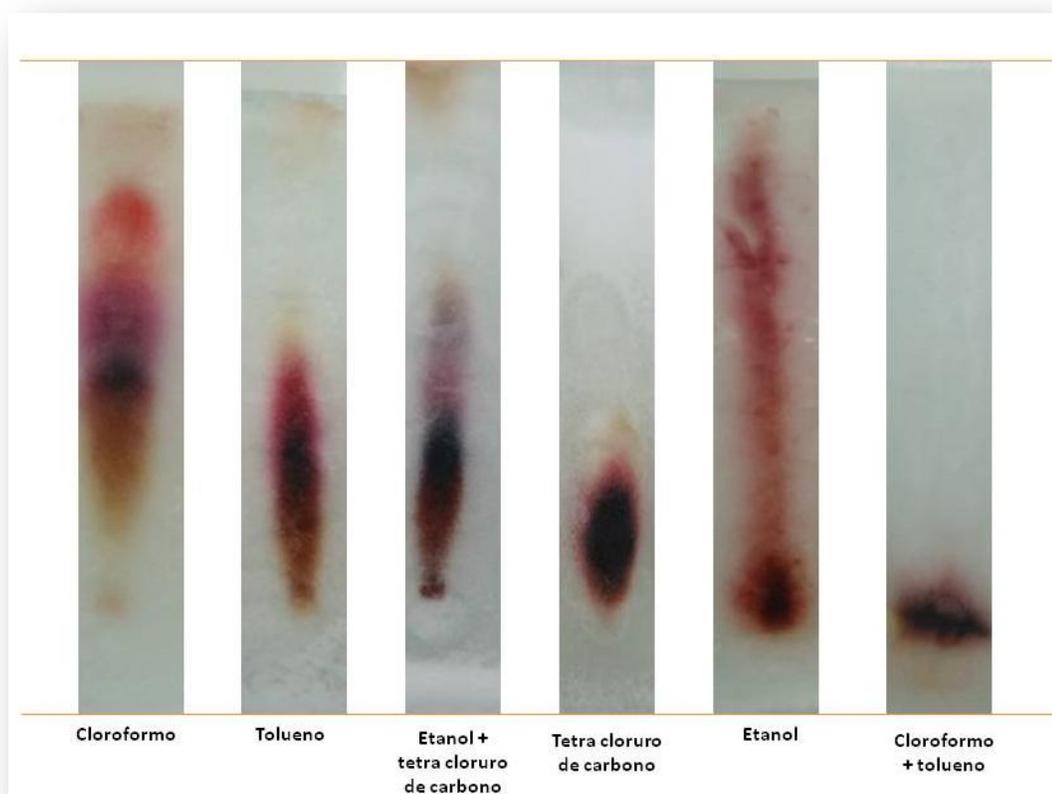
4.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *O. quixos* MEDIANTE TLC

Después de haber destilado el aceite esencial de *Ishpink* se procedió a caracterizarlo químicamente mediante TLC. En la Figura 16 se puede observar cómo se separaron los compuestos del aceite esencial en base a cada eluyente utilizado. El mejor eluyente ha sido el cloroformo como indica la Figura 16. De hecho el cloroformo fue el eluyente que mejor separó los diferentes compuestos que forman el aceite esencial. Los diferentes colores, visibles en la correspondiente columna de la Figura 16, representan cada uno un tipo de compuesto diferente.

Por lo contrario los otros eluyentes no lograron separar los compuestos. Por ejemplo utilizando tetracloruro de carbono y cloroformo+tolueno se observó una mancha en correspondencia de la placa TLC lo cual significa que el aceite esencial no ha “corrido” a lo largo de la placa porque los eluyentes empleados no tenían afinidad química con los compuestos del aceite esencial. En el caso de tolueno, etanol+tetracloruro de carbono y etanol se observó una mayor separación de compuestos, comparado con los eluyentes anteriormente mencionados, sin embargo no fue posible una separación completa de las sustancias.

Con la caracterización colorimétrica según la tabla de Martínez se lograron identificar algunos compuestos, los mismos que se encuentran señalados en la Figura 17. Los compuestos que se han caracterizado son: α -pineno, limoneno, 1-8 cineol, α -terpineol. El α -pineno corresponde al color pardo, el limoneno al color pardo oscuro, el 1-8 cineol al verde y el α -terpineol al verde oscuro.

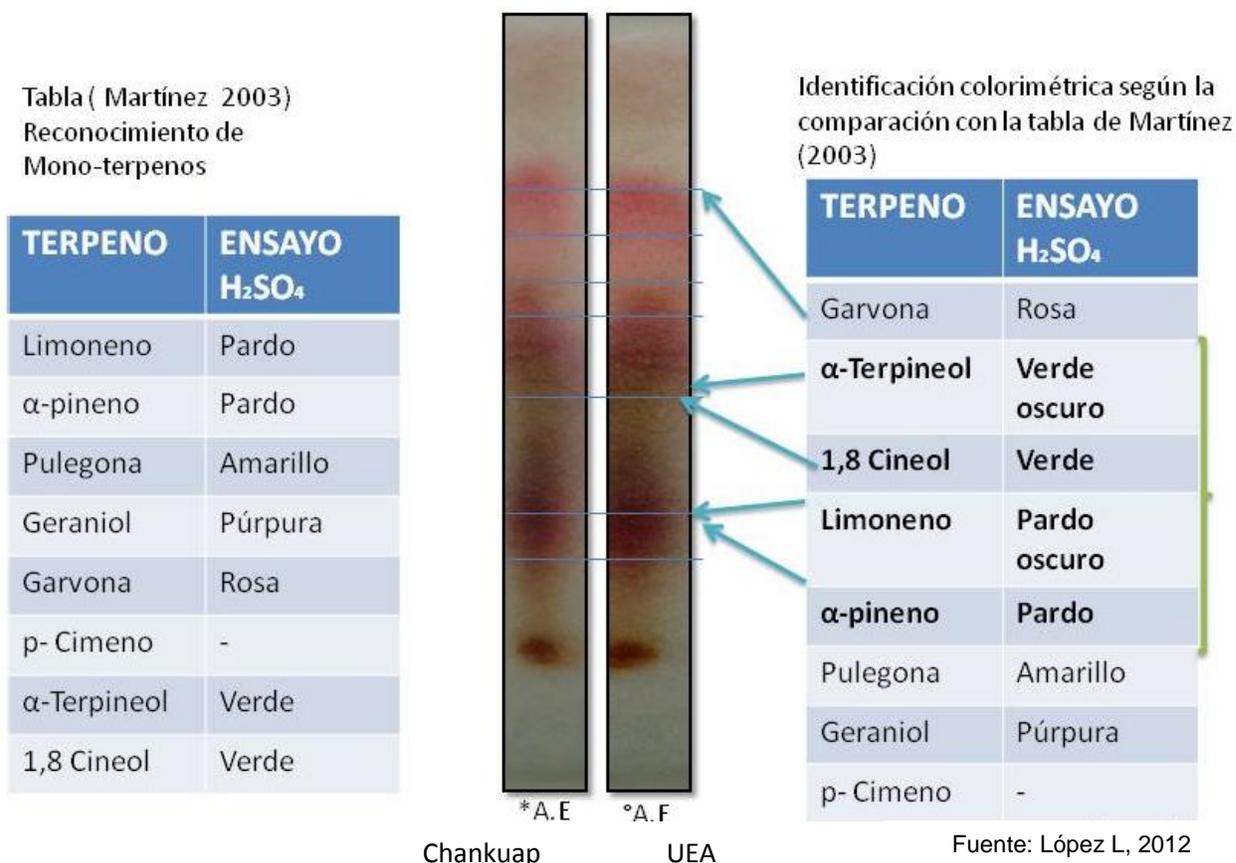
Figura 16 - Resultados de los ensayos realizados para determinar el mejor eluyente. De izquierda a derecha: mejor eluyente (cloroformo), peor eluyente (cloroformo + tolueno)



Fuente: López L, 2012

Como se puede observar en la Figura 17 la composición del aceite esencial de Ishpink de la presente tesis es aproximadamente parecida a aquella del aceite esencial de la Fundación Chankuap. La caracterización colorimétrica de los compuestos y la comparación entre los dos aceites nos permitió determinar la calidad de aceite. Con ello se asume que los dos aceites tienen las mismas características y la misma calidad.

Figura 17- Comparación del aceite esencial de Ishpink de la presente tesis con el aceite esencial de la Fundación Chankuap



4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL DESINFECTANTE ELABORADO A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE *O. quixos*

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del desinfectante, contra la bacteria patógena humana *E. coli*, se utilizó el método de las diluciones sucesivas indicado por Mazzola (2009).

En la Tabla 10 y en la Figura 18 se pueden observar los resultados obtenidos por cada tubo, a su vez inoculado con la bacteria y con el desinfectante a diferentes concentraciones. Se define “Concentración Mínima Inhibitoria” la concentración más baja del producto (desinfectante en este

caso), capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo después de haber sido incubado a la temperatura y días adecuados. Con el método de Mazzola la inhibición del crecimiento de un microorganismo se detecta mediante la ausencia de turbidez del medio presente en el tubo de ensayo. De hecho la turbidez es una señal de crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo líquido.

Observando la Tabla 10 se nota que la concentración mínima, del desinfectante a base de aceite esencial de *Ishpink*, que logra inhibir el crecimiento de *E. coli* corresponde a 3,90 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Esto significa que a concentraciones mayores de 3,90 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *E. coli* no logra crecer debido a la acción bacteriostática del desinfectante; mientras a concentraciones inferiores puede desarrollarse porque la cantidad de desinfectante es demasiado baja para tener algún efecto de inhibición del crecimiento bacteriano.

En la Tabla 10 se indica con el símbolo “-” la falta de turbidez en los tubos, lo cual corresponde a la falta de crecimiento de *E. coli*, y con el símbolo “+” la presencia de turbidez, lo que significa la presencia de *E. coli* en los tubos.

La MIC de 3,90 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de desinfectante corresponde a una concentración de aceite esencial de *Ishpink* de 0,40 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Tabla 10- Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del desinfectante, contra la bacteria Echerichia coli

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[DES]* μL/mL	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,80	3,90	1,95	0,99	0
[AE]** μL/mL	100	50	25	12,5	6,25	3,10	1,56	0,80	0,40	0,19	0,09	0
Rep.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	+
Rep.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	+
Rep.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	+

- = Falta de turbidez (Ausencia de la bacteria)
 + = Presencia de turbidez (Presencia de la bacteria)
 / = No se inoculó la bacteria

Fuente: López L, 2012

MIC

CRECIMIENTO BACTERIA

Figura 18- Verificación de la presencia y ausencia de turbidez para la concentración mínima inhibitoria del desinfectante



Fuente: López L, 2012

4.4. RESULTADO DEL ANÁLISIS ECONÓMICO

A fin de realizar el análisis económico de la producción del desinfectante, se calcularon:

Costo unitario (Cu):

$$\mathbf{Cu} = \frac{70,12 \text{ USD}/100\text{L}}{100 \text{ L}} = 0,70 \text{ USD/L}$$

Precio unitario (Pu):

$$\mathbf{Pu} = \frac{\text{Cu}}{1-0,25} = 0,70 \frac{\text{USD}}{0,75 \text{ L}} = 0,93 \text{ USD/L}$$

Beneficio neto (BN):

$$\mathbf{BN} = (100\text{L} * 0,93 \text{ USD/L}) - (70 \text{ USD}/100\text{L}) = 22.88 \text{ USD}$$

Una característica que no se puede dejar de lado es el precio, en este sentido se comparó el precio del producto desinfectante Ishpink con otros productos similares existentes en el mercado actual como se detalla en la Tabla 11. Tomando en cuenta el precio que se generaría al producir la misma cantidad de desinfectante en cada caso.

De acuerdo a un primer análisis del costo de producción y ganancias del desinfectante objeto de esta tesis, se puede observar que el producto tiene un precio de comercialización muy por debajo de los precios de otros productos desinfectantes (Tabla 11). Este dato es favorable para la puesta en comercio del desinfectante a base de aceite esencial de Ishpink. Cabe destacar que el precio de venta unitario del producto no consta todavía de los costos de propaganda, los cuales serán necesarios en fase de comercialización. Sin embargo se considera que los costos de propaganda

no afectarán mucho en el precio final de venta, debido a que constituyen aproximadamente el 2% del precio unitario.

Tabla 11- Comparación de productos desinfectantes en cuanto al volumen de la presentación comercial y precio

DESINFECTANTE	VOLUMEN PRODUCTO COMERCIAL	PRECIO EN USD	PRECIO POR CADA LITRO EN USD
Fresklin	100 mL	0.35	3.50
Olimpia	75 mL	0.22	2.93
Tips	150 mL	0.42	2.80
Ishpink	100 mL	0.093	0.93

Fuente: López L, 2012

El costo total calculado para la producción de 100 litros de desinfectante fue de 70.12 USD. El precio de venta de cada litro fue de 0.93 USD (Tabla 11).

Tabla 12- Análisis económico para la producción de 100 litros de desinfectante a base de aceite esencial de O. quixos

CT en USD	Cu en USD	Pu en USD	BB en USD	BN en USD
70.12	0.70	0.93	93.00	22.88

CT = Costo Total Cu = Costo Unitario PU = Precio Unitario
 BB = Beneficio Bruto BN = Beneficio Neto

Fuente: López L, 2012

El beneficio bruto es de 93.00 USD y tomando en cuenta la relación beneficio bruto/costo, se determinó que por cada dólar que se invierte se gana 1.33 USD, como se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Relación Beneficio/Costo para la producción de 100 litro de desinfectante a base de aceite esencial de O. quixos

CT en USD	BB en USD	Relación BB/CT en USD
70.12	93.00	1.33

Fuente: López L, 2012

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

- Se logró extraer el aceite esencial de las hojas de Ishpink (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) mediante destilación por arrastre de vapor obteniendo un rendimiento de 2.92 mL/Kg, lo cual en porcentaje corresponde al 0.27%;
- Mediante cromatografía en capa fina se caracterizó cualitativamente el aceite esencial de *O. quixos*. El análisis llevó a determinar la presencia de α -pineno, limoneno, 1-8 cineol y α -terpineol;
- Se formuló un desinfectante agroindustrial en base a la normativa americana y europea utilizando como ingredientes 0,20% de nonilfenol, 0.20% de amonio cuaternario, 0.10% de aceite esencial de *O. quixos* y agua destilada hasta completar el 100%;
- Se evaluó la eficacia *in vitro* del desinfectante agroindustrial elaborado a base de aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) contra la bacteria patógena *Echerichia coli* mediante la técnica de las diluciones sucesivas;
- Se determinó *in vitro* la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del prototipo de desinfectante a base de aceite esencial de Ishpink y se llegó a la conclusión de que puede inhibir el crecimiento bacteriano a concentraciones mayores a 3,90 uL/mL.

6. RECOMENDACIONES

☛ Es aconsejable adquirir un destilador de aceites esenciales de fabricación industrial, con la finalidad de contar con un equipo que asegure las mismas características de trabajo;

☛ Se recomienda realizar la caracterización química del aceite esencial mediante un cromatografo de gases acoplado a la masa (GC-MS), con la finalidad de poder identificar con mayor exactitud tanto los compuestos químicos del aceites como la cantidad;

☛ Se recomienda realizar ensayos de laboratorio adicionales con el fin de determinar la MIC del desinfectante sobre otras bacterias, principalmente las causantes de enfermedades en el hombre;

☛ Se recomienda realizar una formulación de desinfectante agroindustrial exclusivamente a base de aceite esencial de *IsHPink* y determinar la MIC a fin de establecer en que medida la acción inhibitoria del producto es debida a los ingredientes tradicionales (nonil fenol, amonio cuaternario) o al aceite esencial de *O. quixos*;

☛ Es recomendable buscar nuevos ingredientes para la formulación del desinfectante a base de aceite esencial de *O. quixos*, con la finalidad de estudiar la posibilidad de sustituir los principios activos convencionales con los aceites esenciales que tienen menores impactos ambientales;

☛ Se sugiere realizar ensayo de eficacia del desinfectante formulado en un laboratorio agroindustrial, con el fin de lograr complementar el estudio y de esta manera abrir nuevas pautas de producción de desinfectantes más amigables con el medio ambiente;

 Se sugiere realizar un estudio de factibilidad para el establecimiento de una pequeña empresa que produzca y comercialice el desinfectante a base de aceite esencial de Ishpink, con la finalidad de construir nuevas oportunidades de empleo aprovechando de forma sostenible los recursos propios de la Amazonía ecuatoriana como es el árbol de Ishpink.

7. RESUMEN

Este trabajo de tesis se realizó con el fin de evaluar la eficacia *in vitro* de un desinfectante de uso agroindustrial elaborado a base de aceite esencial de Ishpink (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) sobre la bacteria patógena *Escherichia coli* mediante la técnica de las diluciones sucesivas según Mazzola (2009). Las hojas de Ishpink fueron recolectadas en la Provincia de Napo, Cantón Tena, Parroquia Tena, Comunidad de Canoayacu ubicada a dos horas de la ciudad de Puyo. Se recolectaron 7.5 kilogramos de hojas frescas, las mismas que fueron traídas a los laboratorios de la Universidad Estatal Amazónica (Puyo Km2 ½ via a Napo) para ser destiladas por arrastre de vapor. Las hojas fueron previamente cortadas en pedazos de aproximadamente 1 cm de tamaño. El rendimiento en aceite esencial fue de 0.27%. Mediante el análisis de cromatografía en capa fina (TLC) se determinó cualitativamente la presencia de α -pineno, limoneno, 1-8 cineol, α -terpineol y se comparó con una muestra patrón de aceite esencial de *O. quixos* adquirida en la Provincia de Macas de la Fundación Chankuap. El análisis TLC confirmó de esta manera que efectivamente el aceite extraído para el trabajo de tesis es idéntico al aceite de la muestra patrón (Chankuap). Luego se elaboró una fórmula base del desinfectante considerando las normativas vigentes, utilizando 0.2% nonil fenol, 0.2% de amonio cuaternario y 0.10% de aceite esencial de *Ocotea quixos*, para finalmente determinar *in vitro* la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del desinfectante que es de 3,90 uL/mL.

Palabras clave: propiedad antimicrobiana, mínima concentración inhibitoria, biocida, canela amazónica

8. SUMMARY

This thesis was performed to evaluate the *in vitro* efficacy of an agro-use disinfectant made from Ishpink essential oil (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm) on the pathogenic bacterium *Escherichia coli*, using the technique of successive dilutions by Mazzola (2009). Ishpink leaves were collected in the Napo Province, Canton Tena, Canoayacu community, located two hours from the city of Puyo. We collected 7.5 kg of fresh leaves, they were brought to the laboratories of the Universidad Estatal Amazónica (Puyo via Napo ½ km²) to be processed by steam distillation. Leaves were previously cut into pieces of about 1 cm in size. The essential oil yield was 0.27%. The chemical characterization of the Ishpink essential oil was performed by thin layer chromatography (TLC). The presence of α -pinene, limonene, 1-8 cineole, α -terpineol was determined. The chemical composition was compared with a standard sample of *O. quixos* essential oil that was produced by Chankuap Foundation (Macas, Morona Santiago Province). TLC analysis confirmed that indeed the oil extracted for this thesis is identical to the standard sample oil (Chankuap). Then the agro-use disinfectant was formulated, according with the following formula: 0.2% nonyl phenol, quaternary ammonium 0.2% and 0.10% of *O. quixos* essential oil. Finally the minimum inhibitory concentration (MIC) of disinfectant was determined and it was of 3.90 μ L/mL.

Keywords: antimicrobial property, minimum inhibitory concentration, biocide, amazonian canela

9. BIBLIOGRAFÍA

Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl.S1, 5-16

Alba, T.& Araujo, F. (2008). Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapia en el laboratorio de PRONABELL LTDA. 17-18. Bucaramanga, Colombia: S/E

Arévalo J.M, J.L. Arribas, M.J.Hernández, M. Lizán. Coordinador: R. Herruzo. (1998). Guía de utilización de antisépticos, Grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos

Bruni R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C. & Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 85: 415-421

Castillo, M.C. & Hualpa, D.S. (2009). Consumo de lácteos sin procesar. CETTIA – Universidad Técnica Particular de Loja

FAO (1992). Conferencia Internacional sobre Nutrición. Roma

FAO (2008). Manual de Inspección de los alimentos basados en el riesgo. Roma, Italia

Féliz, M. (4 de 9 de 2009). Fundación Argentina de Ecología Científica. Recuperado el 12 de 12 de 2012, de [mitosyfraudes.org: http://www.mitosyfraudes.org/Papel/nonilfenol_feliz.html](http://www.mitosyfraudes.org/Papel/nonilfenol_feliz.html)

Fontecha, R.& Lizarazo, H. (2007). Diseño y construcción de un equipo de destilación para la extracción de aceites esenciales, usando los métodos de hidrodestilación, arrastre con vapor y destilación agua/vapor. En *Diseño de destiladores*. Universidad industrial de Santander (págs. Pag. 15-44). Bucaramanga, Colombia: S/E

González, F., Lozada, C., Miranda, Y. & Rodríguez, A. (2012). Programa de capacitación para la elaboración de productos de limpieza dirigido al personal obrero de la unidad educativa nacional “Héctor Castillo Reyes” del municipio Iribarren del Estado Lara. Barquisimeto

Gutiérrez L. & Rodríguez G. (2009). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de desinfectante líquido de piso para empresas o negocios en la ciudad de Guatemala. Guatemala (págs. 55-56)

INAMHI, 2012. Recuperado de <http://www.inamhi.gob.ec/index.php/red-de-estaciones/easytablerecord/2-prueba/1002>

Malbrán, C.G. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad de los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires, Argentina. Pág. 34

Martinez A.(2003). Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmaceutica , Medellín. Págs. 11-13.

Mazzola, P.G., Jozala, A.F., Novaes, C.L., Moriel, P. & Penna, V. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 45 (2)

Noriega, P.& Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. La granja 3: 2-8. Universidad Politecnica Salesiana

Organización Mundial para la Salud (OMS). (2007). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Departamento de Inocuidad de los alimentos, zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria.

Páez, J. R. (1960). Cronistas Coloniales. Quito: S/E Biblioteca mínima
Pasto, D.J. & C.R. Johnson (2003). Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté S.A., Barcelona

Pennington, T.D, Reynel, C. & A. Daza (2004). Illustrated guide of the trees of Perú. DH BOOKS.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidant, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91: 621-632

Sánchez Castellanos, F.J. (2006). Extracción de aceites esenciales – Experiencia colombiana. II Congreso Internacional de plantas medicinales y aromáticas.

Tortora G.J., Funke, B.R. & Case, C.L. (2007). Introducción a la microbiología. Editorial medica Panamericana. Buenos Aires.

Ulloa, C. (2006). Aromas y sabores andinos. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 313-328.