

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Proyecto de Grado

**“PROPUESTA DE FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO A PARTIR DE
ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AROMÁTICAS DEL SECTOR
VALLE DE LA PAZ EXTRAÍDO POR ARRASTRE DE VAPOR Y
FLUIDOS SUPERCRÍTICOS”**

Para optar el título de Licenciado en Química Industrial

PRESENTADO POR: ANAHI DEL ROSARIO MAMANI LARUTA

TUTORA: DRA. NICOLASA LOURDES VINO NINA

LA PAZ – BOLIVIA
2019

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida.

A mi mamá Ana por apoyarme en todo momento con su amor, consejos, apoyo incondicional, quien ha sabido formarme con buenos hábitos y valores permitiéndome ser una persona de bien.

A mi papá Javier quien con su esfuerzo y sacrificio hizo que nunca nos falte nada, por sus consejos, su apoyo y su cariño incondicional.

A mis abuelitos: Joaquín y Carmen, Mario y Regina que formaron parte de mi niñez y ahora desde el cielo han estado cuidándome y guiándome.

A mi hermanito Fernando Jesús por estar conmigo y apoyarme siempre.

A todas las personas que me apoyaron y me dieron su apoyo, aliento cuando más lo necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis netas propuestas.

A la Universidad Mayor de San Andrés, en especial a la Facultad de Tecnología por acogerme durante mis años de formación para poder desarrollarme como profesional, a los docentes por inculcarme sus conocimientos.

A mi tutora Dra. N. Lourdes Vino Nina, a quien le doy un profundo agradecimiento por brindarme la oportunidad de compartir su conocimiento, por su incondicional y valioso apoyo durante el proyecto, por sus consejos, paciencia y la confianza depositada en mí y sobre todo por su amistad.

A los miembros del tribunal: Lic. Eliana Patricia Duchén Uriarte, Lic. Marcelino Martínez y Lic. Pablo Pacohuanca Escalier, por las sugerencias y aportes al trabajo de investigación realizado.

Al herbario Nacional de Bolivia por haber colaborado con la identificación de especies vegetales.

A la facultad de Farmacia y Bioquímica y Ciencias Puras y Naturales quienes me abrieron las puertas de sus laboratorios y permitió el uso de los mismos.

A los fondos de investigación concursables de DIPGIS-UMSA, proyecto IDH "Aprovechamiento sustentable de aceites esenciales del departamento de La Paz" resolución H.C.U. Nº 080/2016. Por haber iniciado la investigación, ya que gracias a este proyecto pude continuar y concluir con la investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO 1.....	1
GENERALIDADES.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	2
1.3 Planteamiento del problema.....	7
1.4 Justificación	8
1.5 Objetivos.....	9
1.5.1 Objetivo general.	9
1.5.2 Objetivos específicos.....	9
1.6 Alcance	10
CAPITULO 2.....	11
MARCO TEÓRICO	11
2.1 Pisos ecológicos del departamento de La Paz	11
2.2 Plantas aromáticas.....	12
2.3 Aspectos generales de las especies vegetales a estudiar	13
2.3.1 Descripción del anís de monte (<i>Tagetes filifolia</i>).....	13
2.3.1.1 Composición del aceite esencial de anís de monte.	14
2.3.1.2 Propiedades y aprovechamiento del anís de monte.	14
2.3.2 Descripción de huacataya (<i>Tagetes terniflora</i> H.B.K).	15
2.3.2.1 Composición del aceite esencial de huacataya.	15
2.3.2.2 Propiedades de la huacataya.	16
2.3.3 Descripción de anu chijchipa (<i>Tagetes mandonii</i> Sch. Bip.).....	16
2.3.3.1 Composición del aceite esencial de anu chijchipa.	16
2.3.3.2 Propiedades y usos de anu chijchipa.....	17

2.3.4	Descripción de arrayan (<i>Myrcianthes osteomeloides</i> (Rusby) Mc Vaugh	17
2.3.4.1	Composición de aceite esencial de arrayan.....	18
2.3.4.2	Propiedades y usos del arrayan	18
2.4	Metabolitos secundarios	19
2.5	Aceites esenciales	20
2.5.1	Clasificación de los aceites esenciales.	21
2.5.2	Clasificación por su consistencia.	21
2.5.3	Clasificación por su origen.....	22
2.5.4	Clasificación por su naturaleza.	22
2.5.5	Características químicas de los aceites esenciales.	23
2.6	Historia del interés del aceite esencial	23
2.7	Métodos de extracción	25
2.7.1	Métodos directos.	26
2.7.2	Destilación.	26
2.7.2.1	Destilación por arrastre con vapor de agua.	27
2.7.2.2	Destilación con agua o hidrodestilación.....	28
2.7.3	Extracción con solventes.	29
2.7.3.1	Maceración en grasa.	29
2.7.3.2	Extracción con solventes volátiles	30
2.7.3.3	Extracción por fluidos supercríticos	30
2.7.3.3.1	Fluidos supercríticos.....	30
2.7.3.3.2	Dióxido de carbono como fluidos supercríticos	32
2.7.3.3.3	Extracción con fluidos supercríticos.....	33
2.8	Actividad antioxidante	35

2.8.1	Medición de la actividad antioxidante	36
2.8.1.1	Metodo de Folin-Denis.....	36
2.8.1.2	Ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2- picrilhidrazilo (DPPH)	37
2.8.1.3	Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2,- Azino- bis-3- etilbenzotiazolin- 6- sulfónico (ABTS)	38
2.9	Actividad antimicrobiana	39
2.9.1	Método de dilución.	40
2.10	Producto terapéutico	41
2.11	Mercado de gel terapéutico en Bolivia	41
CAPITULO 3.....		43
METODOLOGÍA		43
3.1	Flujograma del proceso de obtención del aceite esencial	43
3.2	Localización de la investigación	44
3.3	Método de recolección	44
3.4	Identificación	45
3.4.1	Rendimiento	45
3.5	Determinación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales	46
3.5.1	Propiedades organolépticas.	46
3.5.1.1	Determinación de color.....	46
3.5.2	Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.....	47
3.5.2.1	pH.....	47
3.5.2.2	Miscibilidad en etanol.	47
3.5.2.3	Densidad a 20 °C.	48
3.5.2.4	Índice de acidez.....	49

3.5.2.5	Índice de refracción.	50
3.5.2.6	Poder rotatorio.	51
3.5.3	Espectroscopia UV- Visible.	52
3.5.4	Espectroscopia Infrarroja.	53
3.5.5	Cromatografía en Capa Fina.	54
3.5.6	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	55
3.6	Actividad antioxidante y antimicrobiana.	56
3.6.1	Actividad antioxidante.	56
3.6.1.1	Método de Folin Denis.	56
3.6.1.2	Método de ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2- picrilhidrazilo (DPPH).	57
3.6.1.3	Método de ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2,- Azino- bis-3- etilbenzotiazolin- 6- sulfónico (ABTS)	58
3.6.2	Actividad antimicrobiana.	58
3.7	Formulación de producto	59
3.7.1	Formulación del gel	59
3.7.2	Control de calidad producto formulado.	60
3.7.2.1	Determinación de pH.	60
3.7.2.2	Determinación de extensibilidad.	60
3.7.2.3	Determinación de Untuosidad.	61
3.7.3	Aceptación de la formulación de gel terapéutico.	61
a.	Criterios de inclusión.	61
b.	Criterios de exclusión.	61
c.	Desarrollo de la encuesta.	62
d.	Criterio de control.	62
3.8	Análisis de resultados	63

CAPITULO 4.....	64
RESULTADOS.....	64
4.1 Identificación botánica.....	64
4.2 Determinación de rendimiento de la extracción de aceite esencial por método arrastre de vapor y fluidos supercríticos	66
4.2.1.1 Determinación de condiciones de operación por método arrastre de vapor.	66
4.2.1.1.1 Balance de materia por método arrastre de vapor.	66
4.2.1.2 Balance de materia por método fluidos supercríticos.....	70
4.2.2 Rendimiento de extracción por método arrastre de vapor.....	71
4.2.3 Rendimiento por fluidos supercríticos	72
4.3 Determinación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales	75
4.3.1 Propiedades organolépticas de los aceites esenciales.	75
4.3.1.1 Determinación de color.....	76
4.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.	77
4.3.2.1 pH.....	77
4.3.2.2 Miscibilidad en etanol.	77
4.3.2.3 Densidad relativa.....	78
4.3.2.4 Índice de acidez.....	79
4.3.2.5 Índice de refracción.	80
4.3.2.6 Poder rotatorio.....	82
4.3.3 Espectroscopia UV – Visible.....	84
4.3.3.1 Espectroscopia UV – Vis en aceites esenciales	84
4.3.3.2 Espectroscopia de UV – Vis en extractos por Fluidos Supercríticos.	87
4.3.4 Cromatografía en capa fina.	91

4.3.4.1	Cromatografía en capa fina de los aceites esenciales obtenido por el método de arrastre de vapor	91
4.3.4.2	Cromatografía en capa fina de aceite esencial obtenido por el método de fluidos supercríticos.	94
4.3.5	Espectroscopia Infrarroja.....	97
4.3.6	Cromatografía de gases acoplada a masas.....	100
4.4	Determinación de actividad antioxidante y antimicrobiana	106
4.4.1	Determinación de actividad antioxidante.	106
4.4.1.1	Determinación por el método de Folin - Denis	106
4.4.1.2	Determinación por el método DPPH.	107
4.4.1.3	Determinación por el método ABTS.....	109
4.4.2	Determinación de actividad antimicrobiana.....	110
4.5	Formulación del producto.....	111
4.5.1	Formulación del gel	111
4.5.2	Control de calidad producto formulado.	114
4.5.2.1	Determinación de pH.	114
4.5.2.2	Determinación de extensibilidad	114
4.5.2.3	Determinación de Untuosidad.....	115
4.5.3	Aceptación de la formulación de gel terapéutico.....	117
4.5.3.1	Resultados de Encuesta de satisfacción con el producto	117
4.5.3.2	Control negativo y positivo del producto	118
4.5.4	Costo de la formulación del producto.....	119
4.5.4.1	Costo de fabricar.	119
4.5.4.1.1	Costo directo de los materiales (CDM).	119
4.5.4.1.2	Costo directo de mano de obra (CDMO)	121
4.5.4.1.3	Costo indirecto de fabricación (CIF).....	121

4.5.4.2 Costo de administrar	124
4.5.4.3 Costo de comercializar	125
4.5.4.4 Costo Total	127
4.5.4.5 Costo Unitario.....	127
CAPITULO 5.....	128
CONCLUSIONES	128
CAPITULO 6.....	130
RECOMENDACIONES	130
CAPITULO 7.....	131
BIBLIOGRAFÍA	131
CAPITULO 8.....	138
ANEXOS.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de problemas	8
Figura 2. Regiones del departamento de La Paz.....	12
Figura 3. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.	20
Figura 4. Diagrama de fases	31
Figura 5. Diagrama básico del proceso de extracción empleando un fluido supercrítico	34
Figura 6. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante.	37
Figura 7. Estructura del ABTS*+ antes y después de la reacción con el antioxidante. ..	39
Figura 8. Flujograma del proceso	43
Figura 9. Etapa de secado de las especies vegetales.	44
Figura 10. Material vegetal herborizado	45
Figura 11. Soluciones patrón.....	46
Figura 12. Indicador de pH	47
Figura 13. Balanza analítica (METTLER TOLEDO).....	49
Figura 14. Índice de acidez	50
Figura 15. Refractómetro ABBE DE BANCADA (QUIMIS ISO 9001)	51
Figura 16. Polarímetro de disco (QUIMIS ISO 9001)	52
Figura 17. Espectrofotómetro UV-Visible (PERSEE)	53
Figura 18. Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (JASCO)	54
Figura 19. Placa cromatográfica.....	55
Figura 20. Espectrómetro GCMS - QP 2020(SHIMADZU)	56

Figura 21. Mapa de ubicación de área de estudio	64
Figura 22. Balance de materia de la obtención de aceite esencial.	67
Figura 23. Balance de materia de obtención de aceite esencial por FSC	70
Figura 24. Rendimiento entre arrastre de vapor y fluidos supercríticos	74
Figura 25. Barrido espectral <i>T. filifolia</i>	84
Figura 26. Barrido espectral <i>T. mandonii</i>	85
Figura 27. Barrido espectral <i>T. terniflora</i>	85
Figura 28. Barrido espectral <i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	86
Figura 29. Barrido espectral de <i>T. filifolia</i> por método FSC	87
Figura 30. Barrido espectral de <i>T. mandonii</i> por método FSC.....	88
Figura 31. Barridos espectrales de <i>T. terniflora</i> por método FSC	89
Figura 32. Barridos espectrales de <i>M. osteomeloides</i> por método FSC	90
Figura 33. Cromatografía en capa fina <i>T. filifolia</i>	91
Figura 34. Cromatografía en capa fina <i>T. mandonii</i>	92
Figura 35. Cromatografía en capa fina <i>T. terniflora</i>	93
Figura 36. Cromatografía en capa fina <i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	93
Figura 37. Cromatografía en capa fina de <i>T. filifolia</i> extraído por FSC.....	94
Figura 38. Cromatografía en capa fina de <i>T. mandonii</i> extraído por FSC.....	95
Figura 39. Cromatografía en capa fina de <i>T. terniflora</i> extraído por FSC	96
Figura 40. Cromatografía en capa fina de <i>M. osteomeloides</i> extraído por FSC.....	97
Figura 41. Espectrograma de IR de aceite esencial	98
Figura 42. Cromatograma de gases	100
Figura 43. Comparación del espectro de alfa pineno con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas	101

Figura 44. Curva de calibración de polifenoles totales.....	106
Figura 45. Determinación de actividad antimicrobiana	110
Figura 46. Formulación de la base para la elaboración de gel.....	112
Figura 47. Gel terapéutico	113
Figura 48. Determinación de pH de gel terapéutico.....	114
Figura 49. Determinación de extensibilidad de gel terapéutico.....	115
Figura 50. Prueba de untuosidad del gel terapéutico	116
Figura 51. Encuesta de aceptación del producto.....	117
Figura 52. Control positivo- negativo del producto.....	118

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 2. Propiedades físicas del CO₂ como solvente crítico.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 3. Principales empresas farmacéuticas de Bolivia.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 4. Ubicación geografica de Provincias.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 5. Identificación botánica y origen de colecta de las especies vegetales del sector valle de departamento de La Paz.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 6. Condiciones de operación.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 7. Rendimiento en aceite esencial de los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 8. Rendimiento con extracción por FSC de T. filifolia.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 9. Rendimiento con extracción por FSC de T. mandonii.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 10. Rendimiento con extracción por FSC de T. terniflora.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 11. Rendimiento con extracción por FSC de M. osteomeloides.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 12. Análisis Organoléptico de los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla 13. Determinación de color de los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 14. pH de aceites esenciales de los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 15. Determinación de miscibilidad en etanol de aceite esencial de los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 16. Determinación de densidad (20°C) de aceite esencial del genero Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 17. Determinación de índice de acidez de aceite esencial en los géneros Tagetes y Myrcianthes.....</i>	<i>79</i>

<i>Tabla 18. Determinación de índice de refracción de aceite esencial de los géneros Tagetes y Myrcianthes</i>	80
<i>Tabla 19. Determinación de actividad óptica de aceite esencial de los géneros Tagetes y Myrcianthes</i>	82
<i>Tabla 20. Resumen de propiedades fisicoquímicas de aceites esenciales de los géneros de Tagetes y Myrtaceae</i>	83
<i>Tabla 21. Identificación de los grupos funcionales en las zonas de grupo</i>	98
<i>Tabla 22. Composición de aceite esencial de T. filifolia</i>	102
<i>Tabla 23. Composición de aceite esencial de T. mandonii</i>	103
<i>Tabla 24. Componentes de aceite esencial de T. terniflora</i>	104
<i>Tabla 25. Componentes de aceite esencial de M. osteomeloides</i>	105
<i>Tabla 26. Concentración de fenoles totales</i>	107
<i>Tabla 27. Determinación % de Inhibición por método DPPH</i>	108
<i>Tabla 28. Determinación de % de Inhibición por el método ABTS</i>	109
<i>Tabla 29. Determinación de actividad antimicrobiana en aceites esenciales del género Tagetes y Myrciantes</i>	110
<i>Tabla 30. Relación porcentual de formulación de base</i>	111
<i>Tabla 31. Formulación de gel terapéutico</i>	113
<i>Tabla 32. Determinación de extensibilidad</i>	114
<i>Tabla 33. Determinación de untuosidad</i>	115
<i>Tabla 34. Costo de materia prima</i>	120
<i>Tabla 35. Costo de envasado</i>	120
<i>Tabla 36. Costo directo de los materiales total</i>	120
<i>Tabla 37. Costo directo de la mano de obra</i>	121

<i>Tabla 38. Costo de material indirecto</i>	<i>121</i>
<i>Tabla 39. Costo de mano de obra indirecta</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 40. Costo de depreciaciones</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 41. Costo de mantenimiento.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabla 42. Costo de transporte de producto final.....</i>	<i>123</i>
<i>Tabla 43. Costos indirectos de fabricación</i>	<i>123</i>
<i>Tabla 44. Costos de fabricación</i>	<i>124</i>
<i>Tabla 45. Costos totales administrativos</i>	<i>125</i>
<i>Tabla 46. Gastos de transporte y viáticos.....</i>	<i>126</i>
<i>Tabla 47. Costo de comercializar</i>	<i>126</i>

RESUMEN

Se realizó la extracción de aceites esenciales, de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes* colectados de las provincias de Larecaja e Inquisivi perteneciente al sector valle del departamento de La Paz. Por referencias consultadas, no existe una línea de investigación en especies aromáticas en el departamento, por lo que se propone generar información y el aprovechamiento de estas especies aplicando métodos alternativos de extracción. Se realizó la extracción por: arrastre de vapor y fluidos supercríticos, posteriormente se procedió al estudio de las propiedades organolépticas, fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas. Al mismo tiempo se determinó los rendimientos entre ambas extracciones y para cada especie, se identificaron las principales moléculas en cada especie por cromatografía de gases acoplada a masas: *T. filifolia*: anetol (92%), estragol (3.5%), *T. mandonii*: di hidrotagetona (48%), limoneno (21%), *T. terniflora*: di hidrotagetona (32%), cis tagetona (8%) y *M. osteomeolides*: eucaliptol (65%), α -pineno (20%).

Se realizó la formulación de un gel analgésico a partir del aceite esencial de *M. osteomeolides* extraído por arrastre de vapor, se ensayó el control de calidad del gel (en el rango), su aceptación en un grupo experimental y se calculó el costo de formulación del gel.

SUMMARY

The extraction of essential oils of the *Tagetes* and *Myrcianthes* genera collected from the provinces of Larecaja and Inquisivi belonging to the valley sector of the department of La Paz was carried out. By references consulted, there is no line of research on aromatic species in the department, so it is proposed to generate information and the use of these species applying alternative extraction methods. The extraction was carried out by: steam drag and supercritical fluids, afterwards the organoleptic, physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties were studied. At the same time the yields between both extractions were determined and for each species, the main molecules in each species were identified by gas chromatography coupled to masses: *T. filifolia*: anethole (92%), estragole (3.5%), *T. mandonii*: dihydrotagetone (48%), limonene (21%), *T. terniflora*: dihydrotagetone (32%), cis tagetone (8%) and *M. osteomeolides*: eucalyptol (65%), α -pinene (20%).

The formulation of an analgesic gel was made from the essential oil of *M. osteomeolides* extracted by steam entrainment, the quality control of the gel was tested (in the range), its acceptance in an experimental group and the cost of formulation was calculated of the gel.

CAPITULO 1

GENERALIDADES

1.1 Introducción

El departamento de La Paz cuenta con 20 provincias distribuidas en altiplano, valles y trópico. En vista de la diversidad que puede encontrarse en estas zonas, se ha evidenciado la existencia de flora y fauna típicas. Estos recursos se fueron adaptando a lo largo de la historia natural, dando lugar a especies, variedades y eco tipos. En referencia a las especies vegetales, éstas pueden mostrar similar aspecto físico, sin embargo, pueden haber especializado su quimio-tipo. Los resultados de estas adaptaciones a diferentes pisos ecológicos donde los habitantes aprendieron a conocerlas, reconocerlas y usarlas atribuyéndoles propiedades específicas.

Los valles interandinos de La Paz comprenden regiones que abarcan una franja amplia de micro eco regiones diversas, respecto a los niveles topográficos, climáticos y edáficos, hasta una variabilidad en la flora y fauna. En estas regiones muchas de las especies medicinales nativas se han desarrollado sin mayores obstáculos.

En la actualidad, no es tan fácil como antes recolectar hierbas en estado silvestre, especialmente para las personas que dependen de ellas. Los sitios naturales han sido eliminados en gran escala para poder establecer campos de cultivo, eliminándose al mismo tiempo la sombra, el drenaje y el microclima del hábitat natural de las especies. Posiblemente muchas de estas plantas se han visto amenazadas por esta razón, especialmente aquellas variedades de tolerancia limitada a los factores adversos.

Los valles interandinos de La Paz, podría ser el principal abastecedor de especies medicinales en estado silvestre y especialmente de especies cultivadas, aprovechando las condiciones climáticas favorables de la zona. Desde esta perspectiva, se deben realizar más estudios al respecto para lograr un cultivo adecuado de las plantas aromáticas y medicinales. Las plantas aromáticas contienen cantidades apreciables de fitoquímicos (fenoles, sus derivados y otros), que se encuentran en toda la planta o partes de ella. (Bareño, 2006)

El presente trabajo, en el marco del proyecto IDH "Aprovechamiento Sustentable de Aceites Esenciales La Paz" propone formular un producto a partir de especies aromáticas de los valles interandinos del departamento de La Paz.

1.2 Antecedentes

Riva.P.J. (2006). Indicó las características ecológicas y culturales de los Andes de Bolivia con alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales identificadas y verificadas en los herbarios del país; sin embargo, las investigaciones no han abarcado la totalidad de las etnias, la cultura Kallawayá aparece como el líder, pues ha contribuido al conocimiento del uso y manejo de plantas medicinales de la región y con importantes aportes para la humanidad. Actualmente, la ciencia médica refuerza el conocimiento tradicional respecto a las bondades de las plantas, logrando identificar sustancias químicas con propiedades terapéuticas, por ejemplo antimaláricas y leishmanicidas. Es así, que estos recursos genéticos representan oportunidades para impulsar el desarrollo económico, enmarcado dentro la sostenibilidad y equidad social. Estos recursos

genéticos necesitan ser conservados junto al conocimiento tradicional que se tiene sobre ellos con continuas investigaciones.

Uñatatawi (2003). Presentó un resumen de un selecto e importante grupo de especies aromáticas y medicinales, recolectadas e introducidas, actualmente cultivadas por un grupo de agricultores en la zona de Caranavi de los Yungas de La Paz; describió las características agroclimáticas y ecológicas, características generales de las especies introducidas y recolectadas de la zona, junto con el nombre científico y otros nombres comunes, valor de uso medicinal y el uso culinario de estas especies aromáticas. Finalmente realizó un análisis sobre las amenazas a la biodiversidad y oportunidades para la producción de plantas medicinales.

Torrez Mamani (2012). Realizó la caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales de ajeno, Muña y Khoa a escala laboratorio. El aceite esencial extraído de Khoa a escala piloto en la Carrera de Química Industrial (capacidad instalada, 100 litros) fue probado en su actividad biocida sobre pulgones en laboratorio. Los resultados han mostrado que en las zonas de colección (Ambana y Sorata) coexisten varias especies de Lamiaceas, el rendimiento en aceite esencial de *M. Andina* fue 1,2 %, *C. bolivianum* 2,4% y *A. absinthium* 0,85%. La actividad biocida del aceite esencial de *C. bolivianum* a diferentes dosificaciones y tiempos de evaluación sobre pulgones (*Mizus persicae*), ha mostrado hasta las 8 horas una CL50% 1ml/5,8 L. Con respecto a la evaluación económica el precio de venta debe ser 40 Bs/10 ml de aceite crudo.

Cumara Quispe & Choquehuanca Laura (2015). Realizaron el estudio de las propiedades de aceites esenciales de los géneros *Minthostachys* y *Clinopodium* colectados en dos épocas seca y húmeda de siete provincias del departamento de La

Paz, analizaron sus propiedades fisicoquímicas y capacidad biocida sobre áfidos. Los resultados de los aceites esenciales de los géneros *Minthostachys* y *Clinopodium* (*C. axiliare*, *C. vanun*, *C. bolivianum*, *C. pallidum*, *M. andina*, *M. ovata*, *M. acutifolia*, *M. latifolia* y *M. setosa*) fueron similares en sus propiedades organolépticas y color.

Se identificó por cromatografía de gases a la pulegona, menthona y limoneno como componentes mayoritarios en tres especies (*M. ovata*, *M. acutifolia* y *C. pallidum*).

Serrato Cruz Miguel Angel (2015). Realizaron la extracción por el proceso de hidrodestilación a nivel piloto, el rendimiento de aceites esencial y la composición de metabolitos secundarios a partir de cuatro especies aromáticas de *Tagetes*, recurso natural de México, siendo estas: *T. coronopifolia*, *T. filifolia*, *T. lacera* y *T. terniflora*. Su contenido químico se determinó por GC/MS (Cromatografía de gases/ Espectrometría de masas). Los rendimientos registrados de aceite fueron como sigue: *T. coronopifolia* 26 L Ha⁻¹, *T. filifolia* 45 L Ha⁻¹, *T. lacera* 45 L Ha⁻¹ y *T. terniflora* 75 L Ha⁻¹. Los compuestos mayoritarios de *T. filifolia* fueron fenilpropanoides como anetol, mientras que en las demás especies la mayoría de los compuestos pertenecieron al grupo de monoterpenos como crisantenona, dihidrotagetona, ocimeno, tagetona, tagetenona, tujeno, verbenona.

Serrato Cruz & Reyes Trejo (2003). Realizaron la extracción de aceite esencial de *Tagetes filifolia* y bioensayos en invernadero y campo para controlar la mosquita blanca. A partir de plantas crecidas en Chapingo, México (2230 msnm) en el periodo agosto, noviembre del 2002, se extrajo aceite esencial en tres etapas fenológicas resultando la de floración completa como la mejor (1.68 mL/ 100 g peso fresco) y se identificaron dos compuestos químicos. De siete concentraciones (0.01 a 3.5 mg/mL) de aceite esencial ensayadas en seis intervalos de tiempo contra moscas adultas de *Trialeurodes*

vaporariorum en invernadero, mediante el método de Ortega-Schuster, se encontraron respuestas de repelencia, mortalidad y fitotoxicidad.

Maestri, Zygado, Grosso, Aburra, & Guzman C. (1991). Analizaron el contenido y la composición del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. (Compositae) de seis poblaciones silvestres de Argentina. No se encontraron variaciones significativas en la composición cuantitativa de los terpenos mayoritarios de las diferentes poblaciones. Los principales compuestos fueron anetol (68,1%) y estragol (29,5%). El rendimiento de aceite esencial presentó variaciones en los distintos ambientes.

Muñoz, Kouznetsov V., & Stashenko (2009). Determinaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) la composición química de aceites esenciales (AE), aislados por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), de las especies vegetales aromáticas: *Artemisia dracunculus*, *Foeniculum vulgare*, *Illicium verum*, *Lippia micromera*, *Lippia origanoides*, *Ocimum spp.*, *Plectranthus amboinicus*, *Tagetes filifolia*, *Tagetes lucida* y *Thymus vulgaris*. Los valores de capacidades antioxidantes in vitro de estos aceites esenciales, se obtuvieron usando los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS. El potencial inhibitorio de ABTS fue más alto para los aceites esenciales que contienen fenoles (carvacrol y timol), que para los aceites esenciales ricos en éteres (trans-anetol y estragol).

Serrato, Diaz & Barajas (2008). Evaluaron la composición del aceite esencial de 78 recolectas de *T. filifolia* de la región centro-sur de México, establecidas en Chapingo. Cuando las plantas presentan floración se hizo la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor. La composición química del aceite se determinó con cromatografía de

gases acoplada a masas. Los compuestos principales del aceite fueron: 4-alilanol (5%) y anetol (7.7%).

Senatore & De Feo (1999). El aceite esencial de las partes aéreas de *Tagetes mandonii* Sch. Bip (Asteraceae) fue obtenida por hidrodestilación. El contenido de aceite fue de 0,43% en peso seco. La composición del aceite fue analizada por GC-MS. Se identificaron 62 de los 71 compuestos detectados, que representan el 96.8% del aceite, cis- (11.8%).trans-ocimeno (15.2%) fueron los componentes principales, con cantidades apreciables de ocimenones (12.9%), tagetones (12,5%), limoneno (7,9%) y, en la fracción sesquiterpénica, espatulenol (6,9%). Cis anetol (9.2%) es el principal constituyente del grupo fenilpropanoide (12,7%).

Pauro R., Gonzales M., Gamarra C., Pauro R., & Mamani M.(2011). Este trabajo de investigación fue desarrollado durante noviembre y diciembre de 2004 y entre enero y marzo de 2005, en las comunidades de Muñani (Región natural Suni) y Suatía (Región natural Puna) de la provincia de Lampa, región Puno. El objetivo fue determinar las especies vegetales y el uso alimenticio, medicinal y biocida en ambas comunidades. Se encontró 15 especies alimenticias, 56 medicinales y 6 biocidas para la comunidad de Suatía; en Muñani son 4 especies alimenticias y 25 medicinales. Entre las especies alimenticias y medicinales se encuentra *Tagetes mandonii* Sch. Bip. "chijchipa", para dolores estomacales y como condimento.

Lopez (2001). Investigó la composición del aceite de dos especies que crecen en Bolivia: *M. osteomeloides* (arrayancito) (sin. *Myrtus osteomeloides* Rusby), que es un arbusto o árbol pequeño que crece hasta 3 m de altura, y *M. pseudomato* (sawinto), que Es un árbol que puede alcanzar los 10 m de altura. Por lo que sabe, es la primera vez

que se informa sobre la composición del aceite de estas dos especies de *Myrcianthes* de Bolivia. La composición química de los aceites esenciales de *Myrcianthes osteomeloides* y *M. pseudomato* se determinaron mediante GC y GC / MS. El aceite de *Myrcianthes osteomeloides* contiene 1,8-cineol (55,7%) como componente principal, seguido de α -pineno (17,9%), α -terpineol (8,5%) y β -pineno (4,6%). Se identificaron 1,8-cineol (24,4%), α -pineno (17,1%), linalool (11,7%), limoneno (8,5%) y ter-terpineno (7,3%) como componentes principales en el aceite de *M. pseudomato*.

1.3 Planteamiento del problema

Las especies aromáticas de los valles mesotérmicos del departamento de La Paz no cuentan con información sistematizada, propuestas de transformación y aprovechamiento sustentable. Si bien se han realizado varios estudios con plantas medicinales en diferentes áreas, no se han dirigido esfuerzos sobre plantas aromáticas específicamente. La medicina tradicional aún conserva información sobre su práctica, han demostrado que su uso con conocimiento es curativo. Sin embargo, debe sistematizarse y queda mucho camino por recorrer para legitimizarla. Por lo tanto, es importante contar con información y generación de propuestas para el aprovechamiento sustentable de especies aromáticas de los valles interandinos de La Paz.

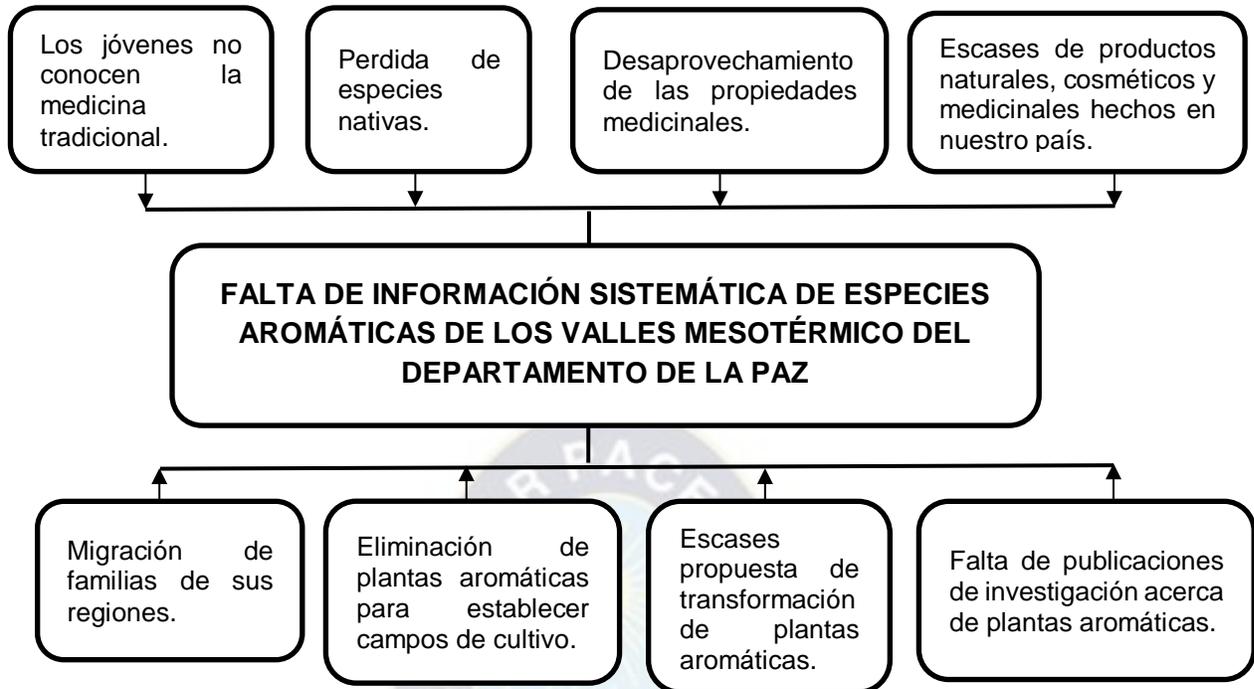


Figura 1. Árbol de problemas

1.4 Justificación

El presente trabajo aporta con información valiosa de las características de los aceites esenciales por método de extracción, especies aromáticas y propuesta de aprovechamiento de plantas silvestres no muy conocidas y que se desarrollan naturalmente en el sector valle del departamento de La Paz. Estos resultados servirán de base para plantear posibles alternativas de su explotación en los mismos lugares de origen y su posible transformación en producto natural e invitaran a la ampliación de esta línea de trabajo.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general.

- Proponer un producto terapéutico a partir del análisis de los aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor y fluido supercríticos de *T. filifolia*, *T. mandonii*, *T. terniflora* y *Myrcianthes osteomeloides* (Rusby) de los valles interandinos del norte de La Paz.

1.5.2 Objetivos específicos.

- Determinar el rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor y fluidos supercríticos y por especie aromática.
- Determinar las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales extraídos por los dos métodos y por especie aromática.
- Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos aromáticos por especie.
- Elaborar una formulación terapéutica a partir del aceite esencial *Myrcianthes osteomeloides*, extraído por arrastre de vapor como ensayo.
- Determinar el costo de producción de la formulación.

1.6 Alcance

El trabajo inicia con la recolección de especies aromáticas del sector valle mesotermico del departamento de La Paz, recorriendo las provincias de: Larecaja e Inquisivi.

La recolección de las especies aromáticas se realizará desde diciembre 2017 hasta julio del 2018. La extracción se realizará aplicando dos métodos: arrastre de vapor y fluidos supercríticos. Tomando en cuenta las propiedades medicinales de los cuatro aceites esenciales obtenidos, se escogerá un aceite esencial y se ensayará la formulación de un producto terapéutico.



CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Pisos ecológicos del departamento de La Paz

El Departamento de La Paz presenta a lo largo de su extensión territorial y de acuerdo a sus características fisiográficas, los siguientes pisos ecológicos: Cordillera Occidental; Nevados; Altiplano; Cordillera Oriental; Sub andino; Llanura Chaco Beniense, con paisajes que se extienden desde las llanuras del altiplano (4.200 m.s.n.m.) pasando por los valles cerrados y encajonados, los Yungas (3.800 a 2.500 m.s.n.m.) descendiendo hasta las sabanas de la Amazonía (200 m.s.n.m.).

Las serranías, montañas, y pie de montes predominan en la conformación de las eco-regiones, los nevados y los cuerpos de agua constituyen un importante recurso natural del departamento por la superficie que ocupan y el aporte que brindan a las cuencas nacionales e internacionales. En las partes altas de las cordilleras Oriental, Occidental y el altiplano se presentan limitaciones por bajas temperaturas (menores a 9 °C) y escasa humedad ambiente, con excepción de las zonas circundantes al Lago Titicaca, donde la influencia térmica del espejo de agua mejora las condiciones de humedad y temperatura. Los valles presentan temperaturas templadas, pero con cambios muy variables debido a la influencia térmica de la cordillera. En la zona de los yungas las temperaturas fluctúan entre 11 a 15 °C y una humedad ambiente elevada. La zona amazónica presenta temperaturas que varían de 20 a 25 °C y humedad ambiente cercana a la saturación.

El uso actual y potencial de los suelos establecidos en los estudios de zonificación agroecológica, nos muestra las potencialidades productivas del Departamento de La Paz, caracterizados por las regiones agroecológicas (SEDEM, 2012).



Figura 2. Regiones del departamento de La Paz

Fuente: Instituto Departamental de Estadística del Gobierno Autónomo Departamental de La Paz (2012)

2.2 Plantas aromáticas

El empleo de plantas como tratamiento de diversos males, se registra desde tiempos muy remotos, basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales, transmitidos de generación en generación. Hoy en día muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente en base a la extracción de sus principios activos, con diversas actividades biológicas (Días, 2005).

Las características ecológicas y culturales de los Andes de Bolivia ofrecen variedad de prácticas respecto a la medicina tradicional, cuyos protagonistas son las plantas medicinales. Se conocen alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales identificadas y verificadas en los herbarios del país; sin embargo, las investigaciones no han abarcado la totalidad de las etnias, quienes son los que poseen este conocimiento.

El conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales contiene elementos esenciales, tales como: sistemas empíricos de clasificación, reconocimiento de hábitat de cada una de las especies y técnicas tradicionales de cosecha, almacenamiento, preparación y suministro de estas plantas a la población. Actualmente, la ciencia médica refuerza el conocimiento tradicional respecto a las bondades de las plantas, logrando identificar sustancias químicas con propiedades terapéuticas, antimaláricas, etc. (Moraes, Ollgaard, & Kvist, 2006).

2.3 Aspectos generales de las especies vegetales a estudiar

2.3.1 Descripción del anís de monte (*Tagetes filifolia*).

Hierba anual muy aromática de 10 a 50 cm de altura. Sus hojas semejan listones porque están muy divididas. Las flores están agrupadas en cabezuelas, son amarillas y se encuentran encerradas en unos tubos en las puntas de las ramas, a veces la cabezuela presenta una o dos flores con lengüeta blanca. El fruto es seco y las semillas peludas.

El anís de monte es originaria de México y Centroamérica, habita en climas cálido, semicálido y templado, entre los 300 y hasta los 2000 msnm., crece a las orillas de

caminos, está asociada a bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino (Moyron, 2009).

2.3.1.1 Composición del aceite esencial de anís de monte.

Esta planta contiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos citral, citrol, limoneno y tagetona; los sesquiterpenos beta-cariofileno, cedreno y alfa-humuleno; y los lignanos transanetol, estragol y el éter metílico de eugenol. (Moyron, 2009).

2.3.1.2 Propiedades y aprovechamiento del anís de monte.

Esta especie alivia problemas estomacales, diurético, carminativo, cólicos (dolor de estómago), alivia males intestinales, digestivo, antihemorrágico, antiinflamatorio, diurético. Las partes aéreas se usan como saborizante alimenticio, y la infusión de sus partes aéreas como diurético, antiespasmódico, antiinflamatorio, antihemorrágico.

La infusión, es muy utilizada para el dolor de estómago, cólicos y empacho, se reposan las ramas y se toma el mate hasta sentir mejoría. También es muy usado en la sierra peruana para tratar la diarrea producida por frío, en ventosidad (mal del viento) y para el mal aliento mastican las hojas en ayunas (Serrano, 2009).

2.3.2 Descripción de huacataya (*Tagetes terniflora* H.B.K).

Hierba anual, de hasta 1,50 m de alto. Tallos erectos, ramificados, glabros y hojosos. Hojas opuestas, las superiores alternas, pecioladas; lámina de 3-7,5 cm de longitud y 2,5-7 cm de ancho, elíptica, pinnatisecta, con raquis linear y tres a seis pares de foliolos de 1-4,5 cm de longitud y 2-9 mm de anchura, lanceolados, con márgenes aserrados y glándulas oleíferas. Inflorescencia terminal en cimas corimbiformes. Capítulos numerosos, radiados, pedunculados, dimorfos, la mayoría gruesos y plurífloros, acompañados por algunos delgados y unifloros.

Tagetes terniflora H.B.K. es propia de los Andes, se encuentra distribuida desde Venezuela hasta el noroeste de Argentina. En Colombia ha sido herborizada en Antioquia, Cundinamarca, Nariño, Norte de Santander y Valle del Cauca, en altitudes comprendidas entre 2200 y 2600 metros (García H., 1955).

2.3.2.1 Composición del aceite esencial de huacataya.

Los componentes principales del aceite esencial de *Tagetes terniflora* H.B.K. son del tipo monoterpenos acíclicos triplemente insaturados: cis y trans-tagetenona, cis y transocimeno y dihidrotagetenona. Hay poca variación de algunos como la trans-tagetona y la dihidrotagetona a medida que se desarrolla la planta, salvo en los aceites esenciales de viscosidad elevada donde la dihidrotagetona aumenta del 3 % al 20 %. Cuando se inicia la fructificación aumenta el contenido de cis-ocimeno que llega a 29-31 % (Saavedra, Cosme Villa, Viturro, & Molina, 2002).

2.3.2.2 Propiedades de la huacataya.

Los indígenas precolombinos de México y Sudamérica creían que esta especie, de aroma característico, tenía propiedades mágicas y salvaba vidas. Las especies cultivadas, al igual que ciertas especies silvestres, eran empleadas tanto en ceremonias religiosas como en medicina, usándose también con fines afrodisíacos y como leña. Muchos indígenas aún las utilizan, en forma similar a sus ancestros, como analgésicos, antisépticos, carminativos, diuréticos, estimulantes, vermífugos, plaguicidas y expelentes (García H., 1955).

2.3.3 Descripción de anu chijchipa (*Tagetes mandonii* Sch. Bip.)

Planta herbácea que tiene una altura promedio de 25 a 80 cm, el tallo es ramificado y espeso, las hojas son pinnadas, brillantes y de color verde oscuro; las flores son simples amarillas, se caracteriza por la presencia de notables glándulas negras que contienen cantidades abundantes de constituyentes volátiles. Siendo una hierba ornamental; muy extendida en la sierra peruana conocido como "chick chimpa", "chincho" y en Bolivia como "anu chijchipa" (Senatore & De Feo, 1999).

2.3.3.1 Composición del aceite esencial de anu chijchipa.

El aceite esencial de anu chichipa se caracteriza por tener alto contenido de monoterpenos (73,1%), de los cuales 36,6%. Está representado por hidrocarburos monoterpénicos, cis-b- ocimeno (11.8%) y trans-b-ocimeno (15.2%) son los principales componentes de esta fracción y los más abundantes constituyentes del aceite. También

se presenta una cantidad de limoneno (7,9%), cetonas (32,5%), cis- y trans-tagetona, cis- y trans- ocimenones (tagetenonas). El resto del aceite tiene componentes como fenilpropanoides (12.7%) y sesquiterpenos (10.9%) (Senatore & De Feo, 1999).

2.3.3.2 Propiedades y usos de anu chijchipa.

En la medicina popular usan la anu chijchipa como digestivo, antiespasmódico y en el tratamiento de las vías respiratorias, además, las hojas también se utilizan como condimento en los alimentos. Algunas especies de Tagetes ha sido ampliamente estudiado la composición de sus metabolitos secundarios, particularmente los aceites esenciales, para actividades biológicas (Pauro R., Gonzales M., Gamarra C., Pauro R., & Mamani M., 2011).

2.3.4 Descripción de arrayan (*Myrcianthes osteomeloides* (Rusby) Mc Vaugh

Myrcianthes osteomeloides es un pequeño género perteneciente a la familia Myrtaceae, que incluye alrededor de 100 géneros y 3.000 especies que crecen en las regiones templadas, tropicales y subtropicales. *M. osteomeloides* es un arbusto o árbol pequeño de hoja perenne que crece hasta una altura de aproximadamente 3-4 m. El mirto común tiene un tallo erguido de 4 m de altura, sus ramas forman una cabeza llena cerrada, densamente cubierta por hojas perennes. El tallo de la planta es ramificado y las hojas verde oscuro dispuestas de forma opuestas son ovadas lanceoladas, 2-5 cm de largo,

puntual-glandular y enteras. Cuando son aplastadas, tienen un delicado olor aromático; glándulas ausentes en la lámina (Davis, 1982).

2.3.4.1 Composición de aceite esencial de arrayan

En la composición del aceite esencial de *Myrtus osteomeloides* se encuentra al cineol como producto principal (55.7%), también contiene altos porcentajes de pineno (17.9%), en menor porcentaje: terpineol (8.5%) y limoneno (4.1%). Un mayor número de sesquiterpenos están presentes en el aceite (Lopez Arce, 2001).

2.3.4.2 Propiedades y usos del arrayan

El arrayán, por su composición y propiedades, es similar al eucalipto, pues ambas especies pertenecen a la misma familia botánica, Myrtaceae. Se utiliza popularmente para infecciones pulmonares y bronquiales, urinarias (cistitis) e intestinales (diarreas, disenterías). También contiene taninos que le confieren un carácter astringente.

Además, las bayas se utilizan como antiséptico, astringente, carminativo, analgésico, tónico para el cabello, hemostático, antiemético, cardiotónico, diurético, anti-inflamatorio, tónico para el cerebro, nefroprotector, antidiabético. Diversas acciones farmacológicas de las hojas son astringente, antiséptico, hipoglucemiante, laxante, analgésico, tónico y estimulante del cabello. Se ha reportado propiedades antibacterianas de la raíz (Gonzales Bocangel, Mancilla Tafur, Rengifo Urbietta, & Arévalo Ortiz, 2007).

2.4 Metabolitos secundarios

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales). Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. (Avalos Garcia & Perez Urria, 2009).

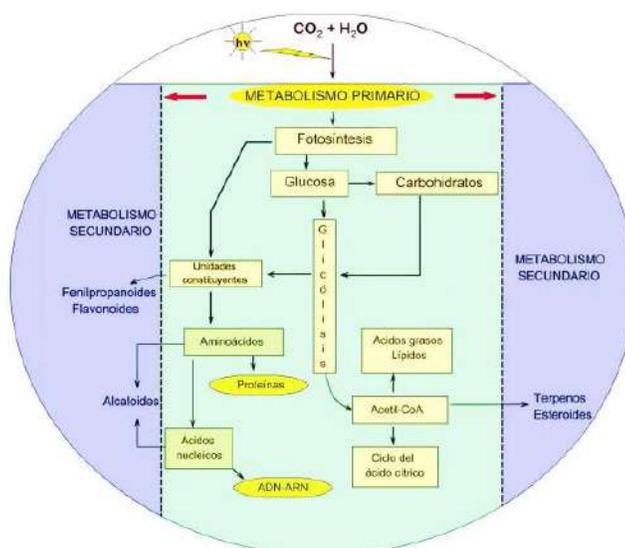


Figura 3. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.

Fuente: Fisiología vegetal, 2009

2.5 Aceites esenciales

Son llamados así los constituyentes odoríferos o esencias de una planta. El término aceite, probablemente, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida, el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua.

Pueden estar ubicados en las diferentes partes de la planta, por ejemplo: en las coníferas esta en todo el tejido; en la rosa solo el pétalo, en el comino en las semillas, en el clavo de olor en el brote o yema, en la lima en los frutos, en la menta en los pelos glandulares de las ramas y hojas. Algunas plantas tienen un aceite esencial que difiere de la composición a través de la planta, canela es un ejemplo, el aceite esencial obtenido de las hojas contiene principalmente eugenol, de la corteza principalmente cinamaldehído y de la raíz el canfor.

Los aceites esenciales químicamente están formados por la mayoría de los monoterpenos y algunos sesquiterpenos y compuestos aromáticos.

Los monoterpenos y los sesquiterpenos son biosintetizados a partir de los pirofosfatos de geranilo y de farnesilo respectivamente; las reacciones de ciclación, oxidación y otras, pueden originar las diferentes estructuras.

Las aplicaciones de los aceites esenciales son muy variadas: son ampliamente utilizados en perfumería, como saborizantes de alimentos, y en la medicina. Ejemplo: los aceites esenciales de anís, menta y canela son carminativos y saporíferas; el de clavo de olor es un analgésico dental y se utiliza además en la producción comercial de vainillina; el de pino es desinfectante y desodorante; el de eucalipto es expectorante; los de valeriana y lavanda tienen efectos sedativos. Cada uno de los componentes aislados puede también tener una aplicación como el citronelal que es repelente de los mosquitos, el mentol como calmante de dolor de muela y de garganta y como anestésico y antiespasmódico; el citral que tiene una acción antihistamínica y es analgésica en oftalmología; el 1,8- cineol es expectorante y antiséptico, etc. (Lock de Ugaz, 1988)

2.5.1 Clasificación de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

2.5.2 Clasificación por su consistencia.

- Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

- Los bálsamos son de consistencia más espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

2.5.3 Clasificación por su origen.

- Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos.
- Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.
- Los sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

2.5.4 Clasificación por su naturaleza.

Según la estructura química de los componentes mayoritarios que determinan el olor particular de los aceites, estos se dividen en tres grupos principales:

- Monoterpenoides (linalool, nerol, 1-8 cineol, geraniol).
- Sesquiterpenoides (nerolidol).
- Compuestos oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas) (Rodriguez, Alcaraz, & Real C., 2012).

2.5.5 Características químicas de los aceites esenciales.

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

- i. **No terpenoides.** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.
- ii. **Terpenoides.** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos.

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- Alcoholes (mentol) y fenoles (timol)
- Aldehídos (geranial, citral) y cetonas (alcanfor)
- Ésteres (acetato de bornilo, acetato de linalilo, salicilato de metilo)
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, α y β pineno) (Gutierrez M. , 1996)

2.6 Historia del interés del aceite esencial

El uso de los aromas y los aceites vegetales data de por lo menos 3500 años antes de Cristo y fueron utilizados como elementos curativos, cicatrizantes y en distintos rituales. Por ejemplo, era muy común que antes de una contienda los guerreros limpiaran y

protegieran sus cuerpos utilizando ramas de albahaca, con el fin de alejar los malos espíritus que creían que depositaban sus contrincantes en ellos.

Podemos considerar a los egipcios como los descubridores de la aromaterapia, pues según Jean Valnet, utilizaron una forma primitiva de destilación para extraer los aceites esenciales de las plantas, calentándolos en ollas de arcilla cuya boca era recubierta con filtros de lino; al subir, el vapor traía consigo los aceites esenciales y éstos quedaban impregnados en el filtro, el cual era estrujado para obtener el aceite esencial que era utilizado en medicina y para todo tipo de rito religioso. Registros arqueológicos documentan haber encontrado ollas de destilación que se remontan a 3500 años a.C.

Otra historia significativa en el desarrollo de los aceites esenciales es la de D. Gary Young, quien comenzó en 1989 lo que se convertiría en "Young Living Essential Oils", cuando compró una plantación de un cuarto de acre en Spokane, Washington (EE.UU.). En esta pequeña parcela se embotelló el primer lote de aceites esenciales destilados por arrastre de vapor. Desde entonces, Young Living ha crecido hasta sumar plantaciones en tres continentes, más de 400 productos y clientes en más de 100 países.

En 1989 *Young Living* se inició con la plantación de salvia, salvia sclarea, lavanda, bergamota, estragón y manzanilla alemana. Hacia el final de esa temporada construyó su primera destiladora, con dos ollas de presión unidas por soldadura mediante un tubo de cobre.

Las pruebas realizadas a los aceites corroboraron que eran de la más alta calidad, con lo que Gary comprobó que con las plantas apropiadas y la correcta técnica de destilación, podría producir aceites esenciales de alta calidad (Cameroni, 2012).

2.7 Métodos de extracción

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear y estabilidad del aceite esencial que se pretenda obtener, se emplean diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación será lo que determine la calidad del producto final. Sin embargo, en materia de rendimiento es importante establecer que ninguna cantidad de mejoras en los aspectos tecnológicos compensará la mala calidad del material vegetal. Dependiendo de las variables anteriores, se tienen diversas técnicas de extracción, como se muestran en la tabla: (SENA, 2005)

Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales

Tipo de método	Procedimiento	Productos obtenidos
Métodos directos	Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	Exudación	Gomas, resinas, bálsamos
Destilación	Directa	Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua	
	Destilación- maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)	
Extracción con solventes	Solventes volátiles	Infusiones y resinoides alcohólicos
	Solventes fijos (grasas y aceites)	Concretos y absolutos Absolutos de pomadas
	Extracción con fluidos en estado supercrítico	Absolutos de enflorados

Fuente: SENA (2005)

2.7.1 Métodos directos.

Los métodos directos se aplican principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta, y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas celdas del epicarpio. Al exprimir la corteza tales celdas se rompen y liberan el aceite, el cual se recoge inmediatamente para evitar que sea absorbido por la corteza esponjosa que resulta después de este tipo de procesos.

Los fenómenos que ocurren durante la extracción del aceite se clasifican en varias etapas:

- Laceración de la epidermis y de las celdas que contienen la esencia.
- Generación en la cáscara de áreas con presión mayor que sus circundantes a través de las cuales el aceite fluye al exterior.
- Abrasión de la cáscara, con la formación de pequeñas partículas de la raspadura.

(SENA, 2005)

2.7.2 Destilación.

Consiste en separar por calentamiento, en alambiques u otros vasos, sustancias volátiles que se llaman esencias, relativamente inmiscibles con el agua, de otras más fijas, enfriando luego su vapor para reducir las nuevamente a líquido. La mayor parte de los aceites esenciales son una mezcla de compuestos volátiles, que cumplen la ley de Raoult, lo que representa que a una temperatura dada, la presión total del vapor ejercida por el aceite esencial, será la suma de las presiones del vapor de sus componentes

individuales, por lo que durante el proceso de la destilación de vapor, la vaporización del aceite ocurre a una temperatura menor que la del punto de ebullición del agua. En general los componentes del equipo de destilación para extraer aceite esencial son: fuente de energía, destilador, intercambiador de calor y decantador.

Fuente de energía: Se deben considerar dos tipos básicos de fuente de energía en la destilación de los aceites esenciales comerciales: En primer lugar la combustión de la madera, la cual una vez iniciada, se mantiene con el material vegetal desgastado de una destilación anterior, y por otro lado, el vapor generado en una caldera.

Destilador: Es el recipiente donde se carga el material vegetal que se destila, también se le llama extractor o alambique, generalmente es de forma cilíndrica y se instala verticalmente. Su capacidad depende de la escala de operación.

Intercambiador de calor: También se le conoce como condensador, su función involucra la remoción de calor para transformar al estado líquido la mezcla de vapor de agua y aceite esencial que emerge del destilador. Los dos diseños más populares son el de tipo serpentín y el de tipo coraza y tubo o tipo tubular.

Decantador: Popularmente se le conoce como separador del aceite o vaso florentino, su función consiste en separar la mezcla de agua y aceite esencial proveniente del intercambiador de calor. Si el aceite esencial es más ligero que el agua se ubicará en la capa superior o en la capa inferior, sí es más pesado. (Cerpa Chavez, 2007)

2.7.2.1 Destilación por arrastre con vapor de agua.

Es el proceso más común para extraer aceites esenciales, más no es aplicable a flores ni a materiales que se apelmazan. En esta técnica se aprovecha la propiedad que tienen

las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite. La extracción se efectúa cuando el vapor de agua entra en contacto con el material vegetal y libera la esencia, para luego ser condensada. Con el fin de asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar el material según su consistencia.

Descripción del proceso: El vapor de agua se inyecta desde una caldera externa por medio de tubos difusores, ubicados en la parte inferior de la masa vegetal que se coloca sobre una parrilla interior de un tanque extractor. El vapor de agua provoca que los aceites esenciales se difundan desde las membranas de la célula hacia fuera. Los vapores de agua y aceite esencial que salen, se enfrían hasta regresar a la fase líquida, y se separan en un decantador.

Ventajas: Energéticamente es más eficiente, se tiene un mayor control de la velocidad de destilación, existe la posibilidad de variar la presión del vapor, y el método satisface mejor las operaciones comerciales a escala, al proveer resultados más constantes y reproducibles.

Desventaja: Pueden ocurrir procesos colaterales como polimerización de los terpenos; así como hidrólisis de ésteres y destrucción térmica de algunos componentes. (Gonzalez Villa, 2004)

2.7.2.2 Destilación con agua o hidrodestilación.

Consiste en poner a hervir agua, bien sea por fuego directo, camisa de vapor o camisa de aceite, en la cual se ha sumergido previamente el material vegetal, preferiblemente en

polvo, con el objeto de que el vapor de agua ejerza su acción en el mayor número posible de partículas vegetales.

Similar al arrastre con vapor, el vapor producido arrastra los aceites esenciales hasta otro recipiente donde se condensan y se separan. Éste sistema de extracción tiene el inconveniente de que la temperatura que se emplea provoca que algunos compuestos presentes en las plantas se degraden y se pierdan. El material vegetal aromático siempre debe encontrarse en contacto con el agua, para así evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del mismo. Debe mantenerse en constante agitación para evitar que se aglomere o sedimente al adherirse a las paredes del recipiente, lo cual puede provocar también su degradación térmica. Dado que generalmente no es posible colocar suficiente agua para sostener todo el ciclo de destilación, se han diseñado equipos que presentan un tubo de cohobación lateral que permite el retorno de agua hacia el recipiente de destilación. (Cerpa Chavez, 2007)

2.7.3 Extracción con solventes.

2.7.3.1 Maceración en grasa.

Es un método de extracción con grasa caliente basado en sumergir los pétalos de flores en la grasa, y luego extraer las esencias con alcohol. Este método se ha reemplazado por completo por la extracción con disolventes orgánicos. (Carrion Jara & Garcia Gomez, 2010)

2.7.3.2 Extracción con solventes volátiles

Se basa en la facilidad de los disolventes orgánicos para penetrar en el material vegetal y disolver sus aceites volátiles, debido a las diferencias de punto de ebullición entre el aceite esencial y el solvente. Tiene la ventaja de trabajar a temperaturas bajas, por lo que no provoca la termo destrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad. Se utiliza a escala de laboratorio pues a escala industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias (algunas veces tóxicas). La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos, que se pueden separar por destilación controlada (SENA, 2005).

2.7.3.3 Extracción por fluidos supercríticos

2.7.3.3.1 Fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es una sustancia que está por encima de su punto crítico. El punto de ebullición de un líquido se define como la temperatura a la cual la presión de vapor del líquido es igual a la presión externa. Sin embargo si la presión sobre un líquido se incrementa el punto de ebullición se eleva hasta llegar a un punto llamado punto crítico; donde respectivamente la presión y la temperatura se llaman presión crítica y punto crítico y es característico de cada sustancia. El fluido en esta región no es ni un líquido verdadero ni un vapor verdadero, pero tiene características de ambos.

Al analizar el diagrama de fases de una sustancia pura (Figura 4), se observa que los tres estados de la materia están separados por líneas que representan los equilibrios sólido-líquido o de fusión, sólido-gas o de sublimación y líquido-gas o de vaporización. También aparecen dos puntos característicos: el punto triple, PT, donde coexisten los tres estados, y el punto crítico, PC, al final de la curva de vaporización. Se advierte, además, que la línea de vaporización, línea PT – PC, tiene la singularidad de desaparecer en el punto PC, el punto crítico, a unos valores termodinámicos de presión y temperatura que se denominan presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c), respectivamente.

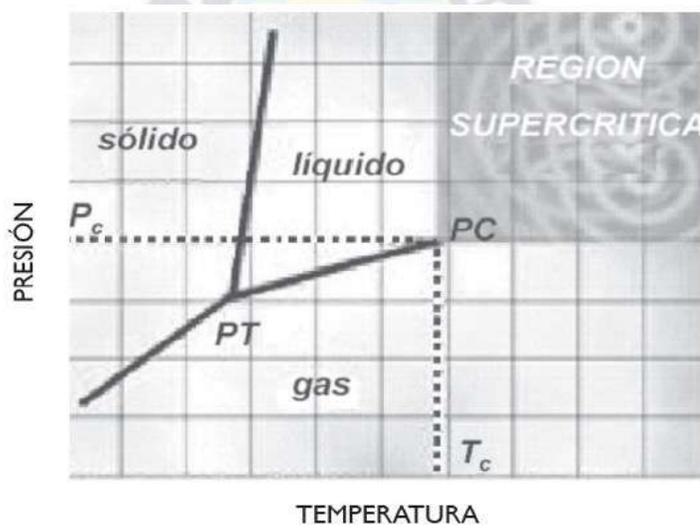


Figura 4. Diagrama de fases

Fuente: La tecnología de los fluidos supercríticos (2008)

Cuando una determinada sustancia se encuentra a valores superiores a los de su punto crítico se le conoce como fluido supercrítico. Bajo estas condiciones no se licua por más que se aumente la presión ni se vaporiza por más que la temperatura se eleve. Por consiguiente, la fase líquida es indistinguible de la fase vapor. En este punto la sustancia no puede considerarse ni como gas ni como líquido. Este comportamiento se ve reflejado

en las características que poseen los FSC, ya que algunas de ellas son inherentes a los gases y otras a los líquidos. (Velasquez Valderrama, 2008)

Los fluidos supercríticos tienen propiedades muy interesantes y potencialmente útiles para la extracción. La densidad de muchos fluidos críticos es similar a la de los solventes líquidos, por lo tanto muchas sustancias se disuelven en ellos. También tienen coeficiente de difusión muy parecidos a los de los gases, por lo que son capaces de transportar los solutos disueltos a través de los materiales muy rápidamente, y la baja viscosidad de los fluidos supercríticos es muy parecida a la de un gas, por lo que le permita fluir fácilmente a través de pequeñas aperturas o entre las propiedades más fuertes de los fluidos supercrítico esta la ausencia de meniscos, esto se debe a que los fluidos supercríticos no exhiben propiedades de tensión superficial (Cuervo P., 2008).

2.7.3.3.2 Dióxido de carbono como fluidos supercríticos

El dióxido de carbono, además de ser gas a presión atmosférica, presenta otras importantes ventajas prácticas que han hecho que sea, con diferencia, el fluido más utilizado en las aplicaciones hasta ahora descritas de la técnica de extracción por fluidos supercríticos. De entre ellas puede destacarse las siguientes: es inerte, no tóxico, barato, puede adquirirse con un alto grado de pureza y tal como ya se ha comentado adquiere el estado supercrítico a baja temperatura (31°C) y a una presión de fácil manejo (73 atm). Realmente, la única desventaja que presenta el CO₂ frente a otros fluidos supercríticos es su carácter apolar, lo que hace que no pueda ser adecuado para extraer analitos de elevada polaridad. (Valverde G., 1995).

Tabla 2. Propiedades físicas del CO₂ como solvente crítico.

Fluido	T. crítica (°C)	P. crítica (atm)	Densidad crítica (g/ml)	Observaciones
CO ₂	31.2	72.8	0.47	Inerte, no inflamable, no tóxico

Fuente: Extracción con fluidos supercríticos principios y aplicaciones (1995).

2.7.3.3.3 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción supercrítica es una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto supercrítico del solvente, similar a la extracción clásica con la particularidad de utilizar como agente extractor un FSC en lugar de un líquido.

El proceso de extracción con fluidos supercríticos básicamente consiste de cuatro etapas:

- **Etapas de presurización:** se eleva la presión del gas a utilizar como solvente a un valor P_1 por encima de su presión crítica P_c ; esta operación se realiza por medio de un compresor o bomba.
- **Etapas de ajuste de temperatura:** se remueve o adiciona energía térmica, ya sea con un intercambiador de calor, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el solvente comprimido a la temperatura de extracción requerida, estado que está por encima de su temperatura crítica.
- **Etapas de extracción:** se conduce el FSC al extractor donde se encuentra la muestra o materia prima que contiene el soluto de interés.
- **Etapas de separación:** el gas se descomprime a una presión P_2 inferior a la presión crítica, liberándose el soluto en un recipiente separador.

La extracción con fluido supercrítico para una alimentación sólida es un proceso semi-continuo, en donde la alimentación sólida es cargada en una canasta del extractor por etapas y el CO₂ fluye en modo continuo una vez cerrado el sistema.

Frecuentemente se utiliza un co-solvente para mezclarlo con el CO₂ a alta presión y aumentar el poder de solvencia o la selectividad de la extracción para la obtención de compuestos específicos. La separación es producida comúnmente en etapas, manteniendo condiciones diferentes en dos o tres separadores para fraccionar el extracto, dependiendo de las solubilidades de los componentes y las especificaciones deseadas de los productos. (Velasquez Valderrama, 2008)

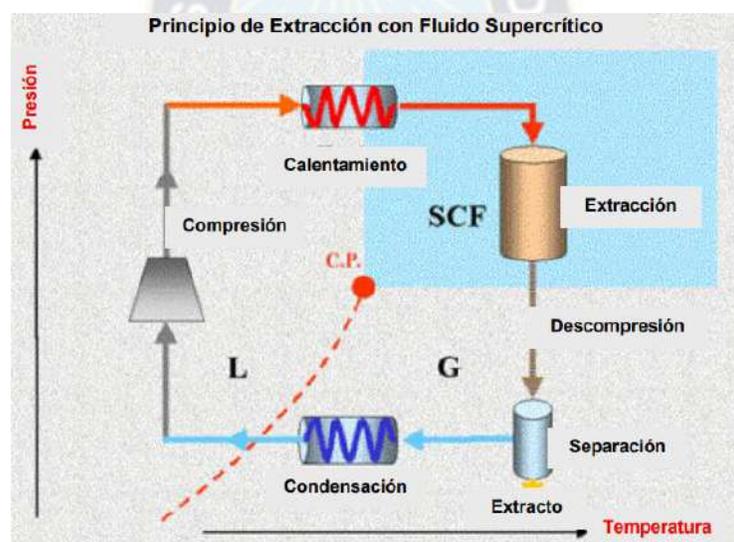


Figura 5. Diagrama básico del proceso de extracción empleando un fluido supercrítico

Fuente: ISASF, Francia (2002)

La Figura 5, muestra el diagrama esquemático del proceso de extracción con fluido supercrítico. El esquema corresponde a una extracción supercrítica con solvente puro, en el cual el fluido es sometido a compresión y calentamiento con la finalidad de alcanzar las condiciones supercríticas, posteriormente es puesto en contacto con la matriz celulosa

para realizar la extracción del aceite esencial, una vez realizada ésta se somete la mezcla producto-solvente a una descompresión, con la finalidad de facilitar el proceso de separación del solvente y el producto, una vez realizada la separación, el solvente es sometido a un proceso de condensación para ser reutilizado en circuito de extracción y el producto es recolectado en la etapa de separación.

La extracción supercrítica es particularmente efectiva para sustancias de mediano peso molecular y relativa baja polaridad. La principal ventaja que presenta frente a la destilación es que la separación puede realizarse a temperaturas moderadas y en consecuencia puede ser aplicada a sustancias de baja volatilidad, lo cual es interesante ya que abre nuevas posibilidades para las industrias del petróleo, alimentos, farmacéutica y cosmética, la energía requerida en la operación del proceso extracción es menor que las requeridas en procesos de extracción con solventes orgánicos, es un proceso ambientalmente amigable y con estándares de calidad mayores a los métodos de extracción convencionales. (Cuervo P., 2008)

La alta inversión requerida para el montaje de un equipo de extracción con fluidos supercríticos, así como los pocos datos relativos a equilibrios de fases y de transferencia de materia en sistemas complejos, han impedido el empleo masivo de esta técnica de extracción, obligando al investigador a diseñar empíricamente las condiciones operativas ingenieriles y termodinámicas en la mayoría de los casos. (Velasquez Valderrama, 2008)

2.8 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa,

principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales libres o antiradicalaria (en inglés, scavenger) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad antiradicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante (Londoño L., 2012).

2.8.1 Medición de la actividad antioxidante

2.8.1.1 Método de Folin-Denis

El método de Folin - Denis se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios. La vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos.

La actividad antioxidante de los diferentes aceites esenciales se evalúa por varios métodos como el grado de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico, evaluación del poder de reducción, test del – caroteno entre algunas pruebas (Yapuchura M., 2010).

2.8.1.2 **Ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2- picrilhidrazilo (DPPH)**

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH* para aceptar un átomo de hidrógeno (H+) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nanómetros. Cuando la solución de DPPH* reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Deng J., Yang G., & Cheng W., 2011).

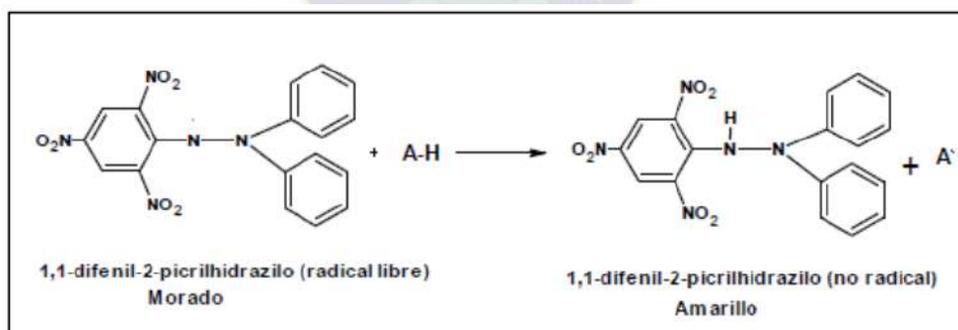


Figura 6. Estructura del DPPH* antes y después de la reacción con el antioxidante.

Fuente: Deng (2011).

El ensayo DPPH* tiene algunas desventajas que limitan su aplicación, entre estas se encuentran:

- La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo.
- DPPH* es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. (Bohorquez Fajardo, 2016).

2.8.1.3 *Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2,- Azino- bis-3- etilbenzotiazolin- 6- sulfónico (ABTS)*

Método propuesto por Miller N. J, en 1993, se basa en la capacidad antioxidante del ABTS+ para secuestrar aniones radicales de larga vida. En el ensayo el ABTS+ es oxidado por radicales peróxido, por persulfato de potasio, por peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rabano u otro oxidante hasta formar el catión radical ABTS+ el cual presenta un intenso color verde-azul, y en la medición los compuestos con capacidad antioxidante reaccionan directamente disminuyendo el color del catión radical ABTS+ , los resultados obtenidos son expresados como inhibición y llevados a una concentración relativa de Trolox, es por ello que el método se conoce como Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC). El radical posee solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica, por lo tanto, evalúa antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y fluidos biológicos. (Huang D. & Prior R., 2005)

La generación del radical ABTS* + constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El formato más apropiado para el

ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes

El radical ABTS⁺ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además radical generado químicamente (persulfato potásico), fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente (Martinez F. & Gonzales G., 2002).

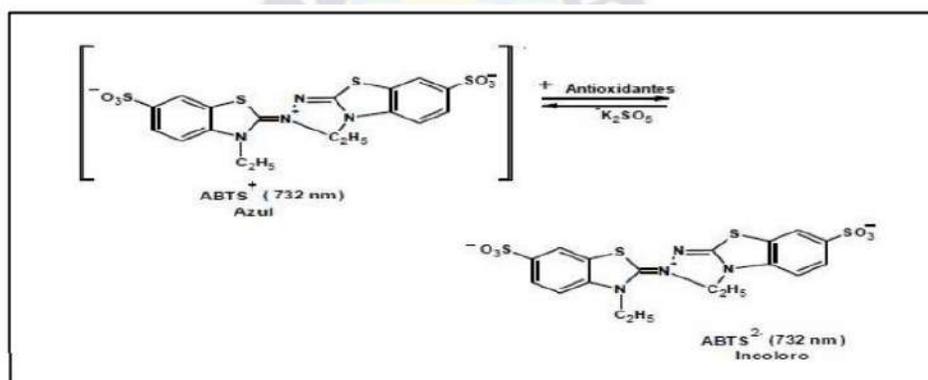


Figura 7. Estructura del ABTS⁺ antes y después de la reacción con el antioxidante.

Fuente: Propiedades y acciones antioxidantes (2002).

2.9 Actividad antimicrobiana

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *In vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los

ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores, de allí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica.

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana son clasificadas en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares.

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticosa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo. (Ramírez & Castaño, 2009).

2.9.1 Método de dilución.

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida y la concentración mínima inhibitoria, la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas. En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal.

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo

crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar. (Ramirez & Castaño, 2009).

2.10 Producto terapéutico

Es una formulación de uso tópico que puede producir alteraciones de las funciones vitales de la piel y puede tener efecto sistémico.

Productos que permite mejorar o corregir problemas de la piel que, sin ser enfermedades, hacen que nuestro aspecto no sea el más atractivo (manchas, arrugas, cicatrices...). Para ello se aplican tratamientos invasivos o no invasivos, que generalmente se completan con tratamientos tópicos, cremas, ungüentos, gel, etc., que mejoran o hacen más duradero el resultado obtenido (Beltran, 2016).

2.11 Mercado de gel terapéutico en Bolivia

En el mercado de productos farmacéuticos están los laboratorios de productos naturales y laboratorios farmacéuticos, los que se encuentren establecidos en el eje troncal de Bolivia. Estas entidades serán responsables de la transformación del extracto en preparaciones farmacológicas, dirigidas al consumidor final. De acuerdo a los registros de FUNDAEMPRESA se tiene el siguiente detalle de empresas farmacéuticas y laboratorios de productos naturales en las principales ciudades de Bolivia; La Paz, Cochabamba y Santa Cruz (Cacasaca Avila, 2012).

Tabla 3. Principales empresas farmacéuticas de Bolivia

Ciudad	Empresa	Producto Antiinflamatorio	Principio Activo
LA PAZ	Lab. COFAR S.A.	DICLOMED GEL-D	No esteroideo
LA PAZ	Lab. HAHNEMAN	DICLOHAN GEL	No esteroideo
LA PAZ	Drog. INTI S.A.	MENTISAN	Natural (mentol, eucaliptol)
LA PAZ	Lab. VITA	FRIZZZZ	Salicilato de metilo
LA PAZ	ABL. PHARMA LTDA.	DEFLAMAT GEL	Diclofenaco sódico
LA PAZ	Lab. BAGO BOLIVIA S.A.	CLOFENAC GEL	No esteroideo
LA PAZ	Lab. MAVER	DOLMUS GEL	Ketoprofeno
		DOLORUB	Ibuprofeno
LA PAZ	Lab. CRESPAL S.A.	OUT PAIN	Extracto de belladona
LA PAZ	Lab. ALCOS	FLAMADOLGEL	No esteroideo
LA PAZ	G&G FITO FHARMA	ARTRINON	Sulfato de glucosamina
LA PAZ	IRUPANA	MANZANILLA UNGUENTO	Aceite esencial
CBBA	Lab. FARCOS LTDA.	DOLORSAN	Salicilato de metilo
SCZ	TECNOFARMA S.A.	LERTUS GEL	Diclofenaco sódico
SCZ	LAB. IFA S.A.	JABON DE MANZANILLA FLAMADIN GEL	Aceite esencial Diclofenaco dietilamina

Fuente: Registro FUNDAEMPRESA (2012)

CAPITULO 3 METODOLOGÍA

3.1 Flujograma del proceso de obtención del aceite esencial

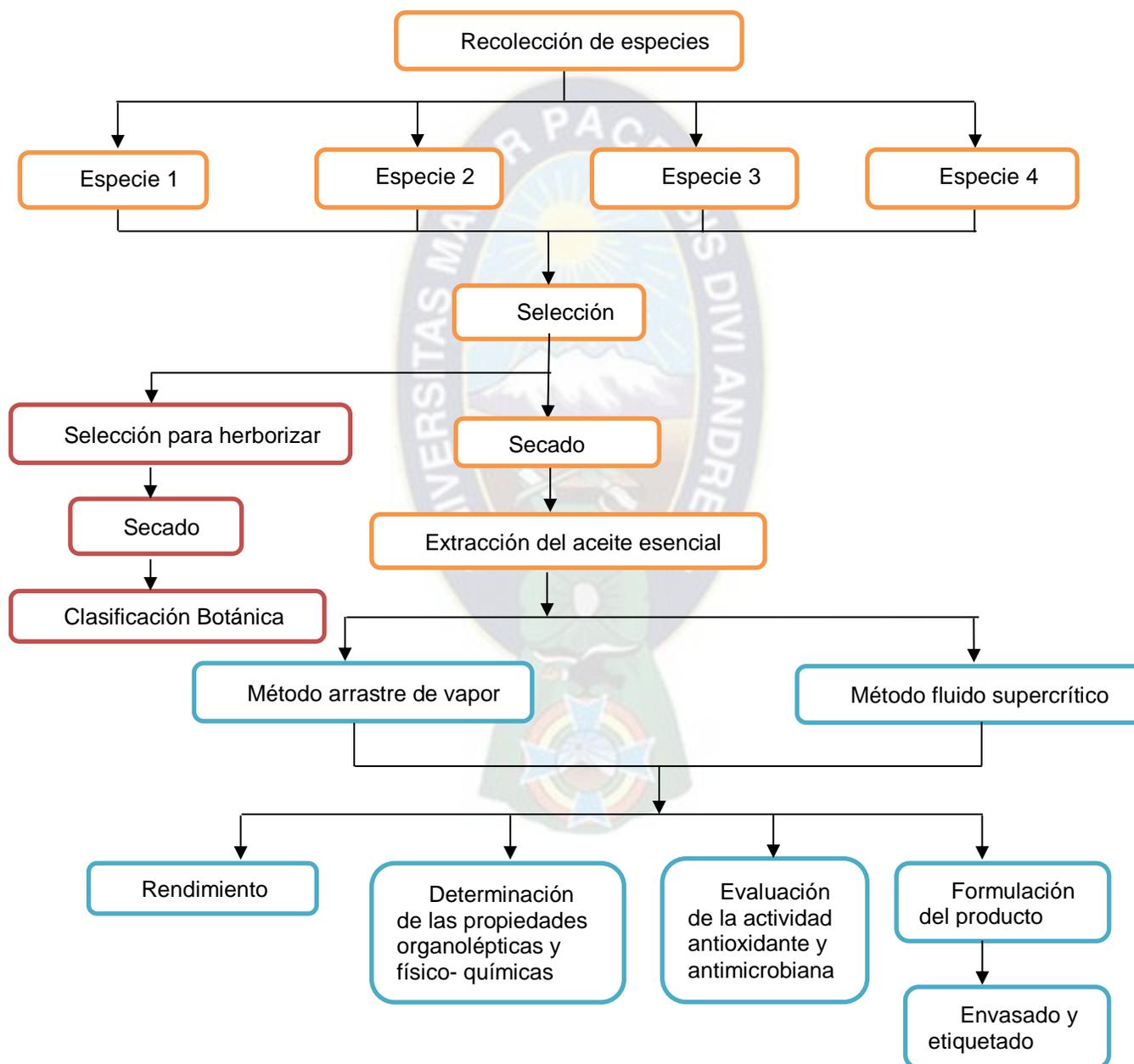


Figura 8. Flujograma del proceso

3.2 Localización de la investigación

El trabajo se realizó en el laboratorio de Química Industrial bloque B, de la Facultad de Tecnología, en los laboratorios de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas y en la Facultad de Cs. Químicas en laboratorio de Centro de investigaciones Químicas. Asimismo, se ha realizado el trabajo en las Provincias de Larecaja e Inquisivi del departamento de La Paz, donde se colectaron 3 especies del género *Tagetes* y 1 especie del género *Myrciantes*.

Tabla 4. Ubicación geográfica de Provincias

Provincia	Municipio
Larecaja	Sorata
Inquisivi	Inquisivi

3.3 Método de recolección

Se llevó a cabo la recolección del material fresco de los géneros *Tagetes* y *Myrciantes*, fueron colectados en estado de floración y una vez colectadas se la traslado a ambientes donde se llevó a cabo el proceso de secado sin luz solar.



Figura 9. Etapa de secado de las especies vegetales.

3.4 Identificación

Para la identificación se seleccionó un espécimen en floración y se la preparó entre periódicos para el secado en la oscuridad, luego se acomodó sobre una hoja de cartulina blanca se escribieron las referencias, se entregó el material herborizado junto con una carta de solicitud de identificación al Herbario Nacional de Bolivia.



Figura 10. Material vegetal herborizado

3.4.1 Rendimiento

Para la determinación del rendimiento por el método de arrastre de vapor y fluidos supercríticos de cada especie se aplicó las siguientes expresiones matemáticas, y se aclaran los valores numéricos:

Rendimiento por arrastre de vapor:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{masa del aceite esencial}}{\text{masa del vegetal seco inicial}} \times 100\%$$

Rendimiento por fluidos supercríticos:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \times 100\%$$

3.5 Determinación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales

3.5.1 Propiedades organolépticas.

Se valoraron las propiedades cualitativas de aspecto, olor, sabor (por los sentidos de la vista, gusto y el olfato) y color.

3.5.1.1 Determinación de color.

Se preparó las soluciones madres con los siguientes reactivos: Agua destilada, Dicromato de potasio al 0,5 % (P/V) y Verde de bromocresol al 0,025% (P/V). Posteriormente se preparó 11 soluciones madres de diferentes colores, se vertieron en matraces aforados de 10 ml con tapón.

Colocados a un solo nivel con sus respectivos números. Se compararon los aceites esenciales con los colores patrón, según NB 75020 Aceites esenciales-Determinación del color, Noviembre 2006.



Figura 11. Soluciones patrón

3.5.2 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.

3.5.2.1 pH.

Para determinar el pH que se encontraban los aceites esenciales se usó papel pH metro (UNIVERSAL INDICATOR PAPER) con escalas a la unidad.



Figura 12. Indicador de pH

3.5.2.2 Miscibilidad en etanol.

En la determinación de miscibilidad en alcohol se preparó las siguientes soluciones:
Mezclas hidroalcohólicas: Etanol al 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95%.

Solución patrón de opalescencia:

50 ml de cloruro de sodio al 0,0002 mol/L

0,5 ml de Nitrato de plata al 0,1 N

1 gota de ácido nítrico concentrado

*Si no es posible conseguir una solución limpia, pero si una solución opalescente en el momento de solubilizarse a 20 volúmenes, comparar con la solución patrón. Según NB 75004 Aceites esenciales - Determinación de la miscibilidad en etanol, Agosto 2005.

3.5.2.3 Densidad a 20 °C.

La densidad relativa es la masa de la unidad de volumen, dado del aceite esencial a 20 °C con respecto a la masa de un volumen igual de agua destilada. La densidad relativa no tiene dimensiones siendo su símbolo " ρ ".

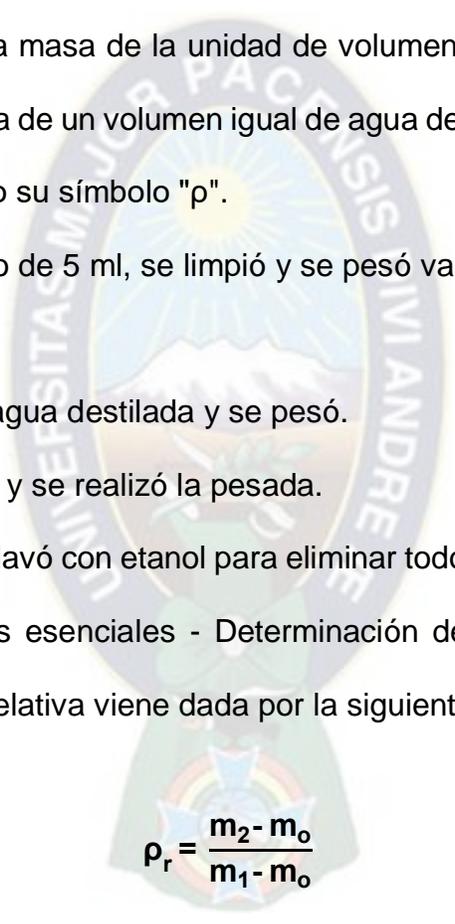
Se preparó un picnómetro de 5 ml, se limpió y se pesó vacío en una balanza analítica (METTLER TOLEDO).

Se llenó el picnómetro con agua destilada y se pesó.

Se llenó con aceite esencial y se realizó la pesada.

Se vació el picnómetro y se lavó con etanol para eliminar todo vestigio de aceite esencial.

Según la NB 75005 Aceites esenciales - Determinación de densidad relativa a 20°C, Agosto 2005. La densidad relativa viene dada por la siguiente expresión.


$$\rho_r = \frac{m_2 - m_o}{m_1 - m_o}$$

Dónde:

m_o = es la masa, en gramos, del picnómetro vacío.

m_1 = es la masa, en gramos, del picnómetro lleno de agua.

m_2 = es la masa, en gramos, del picnómetro lleno de aceite esencial.



Figura 13. Balanza analítica (METTLER TOLEDO)

3.5.2.4 Índice de acidez.

En un matraz Erlenmeyer se depositó 2 gramos de aceites esenciales y 5ml de alcohol absoluto. Se adicionó 3 a 5 gotas de indicador fenolftaleína y se agitó completamente. Sin detener la agitación, se fue titulando con la base ya preparada de (KOH) desde la bureta, gota a gota, hasta que aparezca color rosa que persista 30 segundos.

Se anotó el volumen de (KOH) gastados y se aplicó la expresión según NB 75006 Aceites esencial - Determinación del índice de acidez, Agosto 2005.

$$IA = V * c \frac{56,11}{m}$$

Dónde:

V = es el volumen en mililitros de hidróxido de potasio utilizado en la neutralización.

c = es la concentración exacta, en moles por litro de la solución de hidróxido de potasio.

m = es la masa en gramos de la porción de ensayo.



Figura 14. Índice de acidez

3.5.2.5 Índice de refracción.

El índice de refracción de los aceites esenciales es la relación entre la velocidad de un haz de luz en el vacío y la velocidad del haz de luz cuando esta pasa por el aceite esencial, el que se mide con el refractómetro.

Se verificó la calibración del refractómetro ABBE DE BANCADA (QUIMIS ISO 9001), con agua destilada y luego de limpiar y secar se depositó una o dos gotas de aceite sobre el prisma principal y se cerró dejando la muestra entre dos prismas. Una vez ajustado el campo se tomó el dato de la escala a temperatura de 20°C. Las mediciones se realizaron por triplicado de cada muestra. Se determinó el índice de refracción, según NB 75007 Aceites esenciales Determinación del índice de refracción, 2005.

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - t)$$

Donde:

$n_D^{t'}$ = es el valor de la lectura, obtenida a la temperatura de trabajo t' la cual se ha efectuado la determinación.

t = es la temperatura de referencia es de 20°C.



Figura 15. Refractómetro ABBE DE BANCADA (QUIMIS ISO 9001)

3.5.2.6 Poder rotatorio.

La polarimetría es una técnica orientada a medir la actividad óptica levógira (-) o dextrógira (+) de una muestra y su poder rotatorio. La medición se la realiza con el polarímetro.

Se encendió el polarímetro de disco (QUIMIS ISO 9001) y se verificó la calibración con agua destilada. Para las muestras se utilizó cubetas de 10 cm, se cargó con volumen adecuado de aceite esencial. En cero se determinó si la actividad era levógiro o dextrógiro, según el caso se movilizó la clavija para desplazar el campo y luego realizar la lectura de ángulo de rotación. Se realizó la observación y lectura usando la escala.

$$\alpha_D^t = \frac{A}{\lambda} * 100$$

Donde:

A = es el valor del ángulo de rotación, expresado en mili radianes y/o grados de ángulo.

λ = es la longitud del tubo utilizado, expresado en milímetros.

Los datos se trataron según NB. Aceites esenciales-determinación del poder rotatorio.

NB 75008.



Figura 16. Polarímetro de disco (QUIMIS ISO 9001)

3.5.3 Espectroscopia UV- Visible.

Se realizó los barridos espectrales para cada aceite con el espectrofotómetro UV- Vis. Doble haz (PERSEE). Se definió parámetros en modo Spectrum con la lámpara de Deuterio, entre longitud de onda 190 – 340 nm. Se preparó soluciones de aceite esencial con etanol debido a su alta concentración y se procedió con los barridos espectrales usando como blanco etanol.

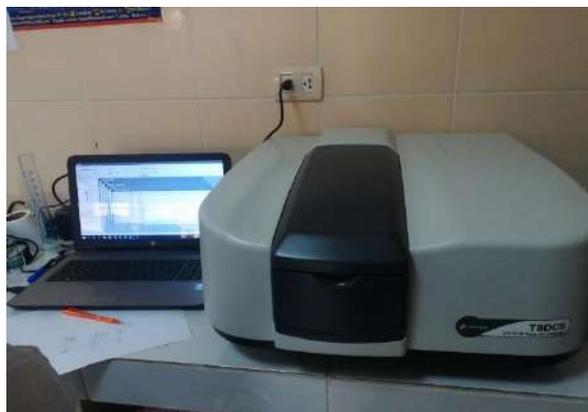


Figura 17. Espectrofotómetro UV-Visible (PERSEE)

3.5.4 Espectroscopia Infrarroja.

La determinación se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas en un espectrofotómetro JASCO FT/IR 6100, se seleccionó la aplicación para un rango de trabajo de 7800 a 350 cm^{-1} . Se verificó la calibración con una lámina de poliestireno, en la que se verificó al menos 6 números de onda característicos y se aceptó el criterio de variación máximo $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Cada una de las muestras se depositó en un volumen máximo de 10 μL ., sobre el cristal de seleniuro de zinc. Entre la medida de una y otra muestra se lavó, limpio el cristal con isopropanol. Se obtuvo el espectrograma IR al que se filtró la señal H_2O , CO_2 y se ajustó al modo ATR. Se grabó el espectrograma marcando previamente los valles en la zona de grupo como en la zona de la huella dactilar.



Figura 18. Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (JASCO)

3.5.5 Cromatografía en Capa Fina.

En la cromatografía en capa fina (CCF) la fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente (como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa) depositada sobre un soporte una lámina de aluminio o de plástico.

La fase móvil (líquido o eluyente) se introduce en una cubeta cromatográfica, de forma que sólo la parte inferior de la placa queda sumergida en el líquido y asciende por la placa de CCF por capilaridad.

Cuando son visibles las fracciones, se puede determinar el valor de R_f (factor de retención), o la distancia que cada compuesto se desplaza en la placa (Jorin Novo, Diaz, & Barcena Ruiz, 2001).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

La cromatografía en capa fina se realizó con una fase estacionaria Silica Gel y una fase móvil Hexano- Etanol, sembramos el aceite sobre la placa y se introdujo a una

cubeta cromatográfica, se esperó que recorra la fase móvil sobre la fase estacionaria, se activó la placa y se revelo con vainillina. Posteriormente se realizó la medición de la distancia recorrida por el compuesto y disolvente.



Figura 19. Placa cromatográfica

3.5.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas y la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. (Gutierrez & Droguet, 2002)

La identificación de los aceites esenciales seleccionados se realizó en un cromatógrafo de gases acoplada a masas GCMS – QP 2020 (SHIMADZU), en el laboratorio del Centro de Investigaciones Químicas de la Facultad de Cs. Puras y Naturales.

Se diluyo los aceites, posteriormente se inyecto al equipo cada disolución. Al cabo de una hora se observó el cromatograma y espectrograma de masas con sus respectivas comparaciones.



Figura 20. Espectrómetro GCMS - QP 2020(SHIMADZU)

3.6 Actividad antioxidante y antimicrobiana

3.6.1 Actividad antioxidante.

3.6.1.1 Método de Folin Denis

Las propiedades de antioxidantes en los aceites esenciales se realizaron sobre la base procedimental señalado por (Yapuchura M., 2010). Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de

varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres.

La prueba se realizó para identificar a los aceites esenciales que tienen mayor concentración de fenoles totales. De la solución patrón se preparó diferentes concentraciones con pirogalol, para realizar la curva de calibración. Se depositó en tubos por triplicado el reactivo de Folin, carbonato de sodio y agua en las diluciones coloreadas. Se dejó incubando a temperatura ambiente hasta que desarrolle el color durante 15 minutos, se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV –Vis (PERSEE) a una longitud de onda 723nm.

3.6.1.2 Método de ensayo de decoloración del radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

Este método se inició con la preparación del radical DPPH• (SIGMA- ALDRICH) con metanol (80%) teniendo una concentración de 20ppm.

Se añadió a tubos de ensayo de Reactivo de radical DPPH, aceite esencial y etanol por triplicado para cada aceite, se agito de manera constante y se dejó en reposo durante 30min en ambiente oscuro y en otro tubo de añadió el reactivo de DPPH y etanol, este nos sirvió como blanco que se lee en tiempo 0 en un espectrofotómetro UV-Vis. (PERSEE) a una longitud de onda de 512 nm. Al pasado los 30min se procedió a la lectura de las absorbancias de las soluciones con aceite esencial.

La capacidad antioxidante se calcula como el porcentaje de captación DPPH*, según la fórmula:

$$\% \text{ de captación DPPH} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100\%$$

% de captación ABTS

Donde:

A_{inicial} = es la absorbancia de control a tiempo 0 min

A_{final} = es la absorbancia del antioxidante a tiempo 30 min. (Kuskoski, Asuero, & Troncoso, 2005).

3.6.1.3 Método de ensayo de decoloración con el radical catiónico

Acido 2,2,- Azino- bis-3- etilbenzotiazolin- 6- sulfónico (ABTS)

Se diluyo el radical ABTS y etanol hasta obtener aproximadamente a una absorbancia de 0.750 en una longitud de onda 750nm, medición que se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis. (PERSEE). Se preparó en tubos de ensayo soluciones de aceites esenciales (1/10) y se adiciono el radical ABTS ya preparado con etanol, se midió las absorbancias en el tiempo de 10min y 30min a una longitud de onda 750nm en un ambiente oscuro.

3.6.2 Actividad antimicrobiana.

Se preparó el material respectivo para la prueba como ser: tubos de ensayo frascos de vidrio, matraces Erlenmeyer de capacidad de 500ml y 250ml, micro pipetas, tips y microplacas llevándolo a un autoclave para su esterilización.

Se analizaron los aceites en dilución 1/10 frente a 4 bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de cepas de referencia del Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, las cepas se mantuvieron en medio líquido con los aceites esenciales en medio de cultivo Mueller- Hinton Broth CM0405 (OXOID).

Este se incubó por 24 horas, pasado este tiempo se vio el efecto de inhibición de los aceites frente a los microorganismos. (Ramírez & Castaño, 2009).

3.7 Formulación de producto

3.7.1 Formulación del gel

a. Gel base

Se inició con el tamizado de Carbopol, utilizando una malla de 0.8 mm; se llevó a un vaso precipitado donde se agregó agua, se agitó cuidadosamente hasta que la mezcla tubo una apariencia homogénea se agregó glicerina mientras se realizaba la mezcla suavemente. Se realizó 3 formulaciones para tener una base de aspecto adecuado y aceptable al público.

b. Incorporación del aceite esencial

Según Vidal (2018), indica que la cantidad adecuada de aceite esencial en un producto oscila entre 0,5% y 2%, a la vez revisando la composición del gel MF (Droguería Local) tenía una cantidad del 1,9% de aceite esencial, si se excede esta cantidad estaríamos

propensos a que la persona que use el producto sufra irritabilidad, sensibilización en la piel. Por lo que añadimos 2% de aceite esencial al gel base elegido para que tenga una buena acción sobre la piel.

3.7.2 Control de calidad producto formulado.

3.7.2.1 Determinación de pH.

Para la determinación de pH se utilizó un papel ph (Labbox), para ver en los rangos que se encuentra el gel terapéutico, este procedimiento se realizó por triplicado.

3.7.2.2 Determinación de extensibilidad.

Este control es una manera de verificar que la elaboración de una determinada preparación ha sido correctamente reproducida. No existen valores de referencia para comparar, es la propia oficina de farmacia quien crea los suyos propios y sus márgenes de tolerancia.

Para esta determinación se utilizó 2 vidrio de reloj, en el primer vidrio de reloj se colocó papel, previamente pesado, se añadió 0,5 g de gel se mide el diámetro inicial y se coloca sobre este el segundo vidrio de reloj, por 1 minuto, y se volvió a medir el diámetro final. Todo este paso se realizó por triplicado (Perez, Rodriguez & Morales, 2011).

3.7.2.3 Determinación de Untuosidad.

Para la determinación de untuosidad se pesó 0,5 g de gel, posteriormente aplicarlo en la mano y con un cronometro controlar el tiempo que tarda en absorberse en la mano, realizamos este procedimiento 3 veces. (Perez, Rodriguez & Morales, 2011).

3.7.3 Aceptación de la formulación de gel terapéutico.

Según Domínguez (2012), para llevar a cabo la aceptación de un producto se seleccionó a las personas por criterios de exclusión e inclusión para que puedan usar el producto, posteriormente se realizó una encuesta acerca del producto, finalmente una control negativo y positivo del producto esto con el fin dar validez a la aceptación del producto.

a. Criterios de inclusión.

Para poder ser incluidos, los sujetos debieron cumplir todos y cada uno de los siguientes criterios:

- Sujetos de ambos sexos (hombres o mujeres).
- Edad comprendida entre los 18 y los 50 años.
- Estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio.
- Tener alguna dolencia articular o muscular en el cuerpo.

b. Criterios de exclusión.

Fue motivo de exclusión la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

- Sujetos con enfermedad de piel durante el estudio como ser acné, rosácea, etc.
- Sujetos con alguna alergia a alguno de los componentes del producto en estudio.

c. Desarrollo de la encuesta.

Una vez aplicado el criterio de inclusión y exclusión, se procedió a la selección de las personas quienes nos darán la aceptación o no del producto, se tomó un grupo de 20 personas para realizar el seguimiento durante 1 mes, y se verificó si ha tenido alguna alergia o algún cambio después de la aplicación del gel terapéutico, para ello se elaboró una encuesta de 10 preguntas acerca del producto.

d. Criterio de control.

Se realizó un control negativo positivo del producto, dando a las mismas personas un gel base sin aceite esencial y otro gel con aceite esencial MF (Laboratorio local), para corroborar los resultados obtenidos, realizando solo una pregunta: si los dos geles tienen sensación de alivio de dolor en la piel lastimada.

3.8 Análisis de resultados

El análisis de resultados para la determinación de propiedades fisicoquímicas y evaluación antioxidante se aplicó la estadística descriptiva determinando la media, desviación estándar y coeficiente de varianza en Excel 2012.

Asimismo, se aplicó el análisis de varianza con el software Statgraphics Centurion XVI.I, para comparar los rendimientos por método de extracción.



CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Identificación botánica

La colecta de especies vegetales se enfocó en las regiones valles mesotérmicos del departamento de La Paz y la identificación de las especies se realizó en el Herbario Nacional de Bolivia.

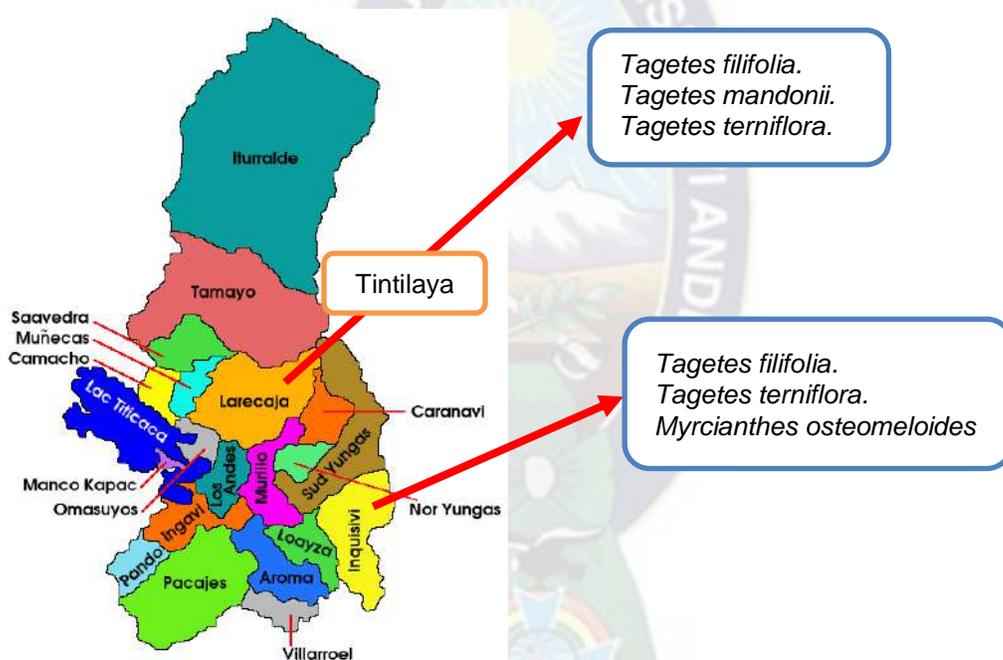


Figura 21. Mapa de ubicación de área de estudio

En la figura 21, se señalan los lugares de colecta, que abarcan los valles norte y sur del departamento de La Paz, en las que se destacan las provincias Larecaja municipio de Sorata comunidad de Tintilaya e Inquisivi. En esta misma figura, se marcaron las especies por lugar de colecta.

Las muestras colectadas fueron evaluadas por el Dr. Stephan Beck (LPB), profesional del Herbario Nacional de Bolivia, cuyos resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación botánica y origen de colecta de las especies vegetales del sector valle de departamento de La Paz

Familia	Especie	Procedencia
Compositae	Tagetes filifolia Lag.	Tintilaya e Inquisivi
Compositae	Tagetes mandonii Sch. Bip.	Tintilaya
Compositae	Tagetes terniflora Kunth	Tintilaya e Inquisivi
Myrtaceae	Myrcianthes osteomeliodes (Rusby) McVaugh	Inquisivi

En la tabla 5, se aprecian las especies de la familia Compositae en la que se identificaron 3 especies del género Tagetes y de la familia de Myrtaceae se identificó 1 especie del género Myrcianthes, pertenecientes a Tintilaya e Inquisivi del sector valle del departamento de La Paz.

T. filifolia es endémico temporal de la comunidad de Tintilaya en época húmeda, esta planta tenía una altura de crecimiento de 15-20 cm en plena etapa de floración, las flores de color amarillo con pétalos blancos, tenía un aroma suave, se lo recolecto de las laderas donde se encontraba en medio de otras plantas, de igual manera esta especie es endémico temporal en la región de Inquisivi en época húmeda donde se encontró en las laderas de los sembradíos de choclo. (Anexo 1)

T. mandonii se encontró en etapa de floración con flores amarillas de manera endémica en la comunidad de Tintilaya, la planta tenía una altura de crecimiento entre 1 - 1,5 metros, con hojas dentadas verdes. (Anexo 2)

T. terniflora es endémico temporal en la comunidad de Tintilaya en época húmeda con una altura de crecimiento de 1,5 m., con hojas grandes de 4-5 cm de largo dentadas, empezando a florecer, en las mismas condiciones se encontró en la región de Inquisivi. (Anexo 3)

M. osteomeloides endémico en la comunidad de Inquisivi en época húmeda se encontró en forma de arbustos, algunos de ellos rodeadas de plantas espinosas, sus hojas se observaban brillosas de color verde intenso. (Anexo 4)

4.2 Determinación de rendimiento de la extracción de aceite esencial por método arrastre de vapor y fluidos supercríticos

4.2.1.1 Determinación de condiciones de operación por método arrastre de vapor.

4.2.1.1.1 Balance de materia por método arrastre de vapor.

Se define como la cantidad de materia que ingresa en un sistema, más la cantidad de materia que se genera dentro del sistema, menos la cantidad de materia que sale del sistema que debe ser igual al incremento en la cantidad de materia almacenada en el sistema.

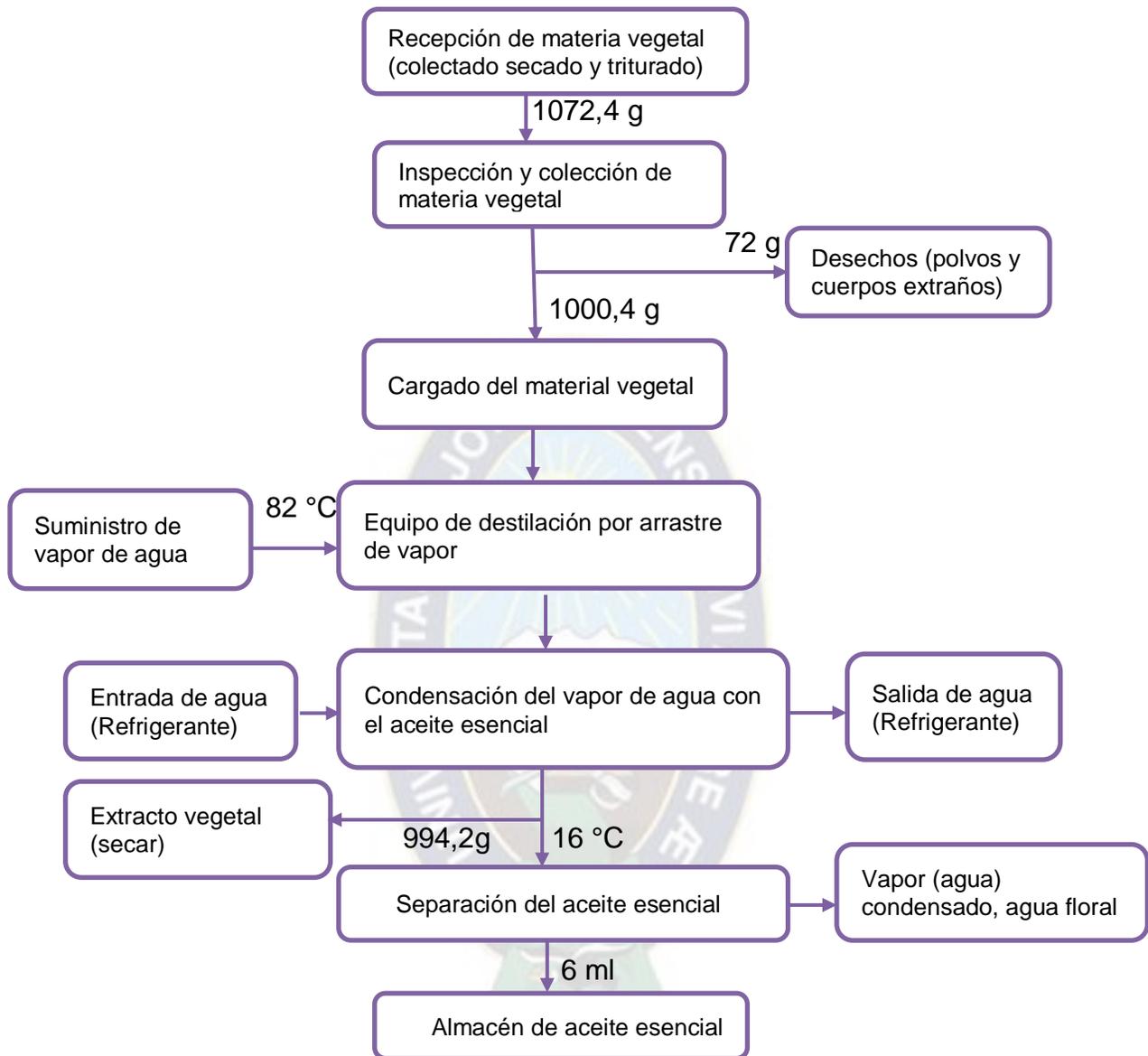


Figura 22. Balance de materia de la obtención de aceite esencial.

En la figura 22, muestra el balance de materia mediante el método arrastre de vapor, la cantidad de muestra para la extracción fue 1072,4 g, separamos impurezas (plantas ajenas, piedrillas, plantas dañadas) que fue de 72 g, entonces al equipo de arrastre de vapor ingreso: 1000,4 g el vapor ingreso con una temperatura de 82 °C, al cabo de 2

horas, el extracto lo secamos y se tuvo una masa final de 994,2 g, con aceite esencial de 6 ml.

Tabla 6. Condiciones de operación

Condiciones	Datos
Materia vegetal	1000 g
Tiempo de extracción	120 min
Flujo de vapor	15,91 ml/min
Volumen cargado en el generador	4000 ml
Volumen retenido en el extractor	197,9 ml
Volumen retenido en el condensador	379,4 ml
Flujo de condensado	1,05 ml/min
Volumen de aceite esencial	6 ml
Densidad del aceite esencial	0,9204 g/ml

$$\text{Masa entra} - \text{Masa sale} + \text{Masa generada} = \text{Masa acumulada} \quad (1)$$

$$\text{Masa acumulada} = 0 \quad (2)$$

$$V_1 = V_2 + V_3 + V_4 \quad (3)$$

V_1 = Volumen agua evaporada en el generador de vapor

V_2 = Volumen de agua retenido en el fondo del extractor

V_3 = Volumen de agua retenido por el material

V_4 = Volumen de agua en la corriente de producto

$$Q_{\text{vapor}} = 15,91 \frac{\text{ml}}{\text{min}} \quad t_{\text{extracción}} = 120 \text{ min}$$

$$V_1 = 15,91 \frac{\text{ml}}{\text{min}} * 120 \text{ min} = 1909,2 \text{ ml}$$

$$Q_{\text{condensado}} = 1,05 \frac{\text{ml}}{\text{min}} * 120 \text{ min} = 126 \text{ ml}$$

$$126 \text{ ml} = V_{\text{agua}} + V_{\text{aceite}} \quad (4)$$

$$V_{\text{condensado}} + 126 = V_{\text{agua}} + V_{\text{aceite}} \quad (5)$$

$$379,4 \text{ ml} + 126 = V_{\text{agua}} + V_{\text{aceite}}$$

$$505,4 \text{ ml} = V_{\text{agua}} + V_{\text{aceite}} \quad (6)$$

$$V_4 = V_{\text{agua+aceite}} - V_{\text{aceite}}$$

$$V_4 = 505,4 \text{ ml} - 6 \text{ ml}$$

$$V_4 = 499,4 \text{ ml}$$

En ecuación (3)

$$1909,2 \text{ ml} = 197,9 \text{ ml} + V_3 + 499,4 \text{ ml}$$

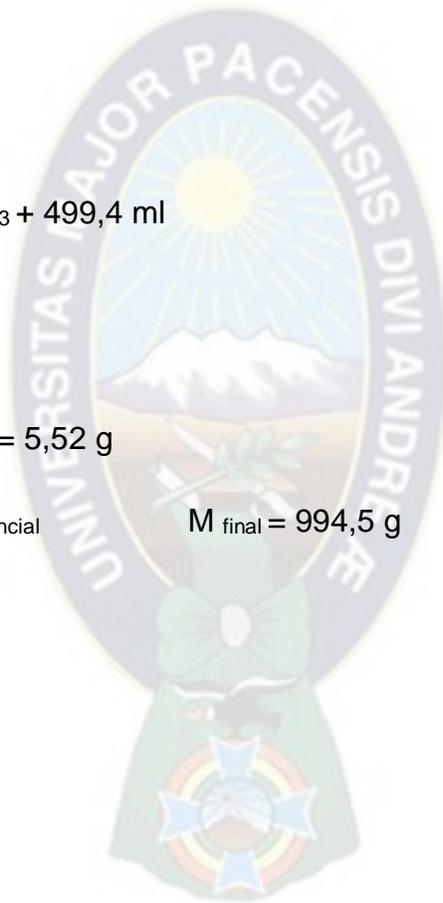
$$V_3 = 1211,9 \text{ ml}$$

Por densidad:

$$M_{\text{aceite}} = 0,9204 \frac{\text{g}}{\text{ml}} * 6 \text{ ml} = 5,52 \text{ g}$$

$$M_{\text{final}} = M_{\text{inicial}} - M_{\text{aceite esencial}}$$

$$M_{\text{final}} = 994,5 \text{ g}$$



4.2.1.2 Balance de materia por método fluidos supercríticos.

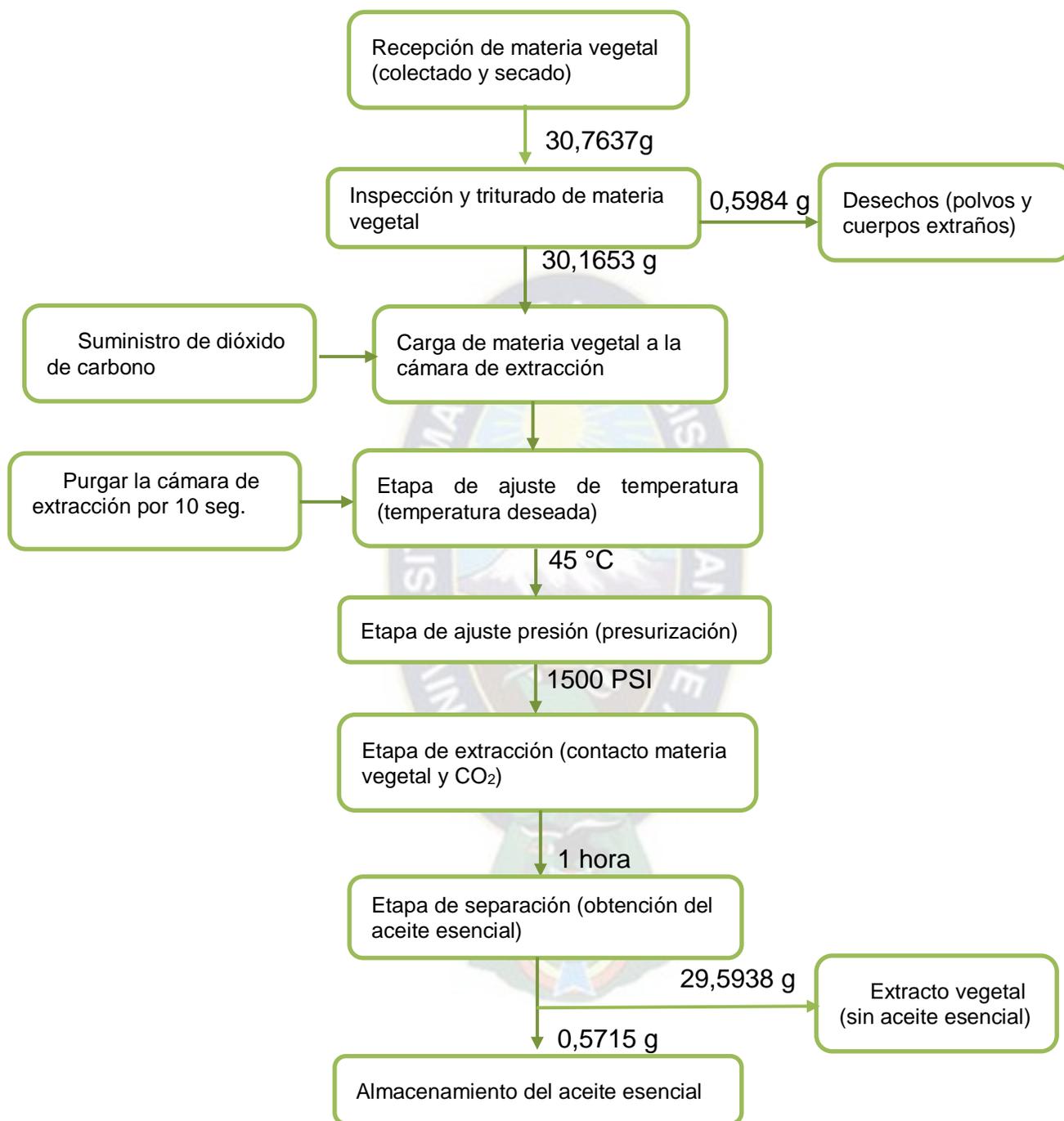


Figura 23. Balance de materia de obtención de aceite esencial por FSC

La figura 23, muestra el balance de materia mediante el método fluidos supercríticos, la cantidad de muestra para la extracción fue 30,7637 g, las impurezas (plantas ajenas)

pesaron 0,5984 g. Se trituro la muestra y se cargo en la cámara 30,1653 g. Se ajustó la temperatura a 45 °C (modificable según requerimiento), posteriormente se pasó a la etapa de presurización con 1500 PSI (modificable según requerimiento), en la etapa de extracción, el solvente CO₂ entro en contacto con la muestra, al cabo de 1 hora se pasó a la etapa de separación donde el extracto seco peso 29,5938 g y el aceite 0,5715 g.

4.2.2 Rendimiento de extracción por método arrastre de vapor

Tabla 7. Rendimiento en aceite esencial de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite Esencial	%Rendimiento
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	0,4
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	0,2
<i>T. mandonii</i> (Tintilaya)	0,4
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	0,2
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	0,3
<i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	0,6

Se puede observar en la tabla 7, el mayor rendimiento entre todas las especies corresponde *M. osteomeloides* con 0,6%

En la especie de *T. filifolia* según Maestri, Zygadlo, Grosso, Aburra & Guzman(1991) obtuvieron un rendimiento de 0,8% proveniente de Argentina, Serrato (2015) obtuvo un rendimiento de 0,6% proveniente de México, comparando con el trabajo se obtuvo un

rendimiento de 0.4% y 0,2% proveniente de Tintilaya e Inquisivi respectivamente, estas diferencias numéricas están atribuidas al proceso y espacio geográfico donde habitan.

Para el caso de *T.mandonii* según Senatore (1999) en Perú tuvo un rendimiento de 0,4% de aceite y en nuestro caso fue igual.

Finalmente en el género Tagetes estudiadas, tenemos *T. terniflora* que, según Cosme (2002) en Jujuy obtuvo un rendimiento de 0,4% de aceite esencial y en nuestro caso se tiene los rendimiento de 0,2% y 0,3% recolectado de Tintilaya e Inquisivi respectivamente, por lo que no tiene cambios numéricamente relevantes frente a la referencia bibliográfica.

Para el caso de *M. osteomeloides* según Lopez (2001) obtuvo un rendimiento de 0,6% de aceite esencial proveniente del departamento de Cochabamba y en nuestro estudio se tiene un rendimiento de 0,6% proveniente de Inquisivi, similar a la bibliografía mencionada. Esto puede ser debido a que Inquisivi colinda con el departamento de Cochabamba por lo tanto cuentan con pisos ecológicos similares.

4.2.3 Rendimiento por fluidos supercríticos

Tabla 8. Rendimiento con extracción por FSC de *T. filifolia*

P (PSI)	T(°C)	%Rendimiento
1600	35	1,3
2000	35	1,7
1600	45	3,0
2000	45	3,7

En la tabla 8, se observa que a presión de 2000 PSI y a temperatura de 45 °C se obtiene un rendimiento elevado de 3,7%, en comparación con el segundo donde se

trabajó a la misma presión 2000 PSI pero a una temperatura de 35 °C teniendo como rendimiento de 1,72%.

Tabla 9. Rendimiento con extracción por FSC de *T. mandonii*

P (PSI)	T (°C)	%Rendimiento
1700	35	0,60
2200	35	1,63
1700	45	1,47
2200	45	2,12

En la tabla 9, se observa que a presión de 2200 PSI y temperatura de 45 °C se obtiene un rendimiento elevado de 2,12%, en comparación con los tres rendimientos obtenidos, a su misma vez notamos que a menor presión y temperatura se obtiene bajos rendimientos en este caso de 0,60%.

Tabla 10. Rendimiento con extracción por FSC de *T. terniflora*

P (PSI)	T (°C)	%Rendimiento
1600	35	0,83
2100	35	3,37
1600	45	1,33
2100	45	1,52

En la tabla 10, se observa que a presión de 2100 PSI y a temperatura de 35 °C se obtiene un rendimiento mayor de 3,37%, en comparación con los demás rendimientos teniendo un bajo rendimiento de 0,83% a una presión 1600 PSI y 35 °C.

Tabla 11. Rendimiento con extracción por FSC de *M. osteomeloides*

P (PSI)	T (°C)	%Rendimiento
1500	35	1,30
2100	35	2,10
1500	45	1,89
2100	45	3,01

En la tabla 11, se observa que a presión de 2100 PSI y a temperatura de 45 °C se obtiene un rendimiento elevado de 3,01%, en comparación con el segundo donde se trabajó a la misma presión 2100 PSI pero a una temperatura de 35 °C teniendo como rendimiento de 2,10%, por lo que podemos determinar que la temperatura influye en el rendimiento.

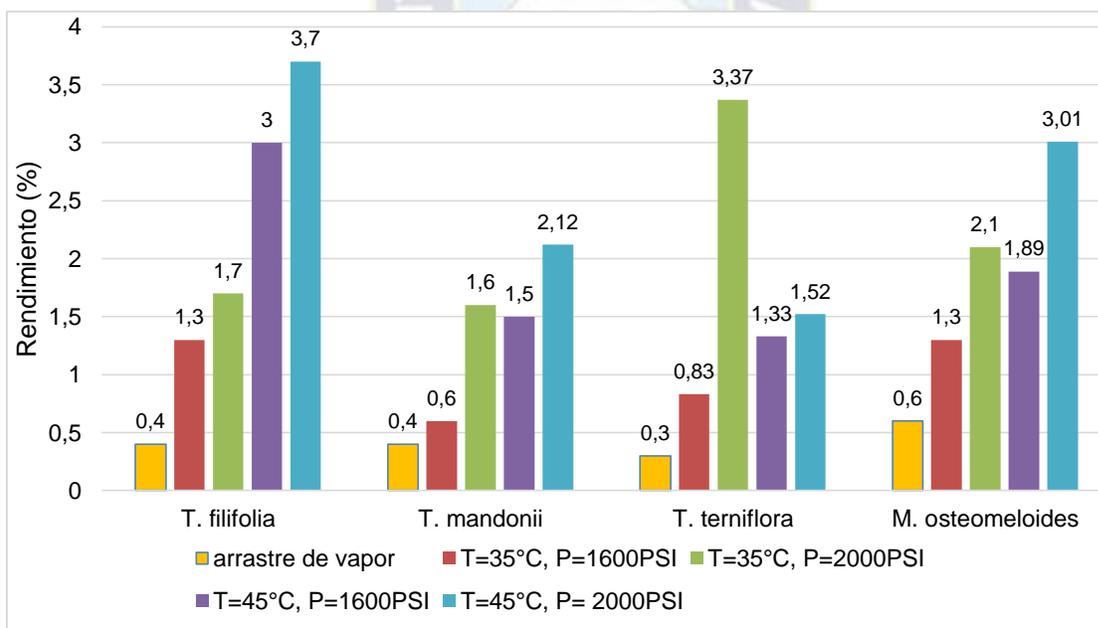


Figura 24. Rendimiento entre arrastre de vapor y fluidos supercríticos

La figura 24, muestra la diferencia de rendimiento entre la extracción por arrastre de vapor y fluidos supercríticos, esta diferencia es debido a que el método de fluidos supercríticos

advierte que el aceite esencial presenta mayor rendimiento según las condiciones de presión y temperaturas aplicadas, mientras que por arrastre de vapor se obtiene al aceite esencial en menor rendimiento.

4.3 Determinación de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales

4.3.1 Propiedades organolépticas de los aceites esenciales.

El análisis organoléptico o evaluación sensorial, se realizó a través de los sentidos de la vista, olfato y gusto, considerando los caracteres de aspecto, olor, sabor y color de los aceites esenciales.

Tabla 12. Análisis Organoléptico de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Procedencia	Aspecto	Olor	Sabor
<i>T. filifolia</i>	Inquisivi	Líquido oleoso	Agradable característico al anís	Dulce
<i>T. filifolia</i>	Tintilaya	Líquido oleoso	Agradable característico al anís	Dulce
<i>T. Mandonii</i>	Tintilaya	Líquido oleoso con tintura	Agradable	Picante
<i>T. terniflora</i>	Tintilaya	Líquido oleoso con tintura	Agradable	Picante
<i>T. terniflora</i>	Inquisivi	Líquido oleoso con tintura	Agradable	Picante
<i>M. osteomeloides</i>	Inquisivi	Líquido oleoso	Agradable y mentolado	Picante

La tabla 12, muestra el análisis organoléptico de los aceites esenciales, resaltando el olor de *T. filifolia* que es similar al anís con sabor dulce, también se destaca *M. osteomeloides* por presentar un olor mentolado, en lo que se refiere a los demás aceites presentaban un olor agradable y un sabor picante.

4.3.1.1 **Determinación de color.**

Usando la escala de colores, se puede deducir que el aceite esencial es transparente hasta una tonalidad de amarillo. Según las soluciones de colores patrones de referencia descrita en la NB 75003.

Tabla 13. Determinación de color de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Región	Mínimo	Máximo
<i>T. filifolia</i>	Inquisivi	Solución 1	Solución 2
<i>T. filifolia</i>	Tintilaya	Solución 1	Solución 2
<i>T. mandonii</i>	Tintilaya	Solución 5	Solución 6
<i>T. terniflora</i>	Tintilaya	Solución 5	Solución 6
<i>T. terniflora</i>	Inquisivi	Solución 5	Solución 6
<i>M. osteomeloides</i>	Inquisivi	Solución 1	Solución 2

La tabla 13, muestra los resultados de color de los aceites esenciales de los géneros *Tagetes* y *Myrtaceae*, en el género de los *Tagetes* se encuentran en rango de (1-2) amarillo pálido, (5-6), para el género *Myrtaceae* se encuentra en rango (1-2) como se muestra en la figura 11. Los aceites esenciales tienen color cuando hay moléculas activas a la luz visible en el mismo. Es deseable contar con aceites en escala de 1 a 2, considerados de mejor calidad.

4.3.2 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.

4.3.2.1 pH.

Tabla 14. pH de aceites esenciales de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	pH
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	5-6
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	4-5
<i>T. Mandonii</i> (Tintilaya)	5-6
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	4-5
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	5-6
<i>M.osteomeloides</i> (Inquisivi)	5-6

En la tabla 14, se observa que el pH varía entre 4 a 6 por lo que está dentro del rango de pH de 4-6 que corresponden a un aceite de buena calidad según Aromaterapia, 2009. En la determinación de pH en aceites esenciales determinamos la actividad frente al tornasol y no así el potencial de hidrogeniones.

4.3.2.2 Miscibilidad en etanol.

Tabla 15. Determinación de miscibilidad en etanol de aceite esencial de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Alcohol etílico %
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	90%
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	90%
<i>T. mandonii</i> (Tintilaya)	85%
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	95%
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	95%
<i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	85%

Los resultados de miscibilidad, tabla 15, muestran que el aceite esencial *T. mandonii* y *M. osteomeloides* necesita menor cantidad de etanol (85%). En cambio, el aceite esencial *T. terniflora* colectadas de diferentes regiones necesita etanol del 95%. En todos los casos en esta determinación de miscibilidad se añadió 20 volúmenes. En las tres repeticiones que se realizó no se tuvo cambios, por lo tanto la desviación estándar y el coeficiente de varianza fue cero.

Este tipo de mezclas, según la especie vegetal de origen pueden estar constituidos por diferentes porcentajes de componentes cuyos grupos funcionales correspondan a los alcoholes, aldehídos (mas solubles en agua) y de ésteres, éteres, hidrocarburos (solubles en compuestos apolares), los que determinaran su grado de miscibilidad en mezclas hidroetanólicas (Arraiza, 2009).

4.3.2.3 Densidad relativa

Tabla 16. Determinación de densidad (20°C) de aceite esencial del genero *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Promedio (g/cm ³)	Desviación estándar	% C.V.	Expresión de resultado
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	1,0761	0,0048	0,40	1,0761±0,0048
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	1,0511	0,0022	0,21	1,0511±0,0022
<i>T. mandonii</i> (Tintilaya)	0,9313	0,0002	0,02	0,9313±0,0002
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	0,9548	0,0028	0,30	0,9548±0,0028
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	0,9685	0,0007	0,07	0,9685±0,0007
<i>M.osteomeloides</i> (Inquisivi)	0,9204	0,0008	0,08	0,9204±0,0008

En la tabla 16, se puede observar que las densidades varían según la región de recolección desde 0,9204 a 1,0761(g/cm³), por ejemplo en *T. terniflora* recolectado de Inquisivi es mayor con respecto a la recolección en Tintilaya.

Según Guenther (1948), la densidad de los aceites volátiles, varía entre 0,84 y 1,2 g/cm³. Por otra parte aquellos que tienen densidades mayores de 1 g/cm³, contienen principalmente fenoles, derivados fenólicos o ciertos esteres, entonces observando en la tabla la densidad de *T. filifolia* es 1,0761 g/cm³ de la recolección de Inquisivi y 1,0511 g/cm³ de la región de Tintilaya y según el autor podemos indicar que este aceite contiene fenoles, derivados de fenoles o esteres.

La densidad de un aceite esencial está influenciado por factores como la madurez de la planta de la cual se obtuvo, por el método de extracción, purificación, y la edad del aceite.

4.3.2.4 Índice de acidez.

Tabla 17. Determinación de índice de acidez de aceite esencial en los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Promedio índice de acidez	Desviación estándar	% C.V.	Expresión de resultado
<i>T. filifolia (Inquisivi)</i>	0,78	0,08	10,18	0,78±0,08
<i>T. filifolia (Tintilaya)</i>	0,59	0,08	13,32	0,59± 0,08
<i>T. Mandonii (Tintilaya)</i>	0,78	0,08	10,18	0,78± 0,08
<i>T. terniflora (Tintilaya)</i>	0,71	0,10	14,48	0,71±0,10
<i>T. terniflora (Inquisivi)</i>	1,20	0,16	13,32	1,20± 0,16
<i>M. osteomeloides (Inquisivi)</i>	1,47	0,16	10,82	1,47± 0,16

La tabla 17, indica el índice de acidez de los aceites esenciales de los géneros *Tagetes* y *Myrtaceae*, un dato que resalta es *T. terniflora* y *T. filifolia* en recolección de Inquisivi frente al de Tintilaya tienen un índice de acidez mayor en ambos casos. Por lo que se debe tener mayor cuidado en su conservación con los aceites esenciales de bajo índice de acidez, mientras que en *M. osteomeloides* como tiene mayor índice de acidez tiene mayor tiempo de vida útil.

Según Dominguez (1988), la acidez de los aceites esenciales está influenciada por la presencia de ácidos orgánicos (libres) de cadena corta que pueden volatilizarse fácilmente y ser solubles en la mezcla del aceite esencial, entonces lo que se realizó con esta prueba es neutralizar los ácidos orgánicos del aceite esencial.

4.3.2.5 Índice de refracción.

Tabla 18. Determinación de índice de refracción de aceite esencial de los géneros *Tagetes* y *Myrcianthes*

Aceite esencial	Promedio índice de refracción	Desviación estándar	% C.V.	Expresión de resultado
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	1,5550	6×10^{-5}	0,004	$1,5550 \pm 6 \times 10^{-5}$
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	1,5531	5×10^{-4}	0,03	$1,5531 \pm 5 \times 10^{-4}$
<i>T. Mandonii</i> (Tintilaya)	1,4806	6×10^{-5}	0,004	$1,4806 \pm 6 \times 10^{-5}$
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	1,4739	3×10^{-4}	0,02	$1,4739 \pm 3 \times 10^{-4}$
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	1,4916	5×10^{-5}	0,004	$1,4916 \pm 5 \times 10^{-5}$
<i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	1,4636	6×10^{-5}	0,004	$1,4636 \pm 6 \times 10^{-5}$

La tabla 18, indica que el índice de refracción se encuentra entre los valores de 1,4636 y 1,5550. En el caso de *T. filifolia* es preciso los valores (1,5550 y 1,5531) de índice de refracción recolectadas en la región de Inquisivi y Tintilaya respectivamente. De igual manera para *T. terniflora* los valores se acercan entre sí (1,4739 y 1,4916), a pesar que fueron recolectadas de diferentes regiones.

Según Dominguez (1988), el índice de refracción no varía mucho en los diferentes aceites esenciales, los valores oscilan entre 1,46 y 1,61 a 20 °C, los índices de refracción menores de 1,47, poseen un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Por el contrario, un índice de refracción mayor a 1,47 indica la posible presencia de compuestos alifáticos oxigenados. Para los casos de *T. filifolia*, *T. mandonii* y *T. terniflora* tienen un valor mayor a 1,47 entonces se presume que existe presencia de compuestos alifáticos oxigenado, para el caso de *M. osteomeloides* se presume que existe un porcentaje elevado de hidrocarburos terpénicos. El índice de refracción de un aceite esencial es igual a la fracción molar de cada componente multiplicado por su respectivo índice de refracción; resultado que es definido por el componente mayoritario. Delgado (2016).

4.3.2.6 Poder rotatorio.

Tabla 19. Determinación de actividad óptica de aceite esencial de los géneros Tagetes y Myrcianthes

Aceite esencial	Actividad óptica	Desviación estándar	%C.V.	Expresión de resultados
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	+1,4	0,02	1,25	+ 1,4 ± 0,02
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	+1,3	0,01	0,89	+ 1,3 ± 0,01
<i>T. Mandonii</i> (Tintilaya)	+4,8	0,28	5,97	+ 4,8 ± 0,28
<i>T. terniflora</i> (Tintilaya)	+3,3	0,25	7,78	+3,3 ± 0,25
<i>T. terniflora</i> (Inquisivi)	+4,1	0,15	3,69	+ 4,1 ± 0,15
<i>M. osteomeloides</i> (Inquisivi)	+4,9	0,11	2,34	+ 4,9 ± 0,11

En la tabla 19, se observa la actividad óptica de aceites esenciales de los géneros Tagetes y Myrcianthes predominando componentes mayoritarios dextrógiros (+).

Para el caso de *T. filifolia* no tiene cambios numéricamente relevantes el valor de actividad óptica de ambas regiones de recolección; en *T. terniflora* se incrementa relativamente la actividad óptica recolectada en Tintilaya con respecto a la recolección de Inquisivi. La actividad óptica refleja la identidad del aceite esencial evaluada.

Tabla 20. Resumen de propiedades fisicoquímicas de aceites esenciales de los géneros de *Tagetes* y *Myrtaceae*

Especie	pH	Miscibilidad en etanol	Densidad (g/cm ³)	Índice de acidez	Índice de refracción	Poder Rotatorio
<i>T. filifolia</i> (Inquisivi)	5-6	90%	1,0761±0,0048	0,78±0,08	1,5550± 6x10 ⁻⁵	+ 1,4 ± 0,02
<i>T. filifolia</i> (Tintilaya)	4-5	90%	1,0511±0,0022	0,59± 0,08	1,5531± 5x10 ⁻⁴	+ 1,3 ± 0,01
<i>T.Mandonii</i> (Tintilaya)	5-6	85%	0,9313±0,0002	0,78± 0,08	1,4806± 6x10 ⁻⁵	+ 4,8 ±0,28
<i>T.terniflora</i> (Tintilaya)	4-5	95%	0,9548±0,0028	0,71±0,10	1,4739± 3x10 ⁻⁴	+3,3 ± 0,25
<i>T.terniflora</i> (Inquisivi)	5-6	95%	0,9685±0,0007	1,20± 0,16	1,4916± 5x10 ⁻⁵	+ 4,1 ± 0,15
<i>M.osteomeloides</i> (Inquisivi)	5-6	85%	0,9204±0,0008	1,47± 0,16	1,4636± 6x10 ⁻⁵	+ 4,9 ± 0,11

En la tabla 20, se tiene un resumen de las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales de los géneros *Tagetes* y *Myrtaceae*, observamos un pH ligeramente ácido para todas las especies, tenemos una densidad baja de 0,9204 en la especie de *M. osteomeloides* y una densidad superior a uno en el caso de *T. filifolia*, se observa también un índice de acidez elevado en la especie de *M. osteomeloides* por el contrario ocurre con la especie de *T. filifolia* proveniente de Tintilaya, en el índice de acidez no se tiene cambios numéricamente relevantes abarcan entre 1,4636 y 1,555, finalmente del poder rotatorio para todos los casos se las moléculas se comportan de manera dextrógira.

4.3.3 Espectroscopia UV – Visible.

El análisis por el método espectrométrico de un aceite esencial constituido por una mezcla de compuestos puede ser utilizado para obtener una posible composición de ella y asumir la ausencia o presencia de un grupo funcional.

4.3.3.1 Espectroscopia UV – Vis en aceites esenciales

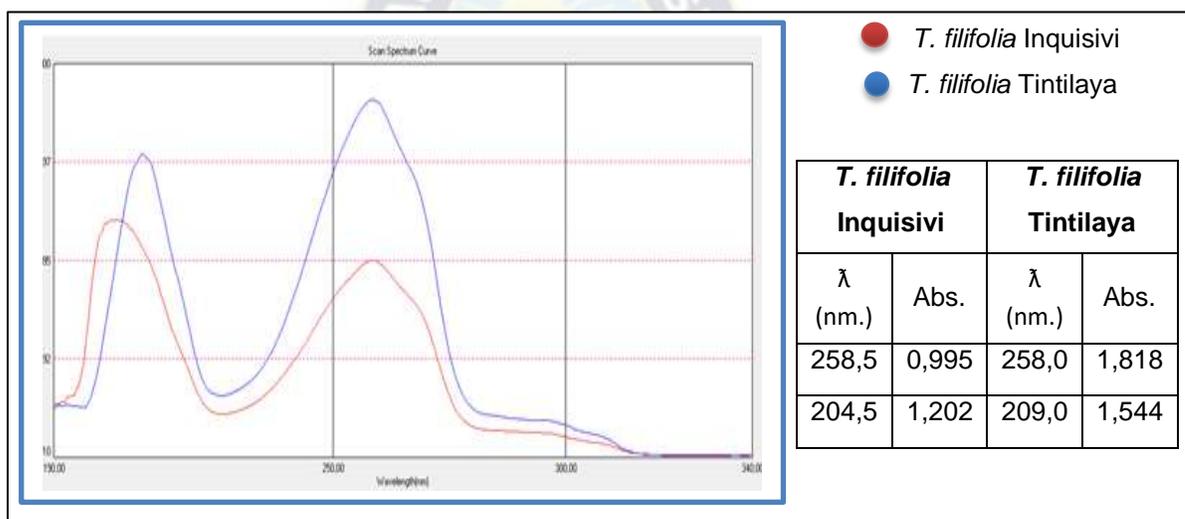


Figura 25. Barrido espectral *T. filifolia*

En la figura 25, se observa señal de actividad de la especie de *T. filifolia* recolectada de la región de Inquisivi y Tintilaya de concentraciones de 1/210000 y 1/640000 en etanol formando el pico a 258,5 y 258,0 nm, respectivamente.

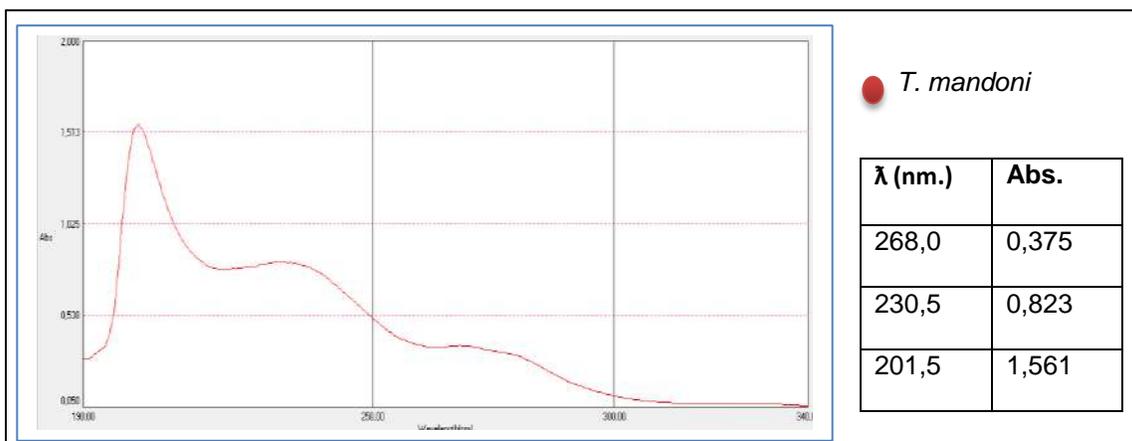


Figura 26. Barrido espectral *T. mandonii*

En la figura 26, se observa señal de actividad de la especie de *T. mandonii* recolectada de la región de Tintilaya. Se trabajó con una dilución 1/32000 en etanol y se observa dos picos el primero a 268,0 nm y el segundo a 230,50 nm.

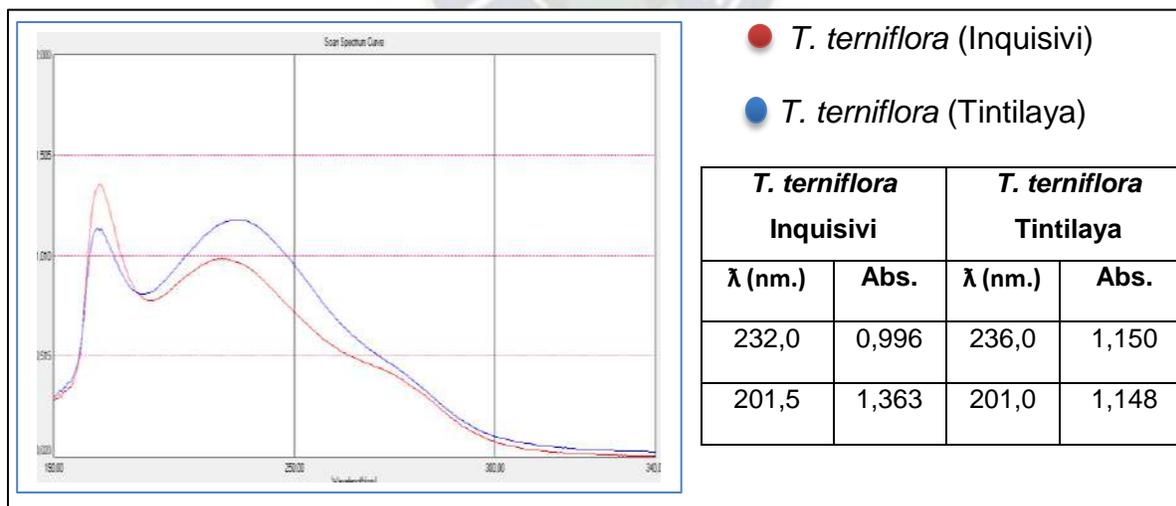


Figura 27. Barrido espectral *T. terniflora*

En la figura 27, se observa señal de actividad de la especie de *T. terniflora* recolectada de la región de Inquisivi y Tintilaya cuyas concentraciones fueron de 1/32000 y 1/80000 en etanol formando los picos: el primero de 232,0 y 236,0 nm, respectivamente.

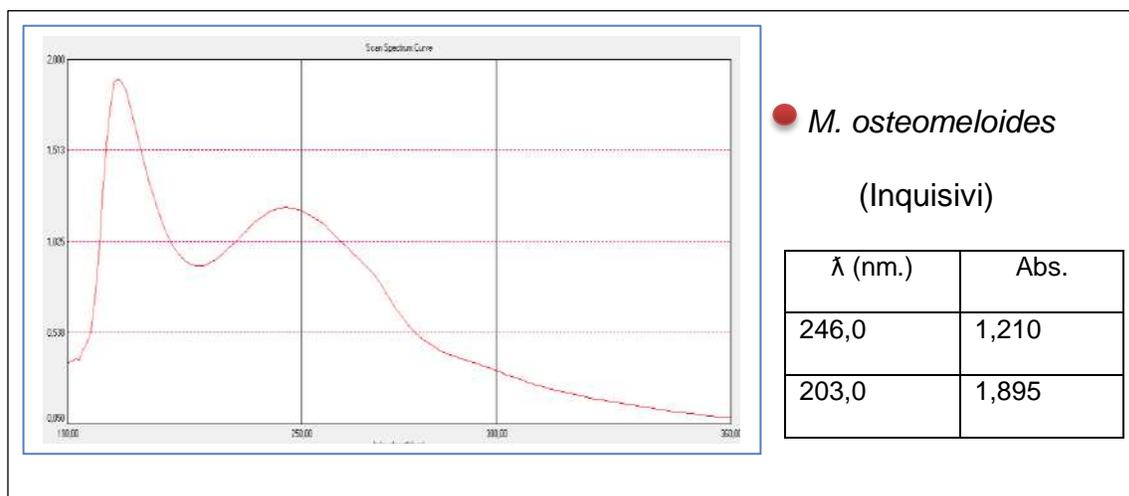


Figura 28. Barrido espectral *M. osteomeloides* (Inquisivi)

En la figura 28, se observa señal de actividad de la especie de *M. osteomeloides* recolectada de la región de Inquisivi, a una dilución 1/8000 en etanol, formando un pico a 246 nm.

Según Lock (1988), indica que entre longitudes de onda de 202 y 210 nm existe presencia de compuestos saturados, entre 215 y 250 nm indica la presencia de compuestos insaturados y entre 250 y 270 nm de hidrocarburos aromáticos.

Para *T. filifolia* se indica la presencia en los primeros picos de hidrocarburos aromáticos.

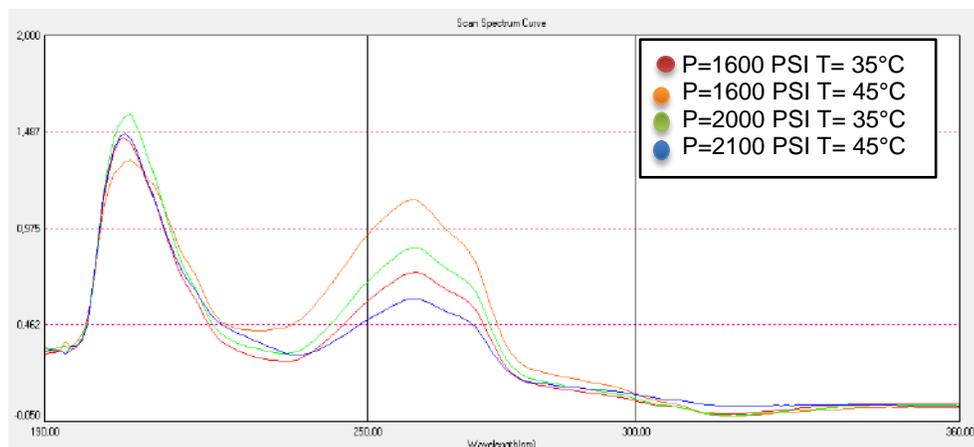
Para *T. mandonii* el primer pico indica la presencia de hidrocarburos aromáticos y en el segundo pico indica la presencia de compuestos insaturados.

Para *T. terniflora* indica la presencia de compuestos insaturados.

Finalmente *M. osteomeloides* identificaríamos la presencia de compuestos insaturados

4.3.3.2 Espectroscopia de UV – Vis en extractos por Fluidos

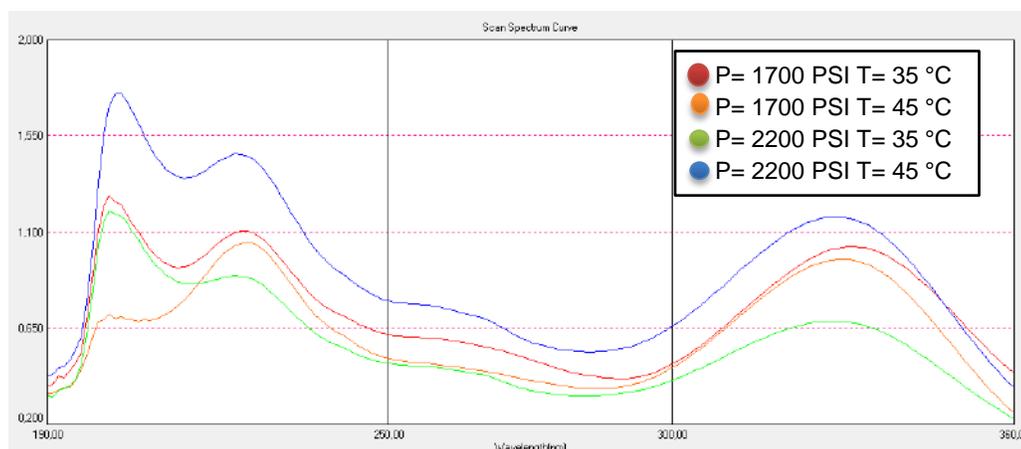
Supercríticos.



Compuestos Abs.	P=1600 PSI T=35°C	P=2000 PSI T=35°C	P=1600 PSI T=45°C	P=2100 PSI T=45°C
Aromáticos (250-270nm.)	0,742	0,874	1,128	0,600
Saturados (202-210nm.)	1,455	1,585	1,339	1,480

Figura 29. Barrido espectral de *T. filifolia* por método FSC

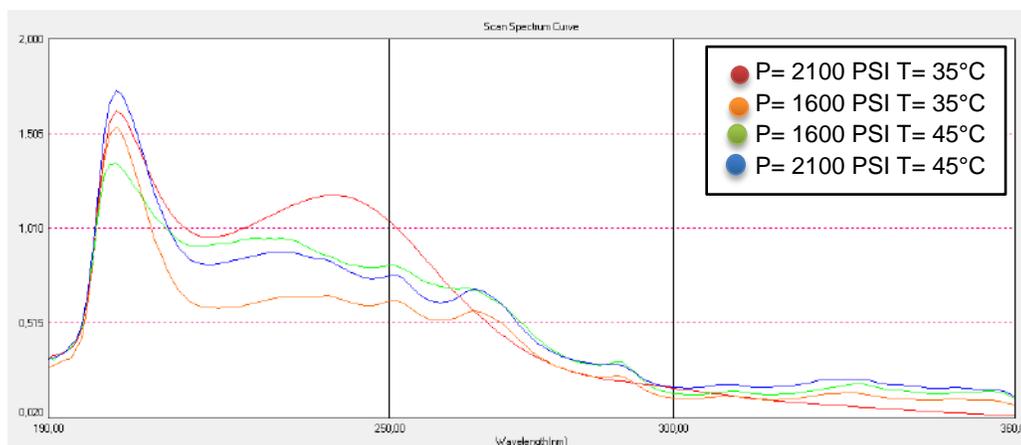
En la figura 29, se observa señales de actividad de la especie de *T. filifolia* trabajado mediante el método de fluidos supercríticos, variando la presión y la temperatura, la absorbancia es diferente para cada extracción; resalta en la figura 28, la presión de 1600 PSI y una temperatura de 45 °C se encuentra la mayor absorbancia entre las demás extracciones.



Compuestos Abs.	P=1700 PSI T=35°C	P=1700 PSI T=45°C	P=2200 PSI T=35°C	P=2200 PSI T=45°C
Saturados (202-210nm)	1,269	0,703	1,199	1,752
Insaturados (215-250nm)	1,014	1,051	0,896	1,462
Aromáticos (250-270nm)	1,032	0,972	0,683	1,172

Figura 30. Barrido espectral de *T. mandonii* por método FSC.

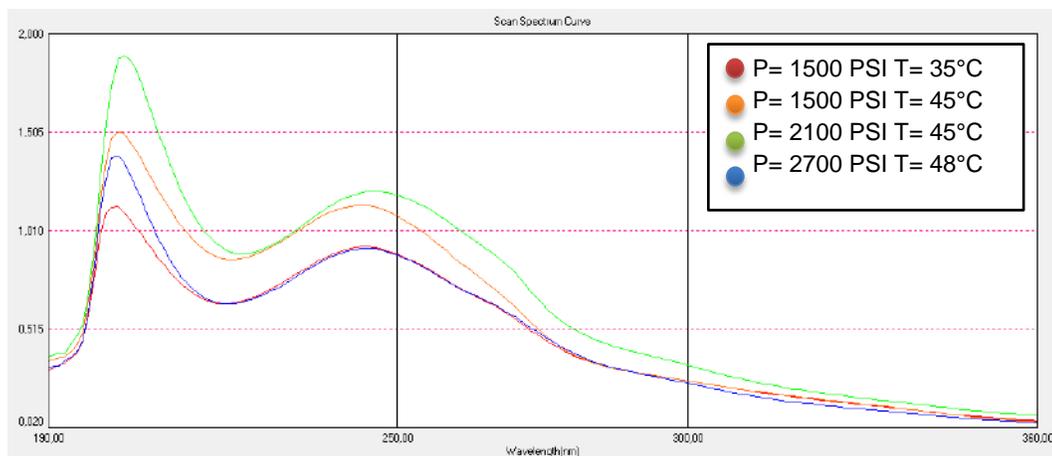
En la figura 30, se observa señales de actividad de la especie de *T. mandonii* trabajado mediante el método de fluidos supercríticos, observamos que la absorbancia es diferente para cada condición de extracción, por ejemplo a una presión de 2200 PSI y 35 °C es baja la absorbancia en compuestos insaturados y a 1700 PSI y 45 °C la absorbancia en compuestos saturados es baja en relación a las demás.



Compuestos Abs.	P=2100 PSI T=35°C	P=1600 PSI T=35°C	P=1600 PSI T=45°C	P=2100 PSI T=45°C
Saturados (202-210nm)	1,625	1,539	1,348	1,731
Insaturados (215-250nm)	1,185	0,660	0,961	0,887
Aromáticos (250-270nm)	-----	0,150	0,197	0,225

Figura 31. Barridos espectrales de *T. terniflora* por método FSC

En la figura 31, se observa las señales de actividad de la especie de *T. terniflora* trabajado mediante el método de fluidos supercríticos, a una presión de 2100 PSI y 35 °C existe una mayor absorbancia en la región de compuestos insaturados.



Compuestos	P=1500 PSI T=35°C	P=1500 PSI T=45°C	P=2100 PSI T=45°C	P=2700PSI T=48°C
Saturados (202-210nm)	1,131	1,507	1,895	1,387
Insaturados (215-250nm)	0,928	1,140	1,210	0,921

Figura 32. Barridos espectrales de *M. osteomeloides* por método FSC

En la figura 32, se observa señales de actividad de la especie de *M. osteomeloides* trabajado por el método de fluidos supercríticos, variando la presión y la temperatura, en cada extracción las condiciones fueron diferentes por ejemplo a una presión de 1500 PSI y 35 °C, entre 2700 PSI y 48 °C tiene similar absorbancia, presencia de compuestos saturados.

Según Lock (1988), podemos identificar los compuestos presentes en cada especie: *T. filifolia* existe la presencia de compuestos aromáticos por fluidos supercríticos y en la extracción por arrastre de vapor. *T. mandonii* existe presencia de compuestos insaturados y aromáticos mediante las extracciones de fluidos supercríticos y arrastre de vapor. *T. terniflora* existe la presencia de compuestos insaturados y aromáticos pero por

arrastre de vapor no se encuentra compuestos aromáticos. *M. osteomeloides* se identificó presencia de compuestos saturados e insaturados por el método de fluidos supercríticos.

4.3.4 Cromatografía en capa fina.

Los análisis realizados por cromatografía en capa fina nos muestra la composición química de manera cualitativa de los aceites esenciales. Teniendo una fase estacionaria y una fase móvil, con un revelador que nos permitirá observar la composición del aceite esencial reflejado como fracciones.

4.3.4.1 Cromatografía en capa fina de los aceites esenciales obtenido por el método de arrastre de vapor

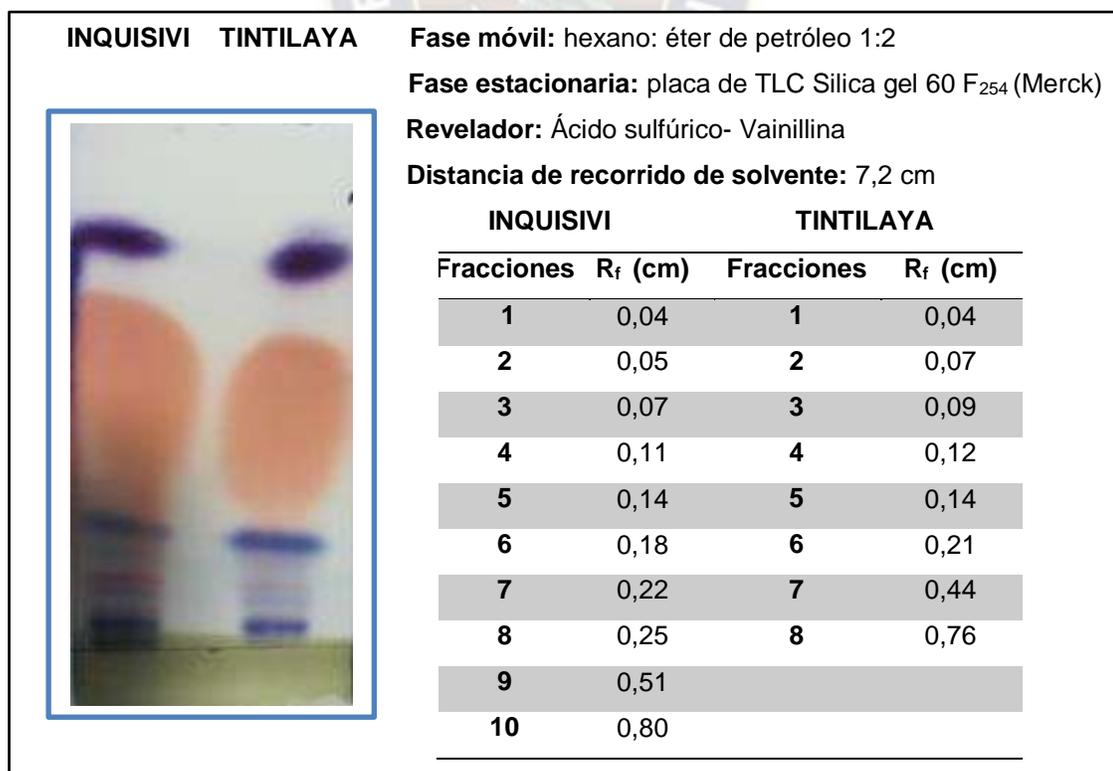


Figura 33. Cromatografía en capa fina *T. filifolia*

En la figura 33, se puede observar las fracciones presentes en *T. filifolia*, proveniente de Inquisivi y Tintilaya se muestra a 10 componentes y 8 componentes respectivamente, para ambos casos se ve a simple vista el componente mayoritario.

En relación con la densidad para esta especie indicaba la presencia de fenoles, derivados de fenoles por tener una densidad mayor a 1, entonces podemos asumir que el mayor componente son fenoles.

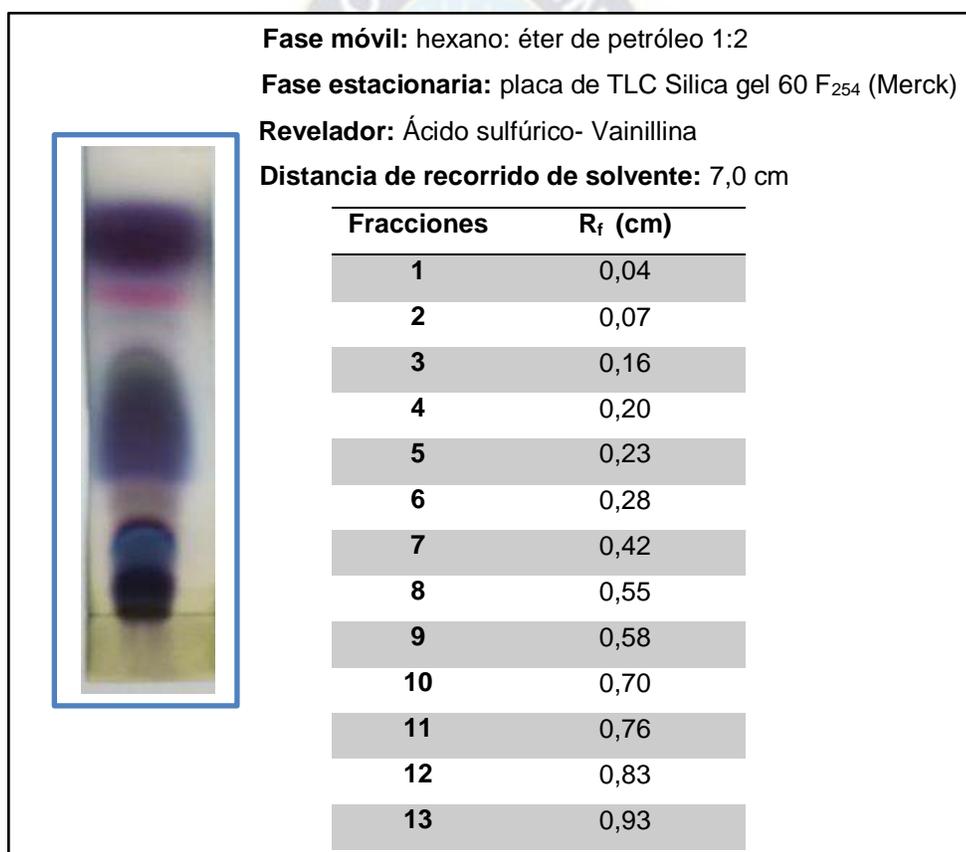


Figura 34. Cromatografía en capa fina *T. mandonii*

En la figura 34, se puede observar las fracciones en *T. mandonii* proveniente de Tintilaya, con 13 componentes en la mezcla.

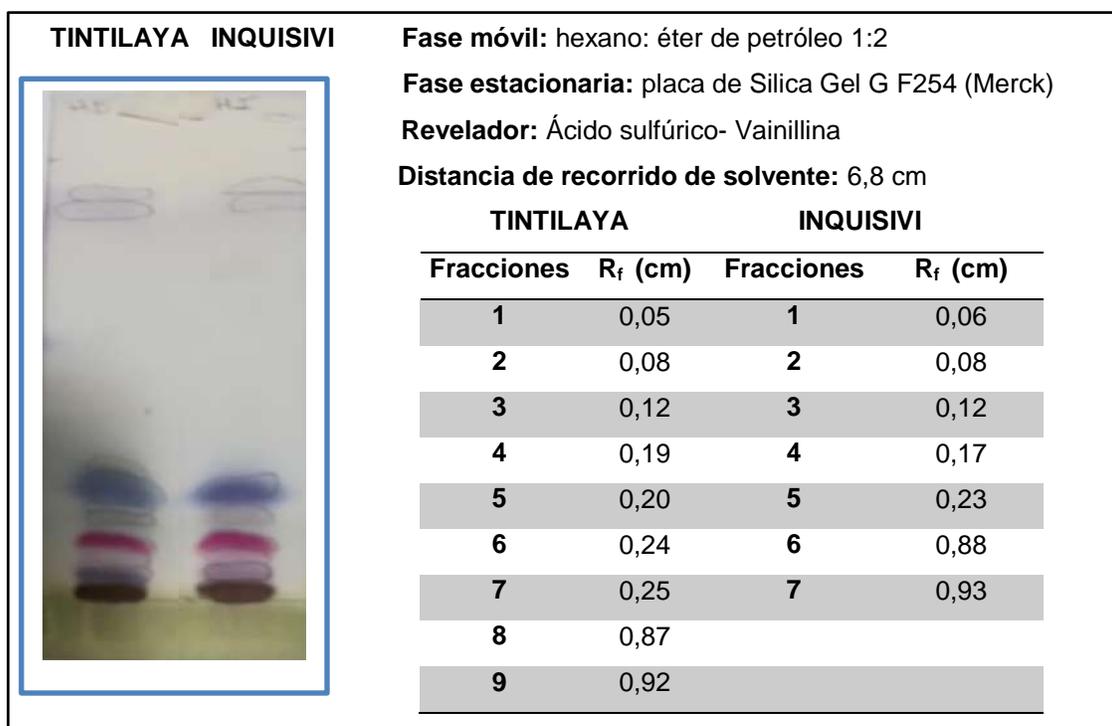


Figura 35. Cromatografía en capa fina *T. terniflora*

En la figura 35, se puede observar las fracciones presentes en *T. terniflora* proveniente de Tintilaya e Inquisivi, con 9 y 7 componentes respectivamente.

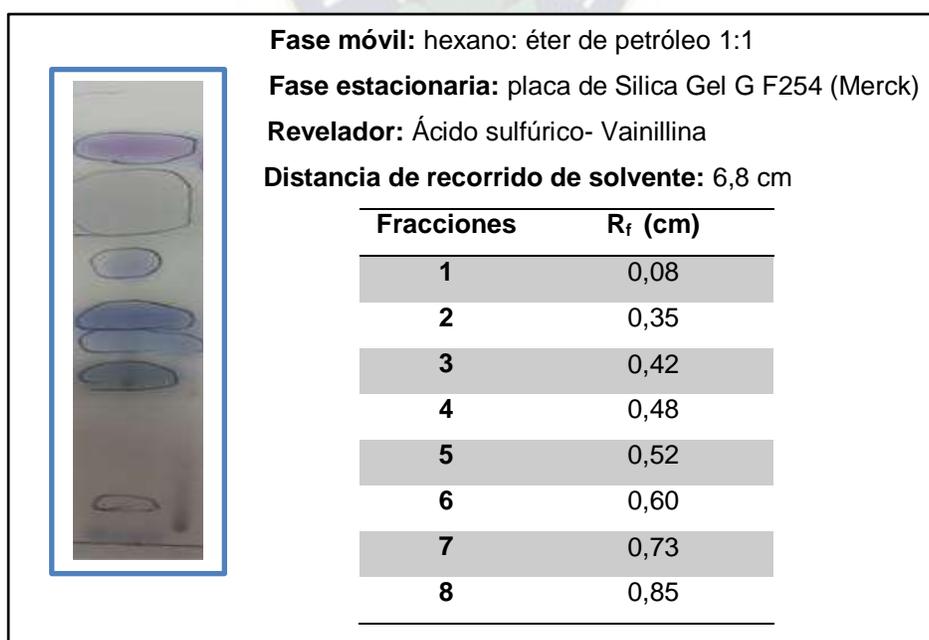


Figura 36. Cromatografía en capa fina *M. osteomeloides* (Inquisivi)

En la figura 36, se puede observar fracciones de *M. osteomeloides* proveniente de Inquisivi, con 6 componentes en la mezcla.

4.3.4.2 Cromatografía en capa fina de aceite esencial obtenido por el método de fluidos supercríticos.

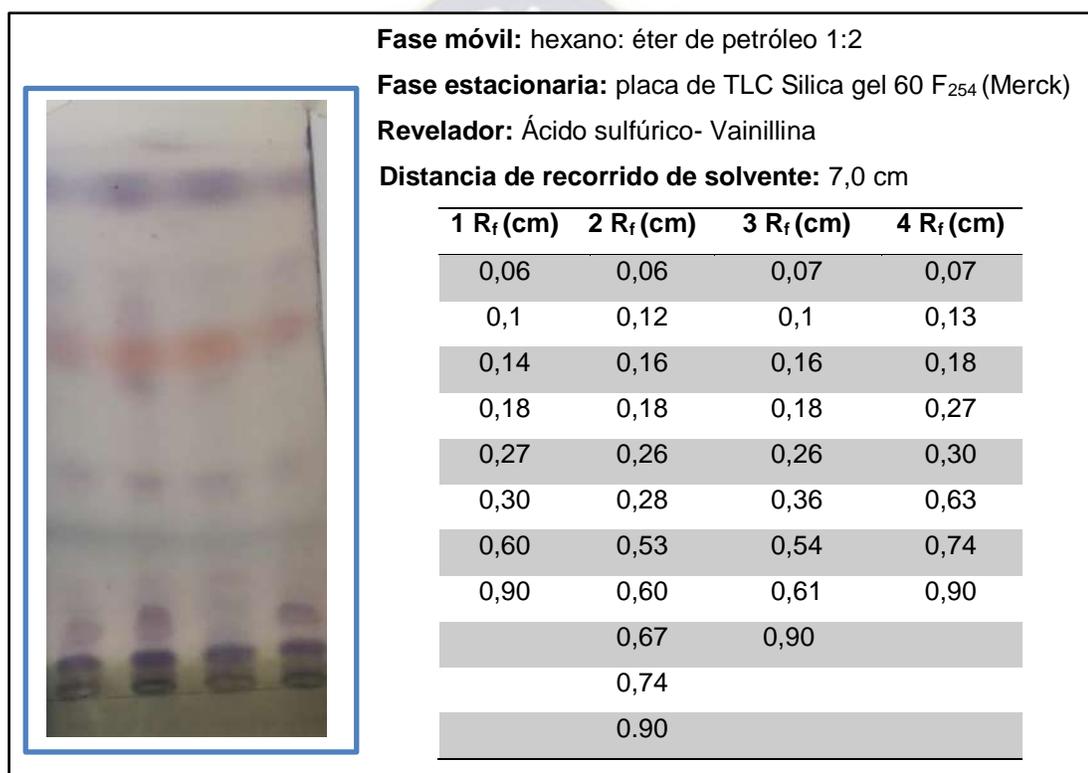


Figura 37. Cromatografía en capa fina de *T. filifolia* extraído por FSC

En la figura 37, se aprecia las fracciones de las 4 extracciones realizadas a diferentes presiones y temperaturas, podemos observar en el segundo revelado en condiciones de 2000 PSI y 35 °C existe mayor componentes frente a las demás.

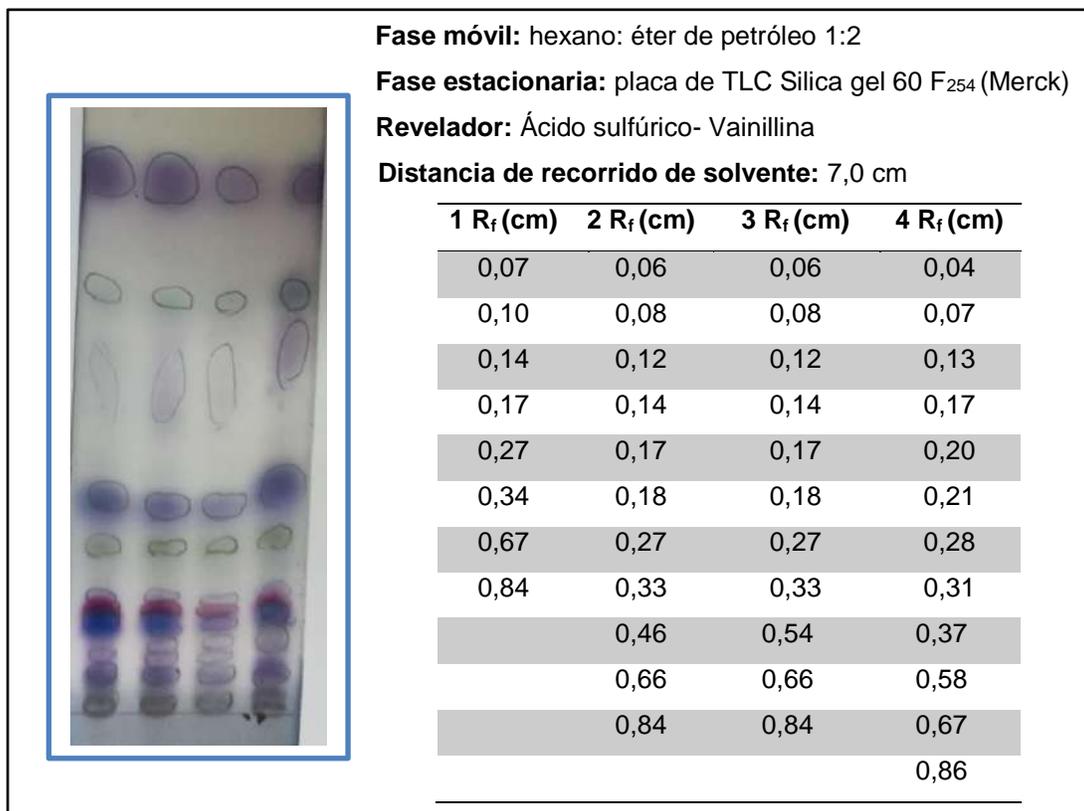


Figura 38. Cromatografía en capa fina de *T. mandonii* extraído por FSC

En la figura 38, se aprecia las fracciones de las 4 extracciones realizadas a diferentes presiones y temperaturas, podemos observar en el cuarto revelado en condiciones de 2200 PSI y 35 °C existe mayor componentes frente a las demás.

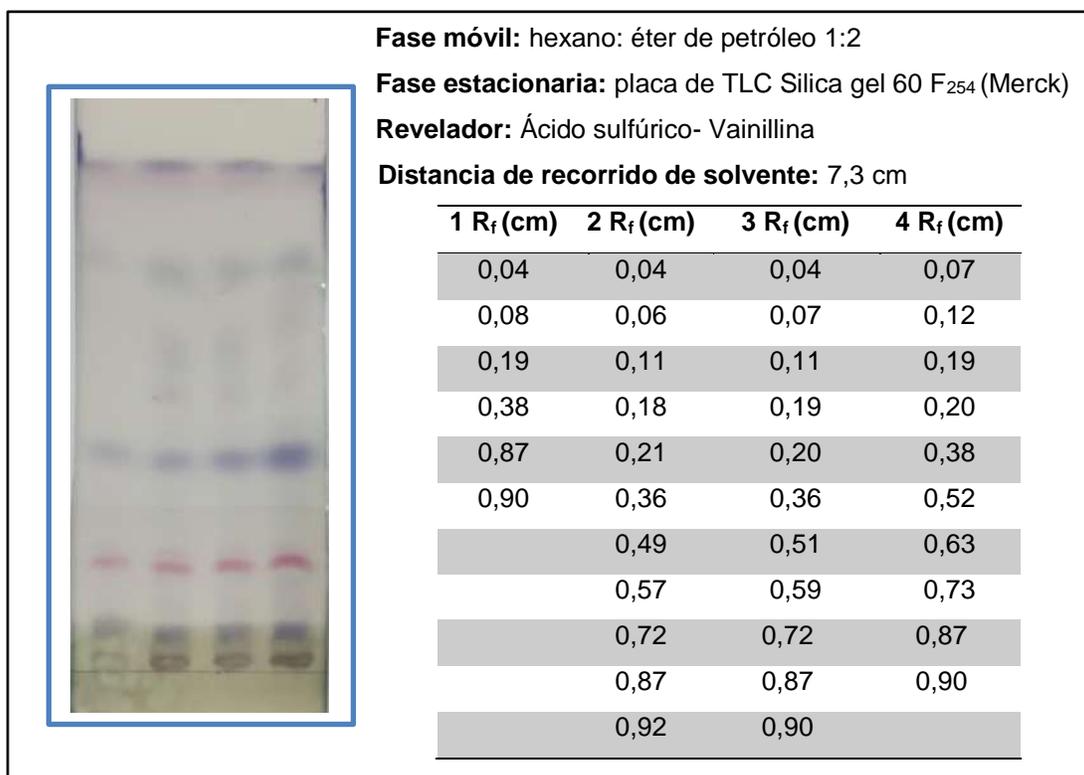


Figura 39. Cromatografía en capa fina de *T. terniflora* extraído por FSC

En la figura 39, se aprecia las fracciones de las 4 extracciones realizadas a diferentes presiones y temperaturas, podemos observar en el segundo y tercer revelado existe mayor componentes frente a las demás.

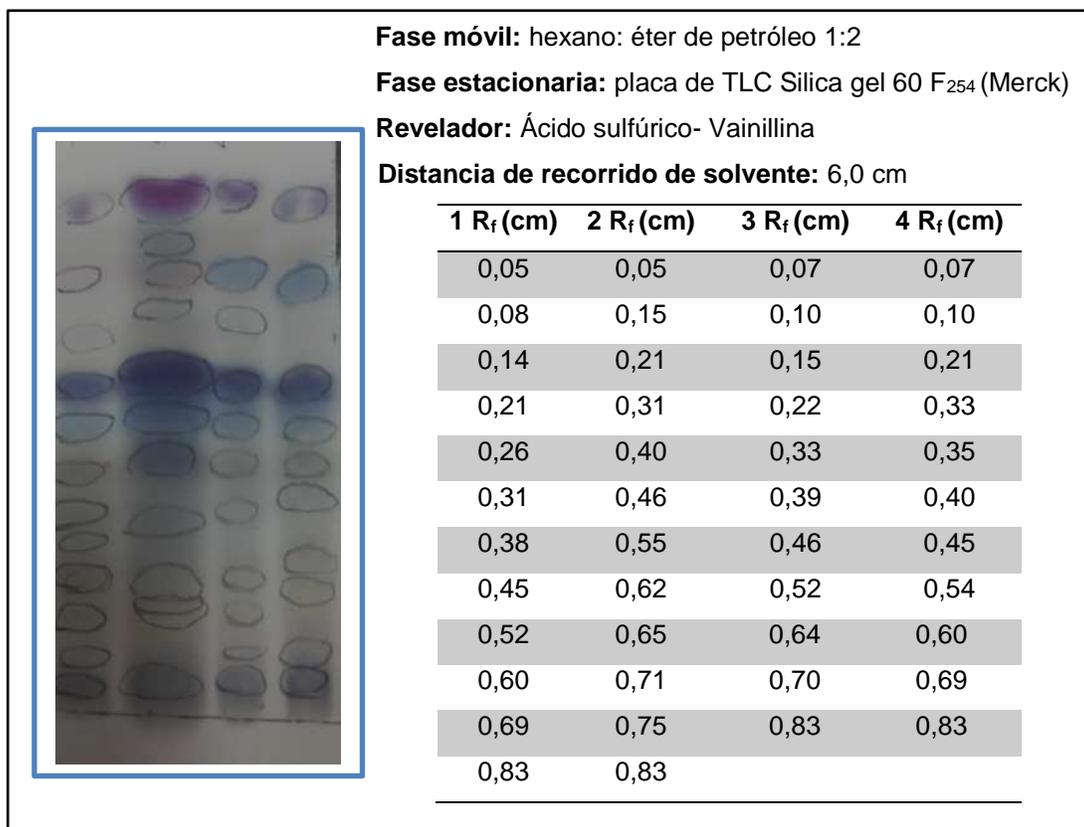


Figura 40. Cromatografía en capa fina de *M. osteomeloides* extraído por FSC

En la figura 40, se aprecia las fracciones de las 4 extracciones realizadas a diferentes presiones y temperaturas, podemos observar en el primer y segundo revelado existe mayor componentes frente a las demás.

4.3.5 Espectroscopia Infrarroja

El análisis de los aceites esenciales en el espectro infrarrojo fueron determinados sobre la base de las cinco zonas de análisis en el espectro infrarrojo mediano (4000 600 cm⁻¹).

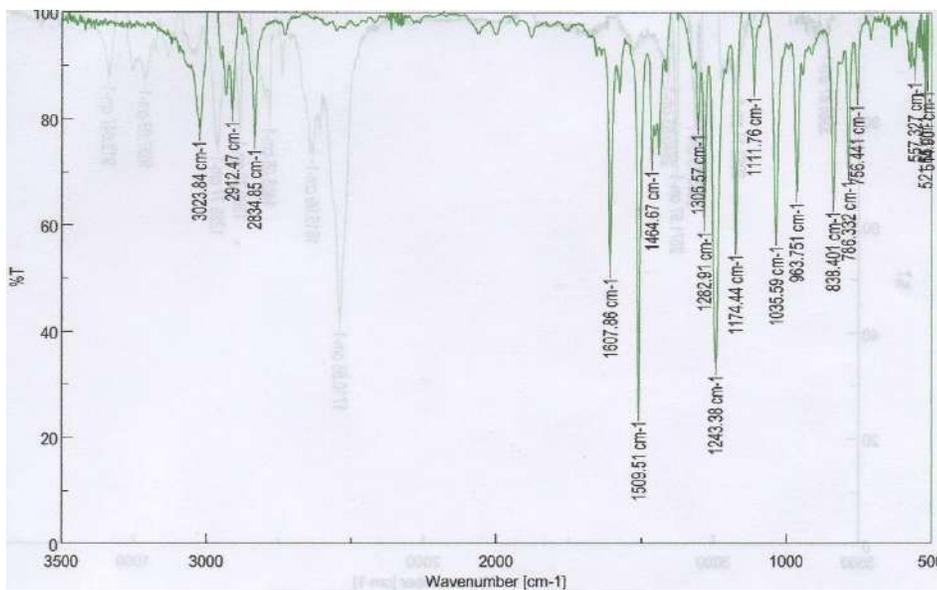


Figura 41. Espectrograma de IR de aceite esencial

En la figura 41, podemos observar el espectrograma de aceite esencial, este se divide en la región de grupo funcional y la huella dactilar, y se subdivide por 5 zonas de grupo, para determinados números de onda, todos los espectros son propios para cada especie.

Tabla 21. Identificación de los grupos funcionales en las zonas de grupo

Especie	<i>T. filifolia</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. mandonii</i>	<i>T.terniflora</i>	<i>T.terniflora</i>	<i>M.osteomeolides</i>
Grupo	Inquisivi	Tintilaya	Tintilaya	Tintilaya	Inquisivi	Inquisivi
Zona 1						Alcohol (O-H)
Zona 2	Alcano (sp ³ C-H)	Alcano (sp ³ C-H)	Alcano (sp ³ C-H)	Aryl, vinyl (C-H)	Aryl, vinyl (C-H)	Alcano (sp ³ C-H)
	Aldehído (sp ² C-H)	Aldehído (sp ² C-H)	Ac. carboxílico (O-H)	Aldehído (sp ² C-H)	Aldehído (sp ² C-H)	Alcano (sp ³ C-H)
Zona 3						
Zona 4			Cetona(C=O)	Aryl cetona (C=O)	Aryl cetona (C=O)	Aldehído (C=O)

			Enone (C=C-C=O)	Enone (C=C-C=O)	
Zona 5	Alqueno (C=C)	Alqueno (C=C)	Alqueno (C=C)	Alqueno (C=C)	Alqueno (C=C)

En la tabla 21, muestra a los grupos funcionales representativos en las 5 zonas de cada especie, observamos en la zona 3 que no se identificó a ningún grupo funcional en ninguna especie, en la mayoría de las especies muestra los grupos funcionales como alcanos, aldehídos y alquenos.

En la especie *T. filifolia* procedentes de las regiones de Inquisivi y Tintilaya, se tiene los grupos funcionales como: alcano (sp³ C-H), aldehído (sp² C-H) (Zona 2); alquenos (C=C) (Zona 5); ambos muestran similar perfil, pero varía en la intensidad y forma de los valles (ancho, dobles, etc.).

La especie *T. mandonii* procedente de Tintilaya, se tiene los grupos funcionales como: alcano (sp³ C-H), Ac. Carboxílico (O-H) (Zona 2); cetona (C=O) (Zona 4); son los más representativos y que se puede ver a simple vista en el espectro.

En la especie *T. terniflora* procedente de las regiones de Inquisivi y Tintilaya, tienen los grupos funcionales como: Aryl, vinyl (C-H), Aldehído (sp² C-H) y Alcano (sp³ C-H) este último identificado solo en la recolección de Sorata, en zona 2 ; Aryl cetona (C=O) enone (C=C-C=O) en la zona 4 y alquenos (C=C) en la zona 5; en la recolección de ambas regiones varía la presencia de alcano proveniente de Tintilaya, de ambas regiones muestran similar perfil, pero varía en la intensidad y forma de los valles.

Finalmente en la especie de *M. osteomeloides* procedente de Inquisivi, las señales más representativas son: Alcohol (O-H) en la zona 1, Alcano (sp³ C-H) en la zona 2,

Aldehído (C=O) en la zona 4 y Alqueno (C=C) en la zona 5, es la única especie que muestra un grupo en la zona 1.

4.3.6 Cromatografía de gases acoplada a masas

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas es común para el análisis de aceites esenciales, ya que este permite separar a la mezcla compleja en sus respectivos componentes hasta culminar en el detector de masas con la definición de estructura.

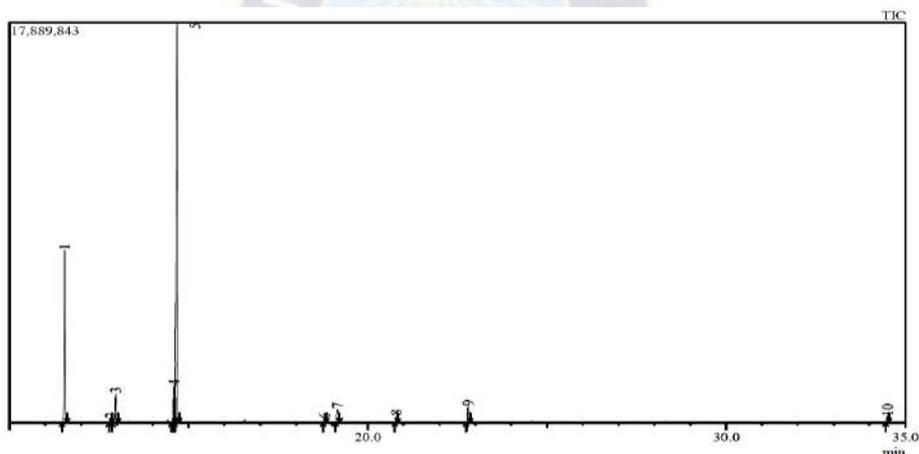


Figura 42. Cromatograma de gases

En la figura 42, observamos en el cromatograma la separación de los componentes de una mezcla, de aceites esenciales, donde la separación fue en 10 fracciones, con la ayuda de acoplamiento de masas podremos identificar cada uno de estas fracciones.

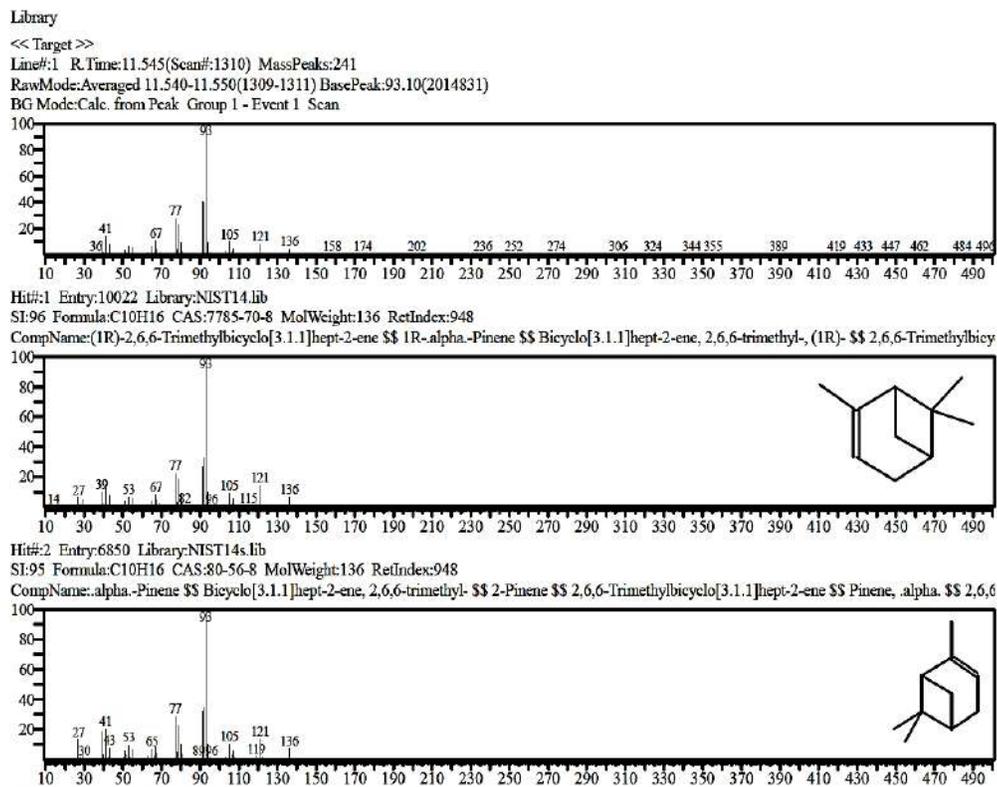


Figura 43. Comparación del espectro de alfa pineno con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas

En la figura 43, observamos el procedimiento de determinación estructural de un pico por comparación con los espectros de la biblioteca del espectrómetro de masas. Determinándose que corresponde al alfa-pineno por la mayor similitud del perfil práctico del espectro de ionización con el espectro de ionización del alfa –pineno (99%).

Tabla 22. Composición de aceite esencial de *T. filifolia*

Componentes	Composición <i>T. filifolia</i> %	
	Inquisivi	Tintilaya
Anetol	92.11	88.85
Estragol	3.50	8.97
8- isopropil 1-1- metil – 5- metileno	0.85	-----
Anis aldehído	0.79	0.21
α - farnaseno	0.65	0.57
2- propanona	0.45	-----
β -farneseno	0.10	-----
Transtagetona	-----	0.26
Germacreno	-----	0.67
Dihidrotagetona	-----	0.47

La tabla 22, muestra los resultados de separación e identificación del aceite *T. filifolia* provenientes de las regiones de Inquisivi y Tintilaya (Anexos 9 y 10), en ambos casos muestra como componente mayoritario al anetol (Anexo 11) responsable de aroma, seguido por estragol que en Tintilaya se tiene mayor porcentaje de presencia, anis aldehído en mayor porcentaje en la recolección de Inquisivi.

Según los estudios realizados anteriormente, se tiene los siguientes componentes principales en *T. filifolia* determinados por CG-MS: Serrato (2015) México identificó al componente mayoritario anetol, Maestri (1991) en Argentina identificó anetol (68,1%) y estragol (29,5%). Serrato (2008) México identificaron: 4-alilanol y trans-anetol y alilanol. En el presente trabajo identificamos al anetol, observamos que coincidimos con

todos los investigadores, estragol, coincide con el estudio de Argentina, los demás componentes que tenemos en la tabla no se identifica por los demás investigadores debido a que se encuentran en porcentaje bajo.

Tabla 23. Composición de aceite esencial de *T. mandonii*.

Componentes	Composición <i>T. mandonii</i> %	
	Tintilaya	
Dihidro tagetona	48.59	
Limoneno	21.73	
Trans- β - ocimeno	11.84	
Cis tagetona	3.15	
Cariofileno	1.02	
Butanona	5.8	
α - pineno	0.28	

La tabla 23, muestra los resultados de separación e identificación del aceite *T. mandonii* (Anexo 12) proveniente de Tintilaya, muestra como componente mayoritario di hidro tagetona (Anexo 13), seguido por limoneno, también resaltan trans $-\beta$ - ocimeno y cis tagetona (característico de este género).

Según Senatore (1999), en México identificaron por CG-MS los siguientes compuestos: trans-ocimeno (15.2%), cantidades apreciables de ocimenones (12.9%), tagetones (12,5%) y limoneno (7,9%). En nuestro estudio se identificó a trans ocimeno, cis y dy hidro tagetona y limoneno.

Tabla 24. Componentes de aceite esencial de *T. terniflora*

Componentes	Composición <i>T. terniflora</i> %	
	Inquisivi	Tintilaya
Di hidro tagetona	31.86	79.91
Cis tagetona	7.98	2.63
Ácido ciclopentanocarboxilato	2.52	0.95
Isoartemisia cetona	0.62	-----
Limoneno	0.71	-----
Limonen-6-ol, pivalato	0.39	-----
Ácido isopentanoico	-----	0.23
O- cimeno	-----	0.23
Estragol	-----	0.18

La tabla 24, muestra los resultados de separación e identificación del aceite *T. terniflora* provenientes de Inquisivi y Tintilaya (Anexos 14 y 15), en ambos casos muestra como componente mayoritario di hidro tagetona (Anexo 16), seguido por cis tagetona, pero en Inquisivi se tiene mayor presencia de este compuesto, isoartemisia cetona y limoneno no se encuentran presentes en la especie recolectada en Tintilaya, mientras que el o-cimeno y estragol no se encuentran presentes en la recolección de Inquisivi.

Según Saavedra (2002), en Argentina identificó a los componentes mayoritarios de esta especie por CG-MS: cis-ocimeno, cis- trans tagetona, cis- trans ocimenona y la di hidro tagetona. Entonces coincidimos con los investigadores en la identificación de di hidro tagetona, cis tagetona los demás que se identifica son de menor porcentaje.

Tabla 25. Componentes de aceite esencial de *M. osteomeloides*

Componentes	Composición <i>M. osteomeloides</i>
	% Inquisivi
Eucaliptol	64.68
α-pineno	20.62
D- limoneno	5.42
β-pineno	3.61
Acetato de terpineol	1.96
α- terpineol	1.61
1-propenil ciclopentano	0.70
(-)-4-terpineol	0.39
Butanona	0.38

La tabla 25, muestra los resultados de separación e identificación del aceite *M. osteomeloides* proveniente de la región Inquisivi (Anexo 17), muestra como componente mayoritario eucaliptol (Anexo 18), seguido por α - y β -pineno, también resalta el acetato de terpineol.

Según López (2001), en Cochabamba identificaron por CG-MS los siguientes compuestos mayoritarios: 1,8-cineol (55,7%) como componente principal, seguido de α -pineno (17,9%), α -terpineol (8,5%) y β -pineno (4,6%). observamos que en nuestro estudio también identificamos a 1,8 cineol (eucaliptol), α -pineno y β -pineno, todos relativamente mayor en porcentaje con referencia a bibliografía. Contrario al α -terpineol que en nuestro caso tiene un porcentaje menor frente a la investigación de Cochabamba.

4.4 Determinación de actividad antioxidante y antimicrobiana

4.4.1 Determinación de actividad antioxidante.

4.4.1.1 Determinación por el método de Folin - Denis

El contenido total de fenoles se expresa como los miligramos de fenol en un litro de aceite esencial, para lo cual se hizo una curva de calibración con pirogalol tal como muestra la figura 44.

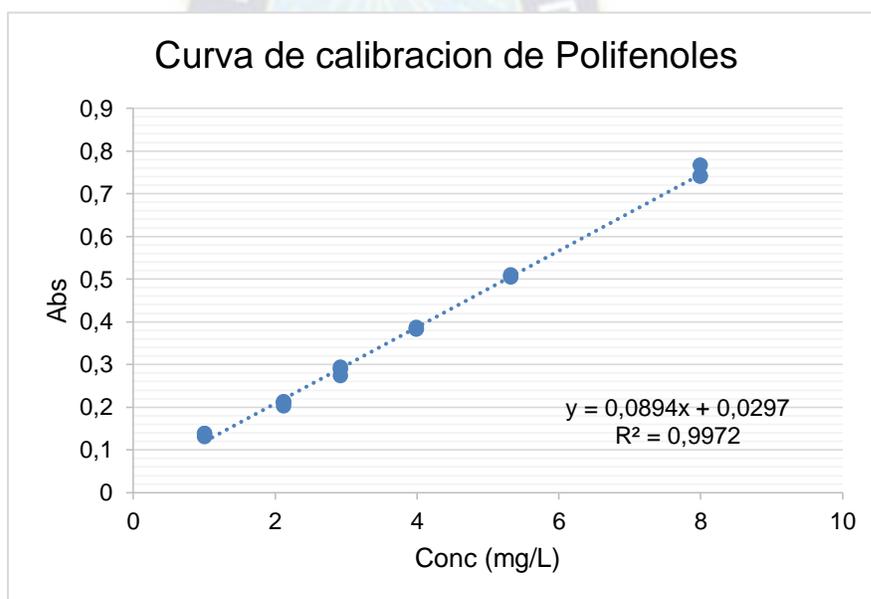


Figura 44. Curva de calibración de polifenoles totales

Habiendo utilizado el pirogalol como estándar para la determinación de fenoles totales por el método de Folin (cuatro niveles de concentración a dos repeticiones) se ha demostrado la relación de correspondencia ($r=0,9988$) con la ecuación regresión líneal (Anexo 19), posteriormente se realizó la lectura correspondiente para cada especie.

Tabla 26. Concentración de fenoles totales

Aceite esencial	Concentración en pirogalol (mg/L)	% C.V.	Concentración en 1 litro de aceite (mg/L)
<i>T. filifolia (Inquisivi)</i>	1,81±0,02	0,09	326,6±0,02
<i>T. filifolia (Tintilaya)</i>	1,92±0,02	1,16	346,4±0,02
<i>T. Mandonii (Tintilaya)</i>	2,33±0,02	0,05	604,8±0,02
<i>T. terniflora (Tintilaya)</i>	2,26±0,01	0,57	589,3±0,01
<i>T. terniflora (Inquisivi)</i>	1,88±0,04	0,02	489,1±0,04
<i>M. osteomeloides (Inquisivi)</i>	1,91±0,03	0,17	344,7±0,03

En la tabla 26, se puede observar la concentración de fenoles totales presentes en un litro de aceite esencial, la especie que muestra la mayor concentración de fenoles totales es *T. mandonii* con 604,8 mg/L de aceite esencial y el de menor concentración es *T. filifolia* proveniente de Inquisivi con 326,6 mg/L de aceite esencial.

4.4.1.2 Determinación por el método DPPH.

En la determinación de la actividad antioxidante se aplicó el método DPPH, el cual consistió en evaluar la potencia antioxidante frente al radical DPPH de los aceites esenciales.

Tabla 27. Determinación % de Inhibición por método DPPH

Aceite esencial	Promedio de % de inhibición	Desviación estándar	% C.V.	Expresión de resultado
<i>T. filifolia (Inquisivi)</i>	86,7	0,29	0,34	86,7±0,29
<i>T. filifolia (Tintilaya)</i>	43,2	0,07	0,16	43,2±0,07
<i>T. Mandonii (Tintilaya)</i>	84,1	0,42	0,49	84,1±0,42
<i>T. terniflora (Tintilaya)</i>	63,7	0,56	0,87	63,6±0,56
<i>T. terniflora (Inquisivi)</i>	77,3	0,32	0,40	77,3±0,32
<i>M. osteomeloides (Inquisivi)</i>	88,8	0,53	0,59	88,8±0,53

La tabla 27, muestra el porcentaje de inhibición que presenta sobre el radical DPPH, de manera general observamos que el mayor porcentaje de inhibición es de 88,8% de la especie *M. osteomeloides*, y el menor porcentaje de inhibición es de 43,2% de *T. filifolia* proveniente de Tintilaya, para todos los casos se trabajó con una dilución de 1/10 del aceite esencial, lo que significa q la potencia inhibitoria es aún mayor con aceite puro.

En la especie *T. filifolia* según Sanchez y Ruiz (2017), determinaron la capacidad antioxidante del extracto de *T. filifolia* en alcohol etílico por el método DPPH donde obtuvo una actividad antioxidante de 90,3%, en nuestro estudio se tiene mayor poder de inhibición de esta especie proveniente de la región de Inquisivi (86,7%) y un bajo poder de inhibición en la especie de Tintilaya (43,2%).

En el caso de *T. terniflora* según Zabaleta, Muñoz y Blanco (2005) determinaron el porcentaje de capacidad de inhibición que fue de 85,3% por el método DPPH en Perú, en nuestro estudio la capacidad de inhibición provenientes de Tintilaya e Inquisivi es de 63,7 % y 77,3 % respectivamente, esta variación frente a la referencia bibliográfica puede

ser debido a la dilución del aceite esencial, ya que en bibliografía no nos indica si fue diluido o puro el aceite esencial.

4.4.1.3 Determinación por el método ABTS.

Tabla 28. Determinación de % de Inhibición por el método ABTS

Aceite esencial	Expresión de	% C.V.	Expresión de	% C.V.
	resultado para 10 min		resultado para 30 min	
<i>T. filifolia (Inquisivi)</i>	40,8± 0,35	0,87	55,1±0,36	0.65
<i>T. filifolia (Tintilaya)</i>	19,8± 0,13	0,64	33,2± 0,07	0,22
<i>T. Mandonii (Tintilaya)</i>	75,4±0,37	0,50	93,5±0,60	0,63
<i>T. terniflora (Tintilaya)</i>	17,1±0,07	0,45	26,6±0,13	0,50
<i>T. terniflora (Inquisivi)</i>	68,1 ±0,21	0,40	79,3± 0,21	0,42
<i>M. osteomeloides (Inquisivi)</i>	33,9±0,37	0,90	47,6±0,28	0.60

La tabla 28, muestra el porcentaje de inhibición que presenta sobre el radical ABTS en dos diferentes tiempos de lectura al cabo de 10 min y 30 min, de manera general observamos que el mayor porcentaje de inhibición es de 75,4% en 10 min y 93,52 en 30 min de la especie *T. mandonii*, y el menor porcentaje de inhibición es de 17,14% en 10min y 26,57% en 30 min de *T. terniflora* proveniente de Tintilaya, para todos los casos trabajamos con una dilución de 1/10 de aceite esencial, lo q significa q la potencia inhibitoria es aún mayor con aceite puro.

4.4.2 Determinación de actividad antimicrobiana.



Figura 45. Determinación de actividad antimicrobiana

En la figura 45, se muestra el desarrollo de las cepas en microplaca frente a los aceites esenciales, este cultivo fue desarrollado por duplicado y las dos últimas como referencia (sin bacterias).

Tabla 29. Determinación de actividad antimicrobiana en aceites esenciales del género *Tagetes* y *Myrciantes*

Especie/ Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>T. filifolia</i>	-	+	++	-
<i>T. mandonii</i>	-	+	+++	++
<i>T. terniflora</i>	-	+	+++	++
<i>M. osteomeloides</i>	-	-	++	-

(-) Sin actividad

(+) Baja actividad

(++) Media actividad

(+++) Activo

En la tabla 29, podemos observar la actividad antimicrobiana frente a los aceites esenciales. Para *T. filifolia* la bacteria *Pseudomona aeruginosa* presento una actividad media a una dilución 1/400 y actividad baja a una dilución 1/400 frente a *Eschericha coli*. En *T. mandonii* y *T. terniflora* presento actividad antimicrobiana a una dilución 1/3200 frente a *Pseudomona aeruginosa*, una actividad media a una dilución 1/3200 frente a *Candida albicanis* y una actividad baja a una dilución 1/1600 frente a *Eschericha coli*. Finalmente *M. osteomeloides* presentó una actividad media a una dilución 1/1600 frente a *Pseudomona aeruginosa* y para todos los aceites presento sin actividad frente *Staphylococcus aureus*.

4.5 Formulación del producto

4.5.1 Formulación del gel

a) Gel base

Tabla 30. Relación porcentual de formulación de base

Excipientes	Formulación A	Formulación B	Formulación C
	(%)	(%)	(%)
Agua destilada	62,5	95,06	98,81
Carbopol	1,25	0,95	0,98
Trietanolamina	12,5	0,20	0,098
Glicerina	12,5	3,80	0,098



Figura 46. Formulación de la base para la elaboración de gel

En la tabla 30, se registra la formulación de la base para la elaboración del gel terapéutico, la figura 46, muestra las tres diferentes formulaciones bases, el primero no cumplía con la viscosidad deseada, tenía un aspecto gomoso, por lo que tenía una difícil aplicación y no había homogeneidad, en la segunda tenía una consistencia, aplicación, untuosidad y homogeneidad similar a un gel terapéutico comercial y en la tercera pre formulación tenía una consistencia muy líquida, si tenía untuosidad pero no era de fácil aplicación.

Entonces se determinó que la base ideal para el gel terapéutico era la formulación B ya que presentaba características (untuosidad y extensibilidad) similares a la de los geles comercial GX y MF.

b) Incorporación del aceite esencial

Tabla 31. Formulación de gel terapéutico

Excipientes	Porcentaje (%)
Agua destilada	89,91
Carbopol	2,54
Trietanolamina	0,91
Glicerina	3,63
Conservante	1,00
Aceite esencial	2,00



Figura 47. Gel terapéutico

En la tabla 31, observamos la formulación del gel terapéutico con la base pre formulado de similar característica aun gel comercial, se añadió un 2% de aceite esencial al gel para que tenga una buena acción sobre la piel lastimada.

La figura 47, se muestra el gel terapéutico envasado, listo para su control de calidad y aceptación por un grupo seleccionado de personas.

4.5.2 Control de calidad producto formulado.

4.5.2.1 Determinación de pH.



Figura 48. Determinación de pH de gel terapéutico

En la figura 48, podemos observar que el pH del gel se encuentra en el rango de pH=5 ligeramente ácido.

4.5.2.2 Determinación de extensibilidad

Tabla 32. Determinación de extensibilidad

Promedio de Área inicial (mm ²)	Promedio de Área final(mm ²)	%C.V.
18,4	962,1	
19,7	986,4	3,7
18,6	974,8	



Figura 49. Determinación de extensibilidad de gel terapéutico

En la tabla 32 y en la figura 49, observamos el promedio de las áreas inicial antes de que se extienda el gel en el vidrio de reloj y después que se extendió el gel, podemos notar una diferencia de 943,7 mm² de extensión con una masa de 0,5 g, por lo que deducimos que el gel tiene una fácil extensibilidad.

4.5.2.3 Determinación de Untuosidad

Tabla 33. Determinación de untuosidad

Masa de gel (g)	Tiempo de absorción (seg)	% C.V.
0,5	120	
0,5	122	2,5
0,5	126	



Figura 50. Prueba de untuosidad del gel terapéutico

La figura 50, muestra la prueba de untuosidad del gel en las manos por cierto tiempo, la tabla 33, muestra la cantidad de masa promedio y el tiempo que tarda en absorberse el gel en la piel, para 0,5 g tarda en absorber totalmente 120 segundos, un tiempo aceptable para un gel terapéutico.

4.5.3 Aceptación de la formulación de gel terapéutico

4.5.3.1 Resultados de Encuesta de satisfacción con el producto

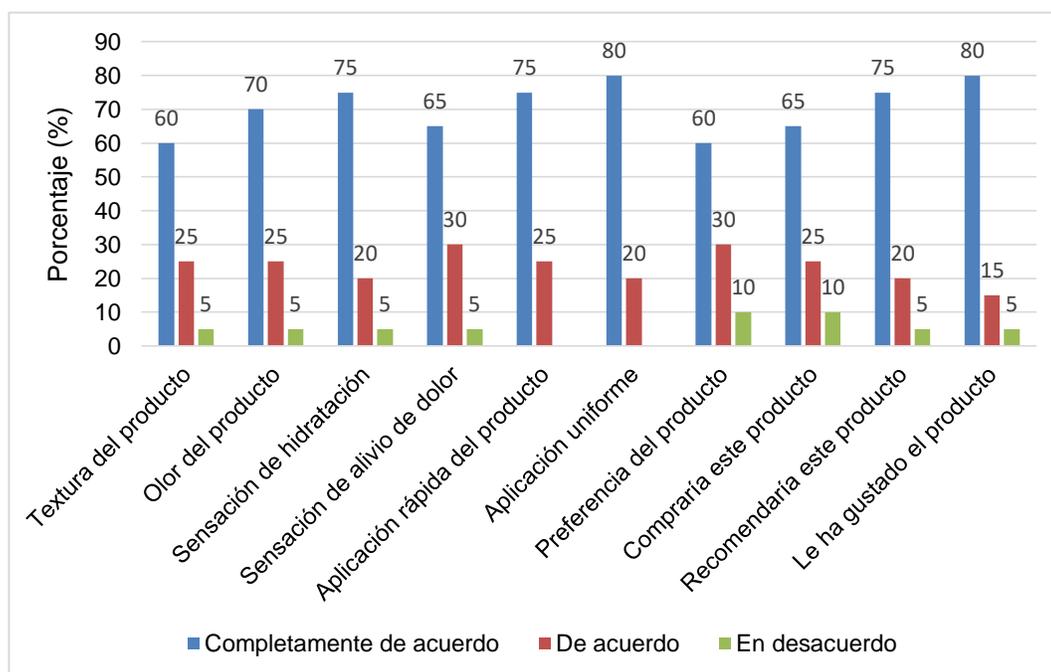


Figura 51. Encuesta de aceptación del producto

En la figura 51, se muestra los resultados de la encuesta de satisfacción con el producto gel analgésico (Anexo 20). En las tres primeras preguntas se realiza una evaluación organoléptica del producto estando el 70% completamente de acuerdo con la textura, olor y sensación de hidratación del producto; desde la 4ta a la 6ta pregunta se realiza una calificación subjetiva del producto el 65% está completamente de acuerdo con la sensación de alivio de dolor muscular y el 75% con la aplicación rápida del producto; las últimas 4 preguntas se realiza una apreciación del producto el 60% tiene

preferencia del producto sobre otros productos del mercado, 65% compraría el producto y el 80% le agrado el producto debido a que es un producto innovador.

Ninguno de los voluntarios incluidos en el estudio presentaron reacciones cutáneas ni durante ni después de la aplicación, por ello se realizó un seguimiento durante 1 mes para ver alguna anomalía en la piel.

4.5.3.2 Control negativo y positivo del producto

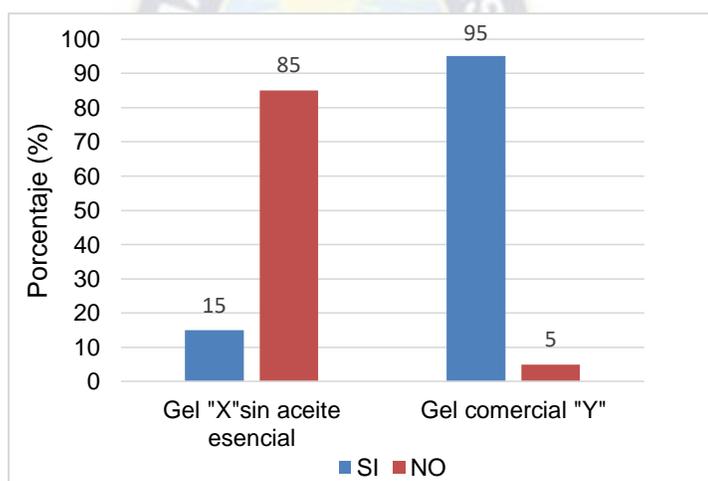


Figura 52. Control positivo- negativo del producto

La figura 52, muestra el control positivo- negativo del producto, el 15% indico que el gel "X" si tenía efecto de sensación de alivio de dolor, sin embargo este gel "X" no tenía aceite esencial y el 95% indico que tenía sensación de alivio de dolor con el gel comercial "Y" que si tenía efecto antiinflamatorio, entonces podríamos deducir que las personas se dejan guiar por la apariencia o sus sentidos.

4.5.4 Costo de la formulación del producto.

Un análisis económico financiero es un sistema de información con el que se establece el costo incurrido al preparar un producto y la forma como fue generado, para cada una de las actividades en las que se desarrolla el proceso productivo, permitiendo conocer la factibilidad económica del proyecto. (Andrade, 2014)

Para determinar el costo total consideraremos los siguientes criterios:

- Costo de fabricar
- Costo de administrar
- Costo de comercializar

4.5.4.1 Costo de fabricar.

Es un parámetro que incluye el costo directo de los materiales (CDM), costo directo de mano de obra (CDMO) y los costos indirectos de fabricación (CIF)

$$C_{\text{Fab}} = (\text{CDM}) + (\text{CDMO}) + (\text{CIF})$$

4.5.4.1.1 Costo directo de los materiales (CDM).

Participa directamente en el producto o proceso de fabricación. En la siguiente tabla mostramos los costos directos de los materiales, considerando una producción final de 5 Kg de gel al día y 100 Kg de gel en un mes.

Tabla 34. Costo de materia prima

Nro.	Detalle	Cantidad Mensual (Kg)	Cantidad Anual (Kg)	Monto Estimado Mensual (Bs)	Monto Estimado Anual (Bs)
1	Carbopol	2,5	30	12500	150000
2	Trietanolamina	0,9	108	360	4320
3	Glicerina	3,6	43,2	1080	12960
4	Agua destilada	89,8	1077,6	853,1	10237,2
5	Conservante	1	12	60	720
6	Aceite esencial	2	24	160	1920
TOTAL				15013,1	180157,2

Se produce 5 Kg al día, por lo tanto se tiene 100 unidades al día, 2000 unidades al mes y 24000 unidades al año.

Tabla 35. Costo de envasado

Nro.	Detalle	Precio Unitario (Bs)	Precio Mensual (Bs)	Precio Anual (Bs)
1	Envases (frascos de plástico)	4	8000	96000
2	Etiqueta	3	6000	72000
TOTAL			14000	168000

El costo directo de los materiales total es:

Tabla 36. Costo directo de los materiales total

Nro.	Detalle	Monto mensual subtotal (Bs)	Monto anual subtotal (Bs)
1	Materia Prima	15013,1	180157,2
2	Envasado	14000	168000
TOTAL		29013,1	348157,2

4.5.4.1.2 Costo directo de mano de obra (CDMO)

Es la remuneración que se ofrece en dinero o en especie al personal que efectivamente ejerce un esfuerzo físico dentro del proceso de transformar la materia prima en un producto final.

Tabla 37. Costo directo de la mano de obra

Cargo	Cantidad	Remuneración mensual (Bs)	Remuneración anual (Bs)
Operario 1	1	2100	25200
Leyes Sociales (15%)		300	3600
TOTAL		2400,0	28800,0

4.5.4.1.3 Costo indirecto de fabricación (CIF)

Denominados también carga fabril, gastos generales de fábrica o gastos de fabricación. Son aquellos costos que intervienen dentro del proceso de transformar la materia prima en un producto final y son distintos al material directo y mano de obra directa. Dentro de ellos están: material indirecto, mano obra indirecta, servicios públicos, arrendamientos, depreciación de maquinaria, combustible e implementos para aseo de la fábrica.

Tabla 38. Costo de material indirecto

Detalle	Consumo Mensual	Consumo Anual	Monto Estimado Mensual (Bs)	Monto Estimado Anual (Bs)
Agua	20 (m ³)	240 (m ³)	42,2	506,4
Energía Eléctrica	200(Kw/h)	24000(Kw/h)	160	1920
Gas GLP			50	600
TOTAL			252,2	3026,4

Tabla 39. Costo de mano de obra indirecta

Cargo	Cantidad	Remuneración Mensual (Bs)	Remuneración Anual (Bs)
Jefe de Planta	1	3000	36000
Leyes Sociales (15%)		450	5400
TOTAL		3450	41400

Tabla 40. Costo de depreciaciones

Nro.	Rubro	Monto Total (Bs)	Años de Vida	Depreciación Anual (Bs)	Depreciación Mensual (Bs)
1	Edificaciones y obras civiles	21000	40	525	43,75
2	Maquinaria y equipo	5000	1	5000	416,66
3	Equipo complementario	10000	15	666,66	55,55
4	Mobiliario y equipo	5000	15	333,33	27,77
5	Imprevistos	500	15	33,33	2,77
	TOTAL			6558,3	545,6

Tabla 41. Costo de mantenimiento

Nro.	Rubro	Monto Total (Bs)	Tasa %	Costo de Mantenimiento (Bs)
1	Edificaciones y obras civiles	21000	2,0	240
2	Maquinaria y equipo	5000	2,0	100
3	Equipo complementario	10000	2,0	200
4	Mobiliario y equipo	5000	3,0	150
5	Imprevistos	500	3,0	15
	TOTAL			705

Tabla 42. Costo de transporte de producto final

Detalle	Cantidad Transportada por Mes (Kg)	Cantidad Transportada por Año (Kg)	Monto Estimado Mensual (Bs)	Monto Estimado Anual (Bs)
Gel terapéutico	100	1200	400	4800
Imprevistos			30	360
TOTAL			430	5160

A continuación se mostramos los costos indirectos de fabricación

Tabla 43. Costos indirectos de fabricación

Nro.	Rubro	Monto Mensual Subtotal (Bs)	Monto Anual Subtotal (Bs)
1	Material Indirecto	252,2	3026,4
2	Mano de Obra Indirecta	3450,0	41400,0
3	Depreciaciones	545,6	6558,3
4	Mantenimiento	58,75	705,0
5	Costos de Transporte del Producto Final	430,0	5160,0
	TOTAL	4736,5	56849,7

Finalmente los costos de fabricación se determinan por la sumatoria de los costos directos e indirectos:

Tabla 44. Costos de fabricación

Nro.	Rubro	Monto Mensual Subtotal (Bs)	Monto Anual Subtotal (Bs)
1	Material Directo	29013,1	348157,2
2	Mano de Obra Directa	2400	28800
3	Costo Indirecto de Fabricar	4736,5	56849,7
	TOTAL	36149,6	433806,9

4.5.4.2 Costo de administrar

Son los gastos operacionales de administración ocasionados en el desarrollo del objeto social del ente económico. Se incluyen básicamente los aspectos relacionados con la gestión administrativa encaminada a la dirección, planeación, organización, incluyendo las actividades ejecutivas, financieras, comerciales y legales.

Los costos administrativos comprenden los siguientes rubros:

➤ Gastos Administrativos Indirectos

En este rubro se consideran las depreciaciones, el mantenimiento, y el costo de transporte del producto final, del que se asume un 20.0% de los gastos indirectos de fabricación.

$$4736,5 * 0,2 = 947,3 \text{ Bs/mes}$$

$$56849,7 * 0,2 = 11369,9 \text{ Bs/año}$$

➤ **Gastos Generales**

Se asume un gasto diario de 40 Bs, siendo el monto mensual 800 Bs y anual de 9600 Bs.

Por tanto los costos totales administrativos son:

Tabla 45. Costos totales administrativos

Nro.	Rubro	Monto mensual subtotal (Bs)	Monto anual subtotal (Bs)
1	Gastos Administrativos Indirectos	947,3	11369,9
2	Gastos Generales	800	9600
	TOTAL	1747,3	20969,9

4.5.4.3 Costo de comercializar

Comprende los gastos ocasionados en el desarrollo principal del objeto social del ente económico y están directamente relacionados con las actividades de ventas. Se incluye básicamente los aspectos relacionados con: distribución, publicidad, promoción, mercadeo y comercialización.

➤ **Gastos de Transporte y Viáticos**

Se refieren a los gastos que se incurrirán en la venta del producto terminado por el encargado de la planta en la ciudad de La Paz, realizando dos viajes por semana, con viáticos que se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 46. Gastos de transporte y viáticos

Detalle	Monto Mensual (Bs)	Monto Anual (Bs)
Transporte	430	5160
Viáticos	160	1920
TOTAL	590	7080

➤ **Papelería**

Se considera un costo mensual será 15 Bs y el anual 180 Bs.

➤ **Comunicaciones**

Se asume un costo diario de 5 Bs diario. Por tanto el costo mensual será 150 Bs y el anual 1825 Bs.

➤ **Propaganda**

Se asume que el costo mensual es de 100 Bs y el anual 1200 Bs

Resumiendo el costo de comercializar es el siguiente:

Tabla 47. Costo de comercializar

Rubros	Monto Mensual Subtotal (Bs)	Monto Anual Subtotal (Bs)
Gastos de Transporte y Viáticos	590	7080
Papelería	15	180
Comunicaciones	150	1825
Propaganda	100	1200
TOTAL	855	10285

4.5.4.4 Costo Total

Determinamos utilizando la relación:

$$C_{TOTAL} = C_{Fab} + C_{Adm} + C_{comercializar}$$

$$C_{TOTAL} = 36149,6 + 1747,3 + 855 = \mathbf{38751,9 \text{ Bs/mes}}$$

$$C_{TOTAL} = 433806,9 + 20969,9 + 10285 = \mathbf{465061,8 \text{ Bs/año}}$$

4.5.4.5 Costo Unitario

El costo unitario se determina, dividiendo el costo total incurrido entre los volúmenes de producción.

$$\text{Costo Unitario} = \frac{\text{Costo Total}}{\text{Volumen de Produccion}}$$

$$\text{Costo Unitario} = \frac{465061,8}{24000} = 19,37 \text{ Bs}$$

$$\text{Costo Unitario} = 19,37 \text{ Bs}$$

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- El rendimiento obtenido de los aceites esenciales mediante el método de arrastre de vapor fueron 0,2% a 0,6%, en el género de Tagetes fue del 0,2% a 0,4% y en el género Myrtaceae fue de 0,6%; mientras tanto el rendimiento por el método por fluidos supercríticos fue de 0,6% a 3,7%; en el género Tagetes el mayor rendimiento fue de 3,7 de la especie *T. filifolia* y en el género Myrtaceae fue de 3,1%. Entonces el rendimiento mediante la extracción por fluidos supercríticos es mayor a la de arrastre de vapor.
- Las propiedades fisicoquímicas fueron analizadas por especie y en general han mostrado similitud en sus propiedades organolépticas y color. Sin embargo, han mostrado diferencias numéricamente en el valor del pH, densidad, índice de acidez, índice de refracción, actividad óptica. La evaluación de las señales de actividad, cromatografía en capa fina y espectrogramas infrarrojos han confirmado la presencia de compuestos volátiles para cada especie. Los datos de cromatografía de gases-masas nos identificaron estos compuestos, para *T. filifolia* el componente mayoritario: Anetol (92,11%, 88,85% provenientes de Inquisivi y Tintilaya respectivamente); *T. mandonii*: Dihidro tagetona (48,59% proveniente de Tintilaya); *T. terniflora*: Dihidro tagetona (31,86% y 79,91% provenientes de Inquisivi y Tintilaya respectivamente) y *M. osteomeloides*: Eucaliptol (64,68% proveniente de Tintilaya).

- Las especies que muestran mejor capacidad antioxidante evaluado por el método de Folin fueron: *T. mandonii* (604,812 ppm) y *T. terniflora* (589,316 ppm) de fenoles totales en 1 litro de aceite esencial, por el método DPPH el mayor % de inhibición presenta la especie de *M. osteomeloides* (88,8%), seguido por *T. mandonii* (86,7%), por el método de ABTS el porcentaje de inhibición mayor es de *T. mandonii* (75,4%) y el porcentaje menor por *T. terniflora* (68,15).

Las cuatro especies presentaron actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* y sin actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

- Se elaboró la formulación de un producto como gel analgésico con aceite esencial de *M. osteomeloides* extraído por arrastre de vapor, realizando control de calidad y aceptabilidad del producto.
- El costo de la formulación del producto se tomó en cuenta los criterios de: costo de fabricar, administrar y comercializar. Suponiendo que se producirá 100 Kg en 2000 unidades en 1 mes. Teniendo un costo unitario de formulación de Bs. 19,37.
- Se desarrolló la formulación de un gel terapéutico analgésico con aceite esencial de *M. osteomeloides* obtenida por arrastre de vapor proveniente del sector valle del departamento de La Paz.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios acerca de la extracción con fluidos supercríticos en *T. mandonii*, debido a su buen rendimiento y alto contenido de antioxidantes.
- Elaborar normativa boliviana con evaluación física (IR, CG-MS) de los aceites esenciales, además de actualizarlos.
- Completar con pruebas específicas para determinar la propiedad antioxidante y explorar la actividad anticancerígena en el aceite esencial *T. mandonii*.
- Completar la evaluación farmacológica "in vivo" del gel desarrollado.
- Realizar una proyección de ventas para el producto desarrollado.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Andrade, H. (2014). Costos industriales.

Arevalo, P. D. (2001). Plantas aromáticas y medicinales enfermedades de importancia y usos terapéuticos. Bogota. Colombia: C.M.Vasquez.

Arrazola, R. A. (2002). Diversidad florística medicinal y potencial etnofarmacológico de plantas de los valles secos de Cochabamba-Bolivia. Revista boliviana de ecología y conservación ambiental. Pag. 53-85.

Avalos Garcia, A., & Perez Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Fisiología Vegetal. Pag. 119-145.

Bareño, P. y. (2006). Hierbas aromáticas culinarias para exportación en fresco. Bogota.

Beltran, C. (2016). Cosméticos y cosmeceutícos similares, pero no iguales. El Columnero/ Salud. Pag. 4-16.

Bohorquez Fajardo, R. (2016). Determinación de actividad antioxidante de extractos. Bogota.

Cacasaca Avila, R. (2012). Industrialización de Chilca (*Baccharis Latifolia*) en el municipio de La Paz. La Paz: Proyecto de grado para la obtención del grado licenciatura.

CACE. (2005). Química Cosmética. Argentina.

Cameroni, G. (2012). Historia de las hierbas aromáticas, especias y aceites esenciales. Argentina.

- Carrion Jara, A., & Garcia Gomez, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metodica. Cuenca: (Tesis de grado). Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Cerpa Chavez, M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Valladolid: (Tesis doctoral).Universidad de Valladolid.
- Cerpa, C. M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelo y caracterización . Valladolid: Tesis Doctoral.
- Cosme Villa, W., Saavedra, N., Viturro, C., & Molina, A. (2002). Ensayo piloto de Extracción de volatiles de T. terniflora H.B.K. Ciencias de la ingeniería, Agronomía y Tecnología, Jujuy. Pag. 1-5.
- Cuervo P., W. (2008). Extracción de aceite esencial de eucalipto utilizando dióxido de carbono en condición supercritica. Venezuela.
- Cumara Quispe, P., & Choquehuanca Laura , R. (2015). Estudio de las propiedades de aceites esenciales de los géneros clinopodium minthostachys colectados de siete provincias del departamento de La Paz. La Paz: Tesis de grado para obtener de título de licenciado en Química Industrial.
- Davis, P. (1982). Myrtaceae. in Flora of Turkey and the East Aegean Islands.
- Deng J., Yang G., & Cheng W. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH* assay. Pag. 1430-1435.
- Días, L. (2005). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de Mynthostachis Mollis frente a bacterias orales de importancia estomatologica. Lima: Tesis para optar cirujano dentista, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Dominguez Fernandez, I. (2012). Test de uso bajo control dermatológico para la apreciación de la aceptibilidad cutanea del producto crema hidratante facial, Pag. 5-30.
- Dominguez, A. (1988). Métodos de investigación fitoquímica. Pag. 229,239,281.
- Environmental Working Group. (2008). Cosmética natural y cosméticos adecuados para Sensibilidad Química Múltiple. Pag. 3-5.
- Garcia H. (1955). Tegetes terniflora. En G. H.. Colombia.
- Gonzales Bocangel, P., Mancilla Tafur, A., Rengifo Urbietta, L., & Arévalo Ortiz, F. (2007). Extracción de aceite esencial de *Myrtus communis* L. y estudio de su actividad antimicrobiana.
- Gonzalez Villa, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Bogota: (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia.
- Guenther , E. (1948). The essenthial oils. En History - Origin in plants production - analysis. Volume I (págs. 241-244). New York: Litton Educational.
- Gutierrez, M. (1996). Aceites esenciales. Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales. Pag. 66-75.
- Gutierrez, M., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas. Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Pag. 32 - 45.
- Huang D., B., & Prior R., L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Instituto Boliviano de Normalización y Calidad. Norma Boliviana NB 75001

- Jorin Novo, J., Diaz, N., & Barcena Ruiz, J. (2001). Cromatografía en capa fina. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. Pag. 5-8.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A., & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químico para determinar actividad antioxidante en puklpa de frutos. Ciencia, Tecnología y Alimentos. Pag. 726-732.
- Lock de Ugaz, O. (1988). Investigación fitoquímica. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Londoño L., J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Colombia.
- Lopez Arce, J. (2001). Myrtaceae: Myrciabthes osteomeloides (Rusby) and Myrcianthes pseudomato (Legrand). Essential oils from Bolivia. VII. Pag. 32-38.
- Maestri, D., Zygadlo, J., Grosso, N., Aburra, R., & Guzman C., A. (1991). Composición del aceite esencial en poblaciones argentinas de tagetes filifolia Lag.(Compositae). Pag. 133-136.
- Martinez F., & Gonzales G. (2002). los flavonoides, propiedades y acciones antioxidantes. Pag.271-278.
- Martinez, M. A. (2003). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia Facultad Química farmaceutica. Medellin.
- Miguel, S.-C., Francisco, D.-C., & Juan, B. P. (2008). Composición del aceite esencial en germoplasma de Tagetes filifolia Lag.de la region centro-sur de México . Agrociencia. Pag. 277-285.

- Moraes, R. M. (2006). Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica económica de los Andes centrales. Pag. 268-284.
- Moyron, T. (2009). Anis (*Tagetes Filifolia* Lag.). Medicina Tradicional Mexicana.
- Muñoz, A., Kouznetsov V., V., & Stashenko, E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacol, trans- anetol o estragol. Salud UIS. Pag. 287-294.
- Pauro R., J., Gonzales M., F., Gamarra C., B., Pauro R., J., & Mamani M., F. (2011). Plantas alimenticias, medicinales y biocidas de la comunidades de muñani y suatia, provincia de Lampa (Puno- Peru) (PUNO –. Ecología aplicada, 41-49.
- Perez Bueno, T., Rodriguez Perdomo, Y., & Morales, I. (2011). Tecnología, Ciencia y Educación. Comportamiento ecologico y extensibilidad de una formulación semisolida a partir de extracto acuoso. Pag. 75-79.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal . Scientia et Technica Año XV, Universidad Tecnológica de Pereira. Pag. 263-268.
- Riva, P. J. (2006). Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales. Pag. 268-284.
- Rodriguez Rey, C., & Chapuli, P. (2000). Reino Plantas. Marea Verde. Pag. 1-4.
- Rodriguez, A., Alcaraz, M., & Real C., S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Consejo nacional de ciencia y tecnología.

- Saavedra, N., Cosme Villa, W., Viturro, C., & Molina, A. (2002). Ensayo piloto de extracción de volátiles de *Tagetes terniflora* H.B.K. Producciones científicas. Sección: Ciencias de ingeniería y tecnología. Pag. 1-5.
- Sanchez Humala, A., Ruiz Briceño, C., & Ruiz Burneo, G. (2017). Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. Pag. 18-24.
- SEDEM. (2012). Plan de desarrollo del departamento autónomo de La Paz. La Paz-Bolivia.
- SENA, S. d. (2005). Introducción a los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas. Colombia.
- Senatore, F., & De Feo, V. (1999). Chemical composition of the essential oil from *Tagetes mandonii* Sch. Bip. (Asteraceae). *Flavour and fragrance journal*. Pag. 32-34.
- Serrano. (2009). Pampanis. Inka Plus.
- Serrato Cruz Miguel Angel, Z. M. (2015). Experiencias piloto de extracción de aceites esenciales cuatro especies de *Tagetes* de México para obtención de bioplaguicidas. X Congreso de Ciencia y Tecnología. Pag. 12-15.
- Serrato Cruz, M., & Reyes Trejo, B. (2003). Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag): Recurso Genético Mexicano para controlar la mosquita blanca (*Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.). *Revista del jardín botánico nacional*. Pag. 65-70.
- Torez Mamani, J. J. (2012). Caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales, obtenidos a nivel laboratorio y piloto para el control de áfidos. La Paz: Proyecto de grado para optar el título de licenciado en Química Industrial.

- UNIMED. (2010). Definiciones y ambito de aplicación, artículo 1. Lima: Manual para notificación sanitaria obligatoria de cosmético.
- Uñatatawi, F. (2003). Producción, Aprovechamiento y uso de especies aromaticas y medicinales. Descripción y Uso de 12 especies aromáticas y medicinales. Pag. 6-55.
- Valverde G., A. (1995). Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. Provincia de Almeria.
- Velasquez Valderrama, A. M. (2008). Tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. tecnologia de fluidos supercríticos. Pag. 99-108.
- Vidal , C. (2018). Dosificación y Dermotoxicidad de los aceites esenciales.
- Yadegarinia, D., Gachkar, L., & Bagher Rezaei, M. (2006). Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils.
- Yapuchura M., R. (2010). Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña . Lima: Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en tecnologia de alimentos.
- Zabaleta, J., Muñoz , A., Blanco , T., & Alvarado Ortiz, C. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenolicos y flavonoides de algunos alimentos del Horizonte Medico, vol. 5. Pag. 3-13.

ÍNDICE DE FIGURAS DE ANEXO

Figura 1. Comunidad de Tintilaya.....	1
Figura 2. Tagete filifolia	2
Figura 3. Tagete mandonii.....	3
Figura 4. Tagete terniflora	4
Figura 5. Myrcianthes osteomeloides	5
Figura 6. Herborizado T. filifolia.....	6
Figura 7. Herborizado T. mandonii	6
Figura 8. Herborizado T. terniflora.....	7
Figura 9. Herborizado de M. osteomeloides	7
Figura 10. Cromatograma de gases de T. filifolia (Inquisivi)	8
Figura 11. Cromatograma de gases de T. filifolia (Tintilaya).....	9
Figura 12. Comparación del espectro de anetol con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas	10
Figura 13. Cromatograma de gases de T. mandonii (Tintilaya)	11
Figura 14. Comparación del espectro de dihidro tagetona con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas	12
Figura 15. Cromatograma de gases de T.terniflora (Inquisivi)	13
Figura 16. Cromatograma de gases de T. terniflora (Tintilaya).....	14
Figura 17. Comparación de espectro de dihidro tagetona con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas	15
Figura 18. Cromatograma de gases de M.osteomeloides (Inquisivi)	16

Figura 19. Comparación del espectro de eucaliptol con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas17

Figura 20. Calibración de pirogalol19

Figura 21. Formato de encuesta20



ANEXO 1

NOMBRE CIENTÍFICO: *T. filifolia* Lag.

NOMBRE VULGAR: Anís de monte

FAMILIA: Compositae

ÉPOCA: Húmeda



Figura 1. Comunidad de Tintilaya



Figura 2. *Tagete filifolia*

Fecha de colecta: 07-04-2018 (Inquisivi), 15-03-2018 (Tintilaya)

LUGAR DE COLECTA: crecen a las orillas del camino y por sembradíos de choclos, en lugares donde hay humedad y se encuentra entre otras plantas silvestres se colecto de dos provincias que son las siguientes.

Tintilaya. Alt: 2652 msnm HO: 68°38'58,0'' S: 15°46'12,0''

Inquisivi. Alt: 2124 msnm HO: 67°08'40,6'' S: 16°53'16,7''

(HO es longitud oeste y S es latitud sur)

MATERIAL COLECTADO: hojas, flores y algunos tallos pequeños.

ANOTACIONES DE USO POTENCIAL: en el tratamiento de dolores intestinales.

ANEXO 2.

NOMBRE CIENTÍFICO: *T. mandonii* Sch. Bip.

NOMBRE VULGAR: Anu Chijchipa

FAMILIA: Compositae

ÉPOCA: Húmeda

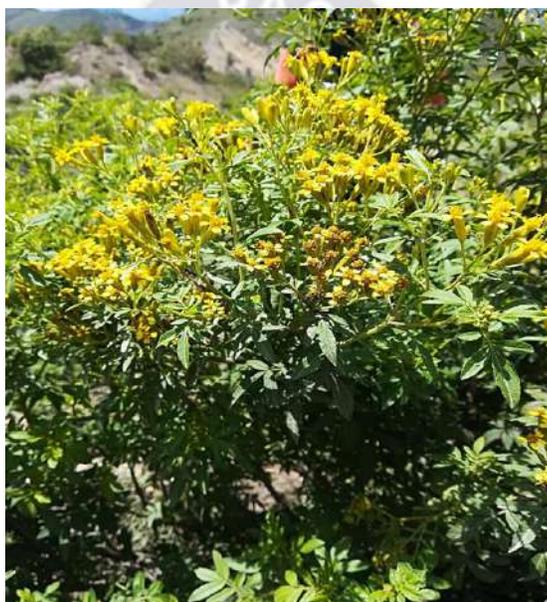


Figura 3. *Tagete mandonii*

Fecha de colecta: 26-01-2018

LUGAR DE COLECTA: crecen a 2 metros del camino principal, pequeño arbusto y se encuentran en la comunidad de:

Tintilaya. Alt: 2652 msnm HO: 68°38'58,0'' S: 15°46'12,0''

(HO es longitud oeste y S es latitud sur)

MATERIAL COLECTADO: hojas, flores y tallos.

ANOTACIONES DE USO POTENCIAL: en el tratamiento de dolores intestinales y dolores de parto

ANEXO 3

NOMBRE CIENTÍFICO: *T. terniflora* Kunth.

NOMBRE VULGAR: Huacataya silvestre

FAMILIA: Compositae

ÉPOCA: Húmeda



Figura 4. *Tagete terniflora*

Fecha de colecta: 26-01-2018

LUGAR DE COLECTA: crecen a 5 metros del camino principal, próximo al río Challapampa, en la comunidad de:

Tintilaya. Alt: 2652 msnm HO: 68°38'58,0'' S: 15°46'12,0''

Inquisivi. Alt: 2124 msnm HO: 67°08'40,6'' S: 16°53'16,7''

(HO es longitud oeste y S es latitud sur)

MATERIAL COLECTADO: hojas, flores y tallos.

ANOTACIONES DE USO POTENCIAL: en el tratamiento de dolores intestinales.

ANEXO 4

NOMBRE CIENTÍFICO: *Myrcianthes osteomeloides*.

NOMBRE VULGAR: Arana

FAMILIA: Myrtaceae

ÉPOCA: Húmeda



Figura 5. *Myrcianthes osteomeloides*

Fecha de colecta: 07-04-2018

LUGAR DE COLECTA: crecen una loma como arbusto pequeño rodeada de plantas silvestres espinosas en la comunidad de:

Inquisivi. Alt: 2124 msnm HO: 67°08'40,6'' S: 16°53'16,7''

(HO es longitud oeste y S es latitud sur)

MATERIAL COLECTADO: hojas, flores, ramas y algunos tallos grandes.

ANOTACIONES DE USO POTENCIAL: en dolores de muela y dolores musculares, también heridas.

ANEXO 5

IDENTIFICACION BOTANICA *T. filifolia*



Figura 6. Herborizado *T. filifolia*

ANEXO 6

IDENTIFICACION BOTANICA *T. mandonii*



Figura 7. Herborizado *T. mandonii*

ANEXO 7

IDENTIFICACION BOTANICA *T. terniflora*



Figura 8. Herborizado *T. terniflora*

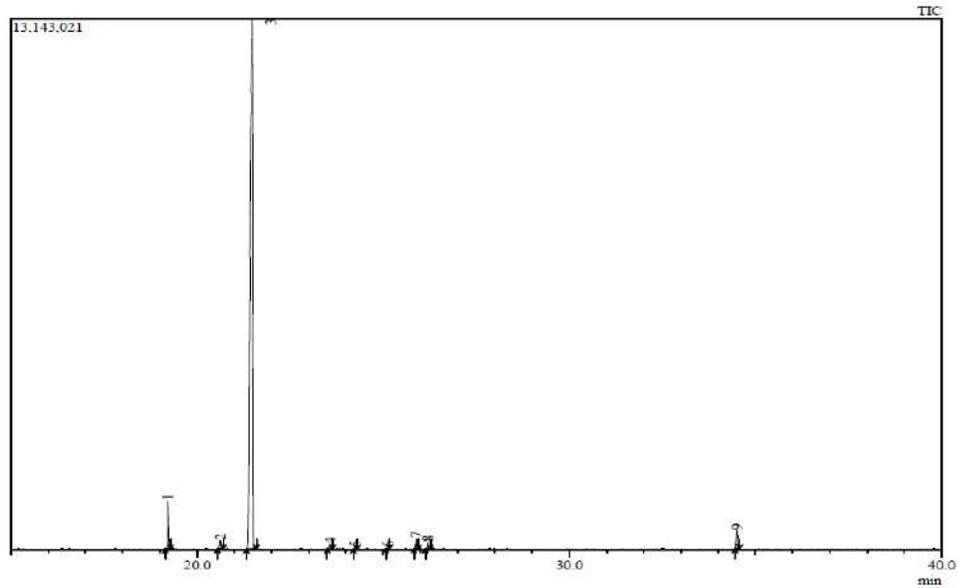
ANEXO 8

IDENTIFICACION BOTANICA *M. osteomeloides*



Figura 9. Herborizado de *M. osteomeloides*

ANEXO 9

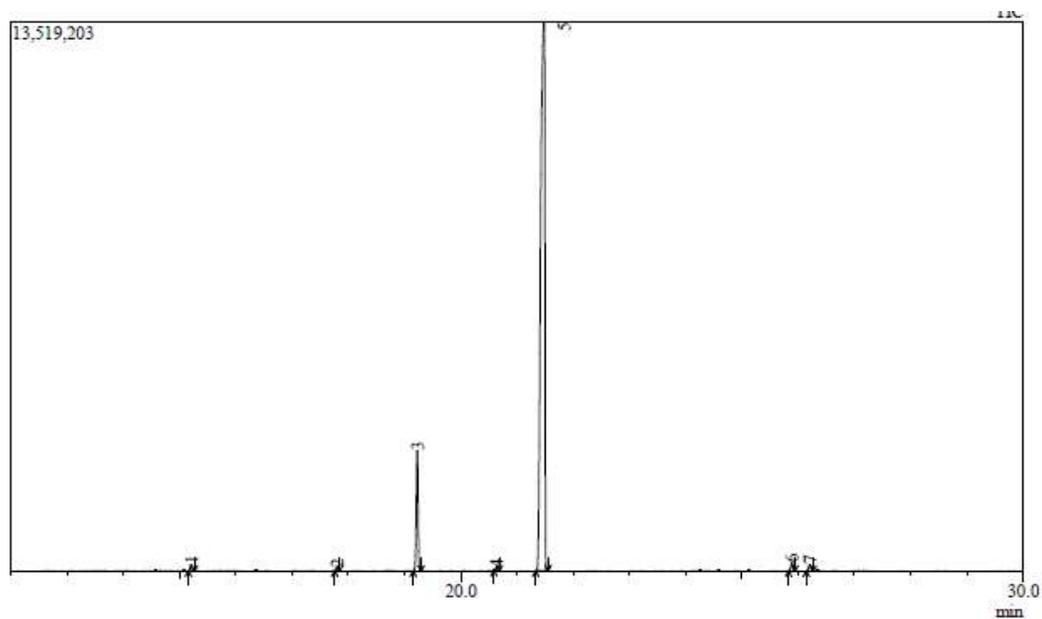


Peak#	R.Time	Area%	Height%	A/H Name
1	19.216	3.50	7.56	2.31 Estragole
2	20.626	0.79	1.39	2.83 Benzaldehyde, 4-methoxy-
3	21.485	92.11	83.92	5.48 Anethole
4	23.568	0.45	0.77	2.96 2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)-
5	24.246	0.11	0.23	2.50 Benzene, 2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-dimethox
6	25.121	0.10	0.21	2.44 (E)-.beta.-Farnesene
7	25.883	0.85	1.69	2.51 (S,1Z,6Z)-8-Isopropyl-1-methyl-5-methylene
8	26.203	0.65	1.10	2.94 .alpha.-Farnesene
9	34.499	1.34	2.95	2.27 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylh
10	42.920	0.10	0.20	2.37 Di-n-octyl phthalate

Figura 10. Cromatograma de gases de *T. filifolia* (Inquisivi)



ANEXO 10



Peak#	R. Time	Area%	Height%	Peak Report TIC Name
1	15.209	0.47	0.93	7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl-
2	17.801	0.26	0.50	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)-
3	19.228	8.97	17.30	Estragole
4	20.632	0.21	0.39	Benzaldehyde, 4-methoxy-
5	21.479	88.85	78.78	Anethole
6	25.889	0.67	1.21	Germacrene D
7	26.209	0.57	0.90	.alpha.-Farnesene

Figura 11. Cromatograma de gases de *T. filifolia* (Tintilaya)

ANEXO 11

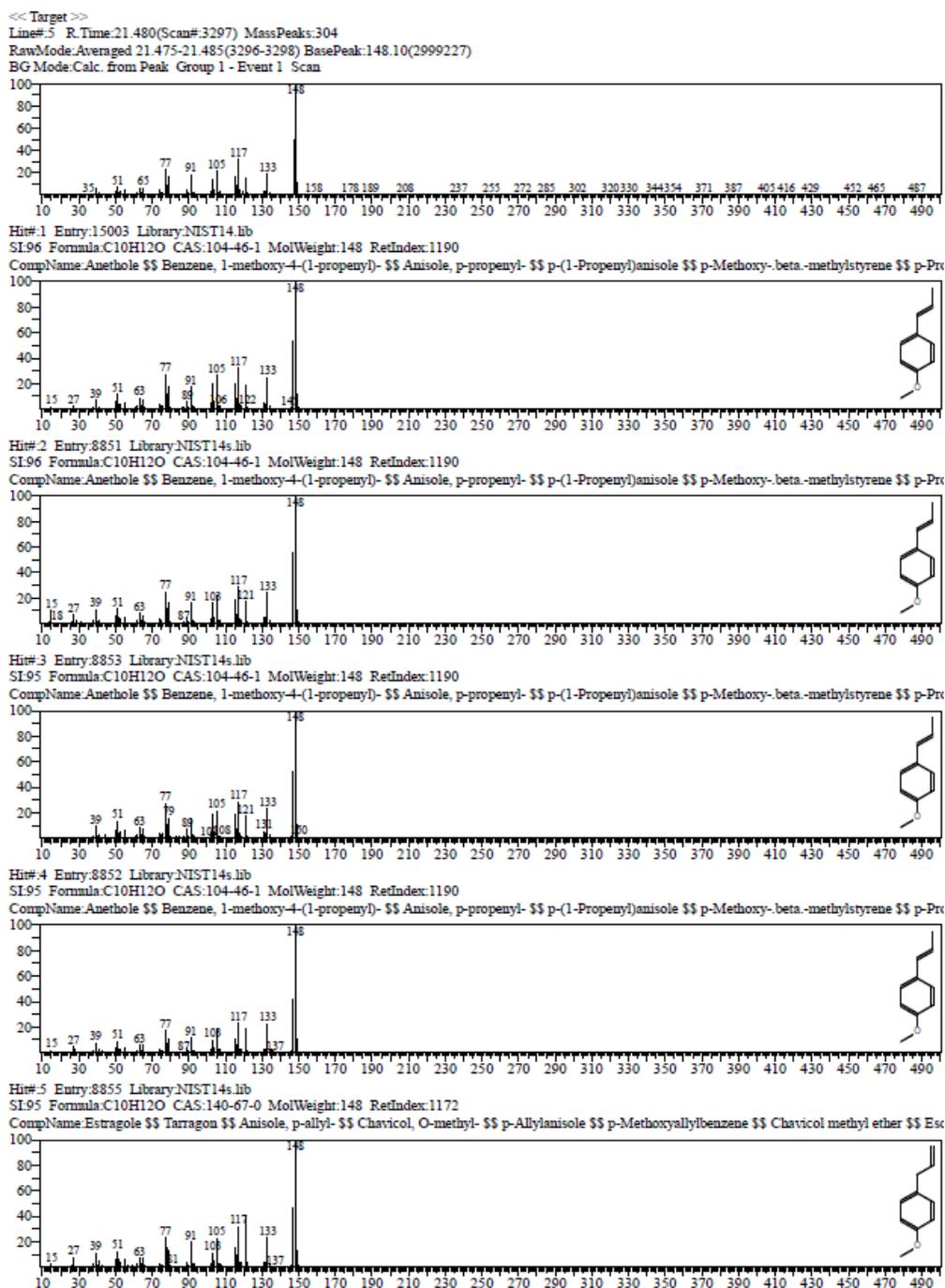
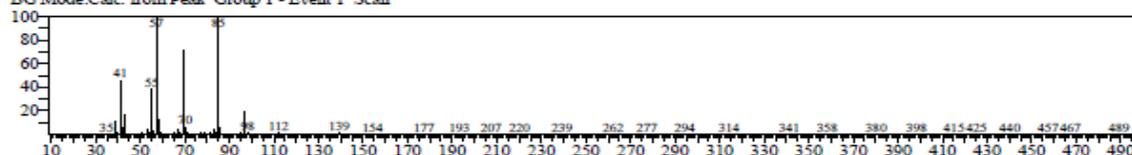


Figura 12. Comparación del espectro de anetol con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas

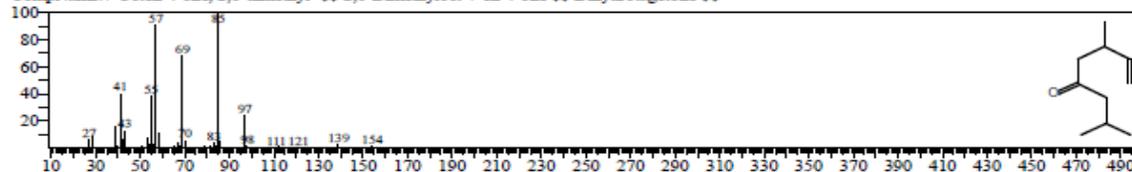
ANEXO 13

<< Target >>

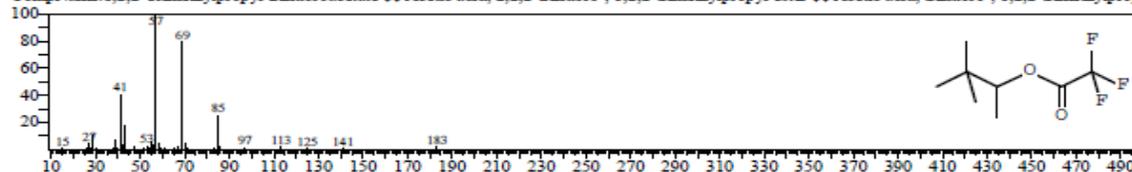
Line#:4 R.Time:15.225(Scan#:2046) MassPeaks:316
 RawMode:Averaged 15.220-15.230(2045-2047) BasePeak:85.10(2767455)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



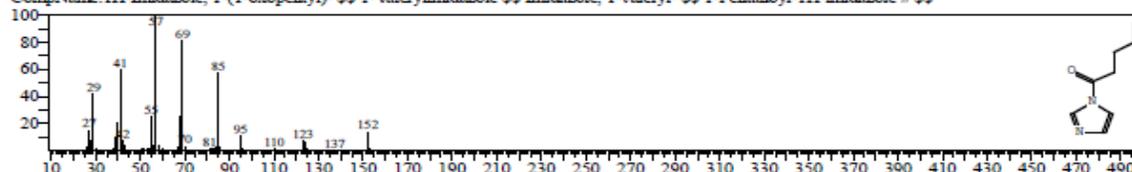
Hit# 1 Entry:18109 Library:NIST14.lib
 SI:97 Formula:C10H18O CAS:1879-00-1 MolWeight:154 RetIndex:0
 CompName:7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl- \$\$ 2,6-Dimethyloct-7-en-4-one \$\$ Dihydrotagetone \$\$



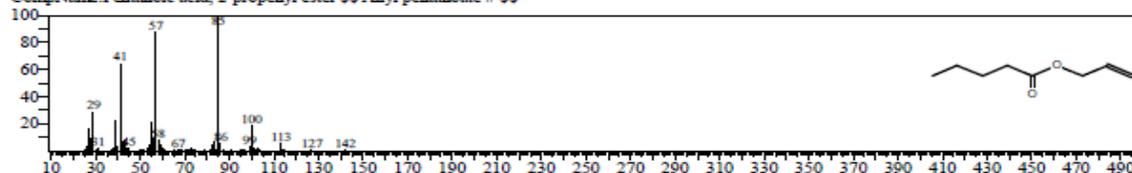
Hit# 2 Entry:45032 Library:NIST14.lib
 SI:86 Formula:C8H13F3O2 CAS:116465-21-5 MolWeight:198 RetIndex:0
 CompName:1,2,2-Trimethylpropyl trifluoroacetate \$\$ Acetic acid, 2,2,2-trifluoro-, 1,2,2-trimethylpropyl ester \$\$ Acetic acid, trifluoro-, 1,2,2-trimethylpropyl



Hit# 3 Entry:16531 Library:NIST14.lib
 SI:85 Formula:C8H12N2O CAS:69393-13-1 MolWeight:152 RetIndex:1249
 CompName:1H-Imidazole, 1-(1-oxopentyl)- \$\$ 1-Valerylimidazole \$\$ Imidazole, 1-valeryl- \$\$ 1-Pentanoyl-1H-imidazole # \$\$



Hit# 4 Entry:7834 Library:NIST14s.lib
 SI:85 Formula:C8H14O2 CAS:6321-45-5 MolWeight:142 RetIndex:974
 CompName:2-Propenyl pentanoate \$\$ Allyl pentanoate # \$\$



Hit# 5 Entry:11344 Library:NIST14.lib
 SI:85 Formula:C8H12O2 CAS:0-00-0 MolWeight:140 RetIndex:917
 CompName:Prop-2-en-1-yl 2-methylbutanoate

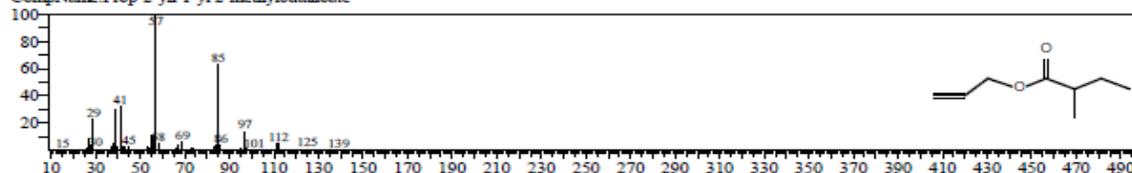
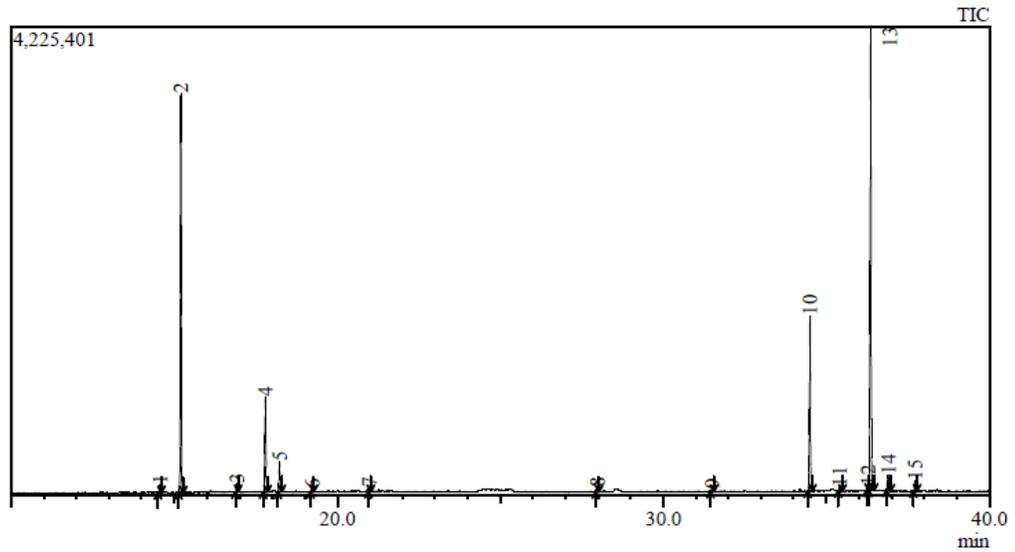


Figura 14. Comparación del espectro de dihidro tagetona con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas

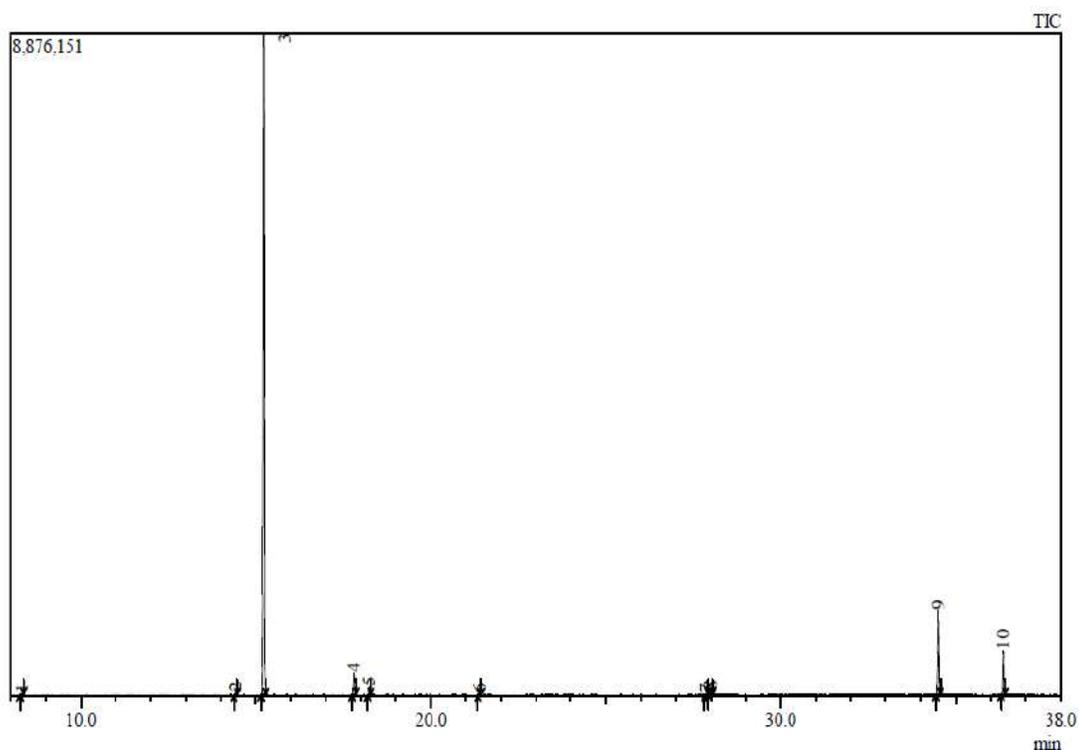
ANEXO 14



Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area%	Height%	A/H Name
1	14.561	0.71	0.64	2.50 Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-,
2	15.203	31.86	32.61	2.19 7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl-
3	16.926	0.62	0.65	2.17 1,5-Heptadien-4-one, 3,3,6-trimethyl-
4	17.795	7.98	7.72	2.32 5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)-
5	18.231	2.52	2.41	2.35 Cyclopentanecarboxylic acid, 4-pentadecyl e:
6	19.226	0.22	0.20	2.50 Elsholtzia ketone
7	20.971	0.33	0.32	2.31 1-Cycloheptenecarboxamide, N-phenyl-
8	27.978	0.37	0.34	2.43 Caryophyllene oxide
9	31.502	0.27	0.19	3.26 Cyclononasiloxane, octadecamethyl-
10	34.504	13.97	14.30	2.19 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylh
11	35.415	0.39	0.27	3.15 Limonen-6-ol, pivalate
12	36.285	0.29	0.31	2.14 Chrysantenyl 2-methuylbutanoate
13	36.364	38.11	37.94	2.26 Chrysantenyl 2-methuylbutanoate
14	36.900	1.43	1.27	2.52 1,5-Heptadien-4-one, 3,3,6-trimethyl-
15	37.731	0.94	0.83	2.55 2,2,6-Trimethyl-6-(4-methylcyclohex-3-en-1-

Figura 15. Cromatograma de gases de *T. terniflora* (Inquisivi)

ANEXO 15



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area%	Height%	Name
1	8.316	0.23	0.15	Butanoic acid, 3-methyl-
2	14.416	0.23	0.23	o-Cymene
3	15.218	79.91	80.10	7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl-
4	17.798	2.63	2.55	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)-
5	18.235	0.95	0.92	Cyclopentanecarboxylic acid, 4-pentadecyl ester
6	21.394	0.18	0.14	Estragole
7	27.850	0.14	0.09	(-)-Spathulenol
8	27.979	0.52	0.46	Caryophyllene oxide
9	34.498	9.77	10.06	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylhexyl ester
10	36.351	5.44	5.29	Chrysantenyl 2-methylbutanoate

Figura 16. Cromatograma de gases de *T. terniflora* (Tintilaya)

ANEXO 16

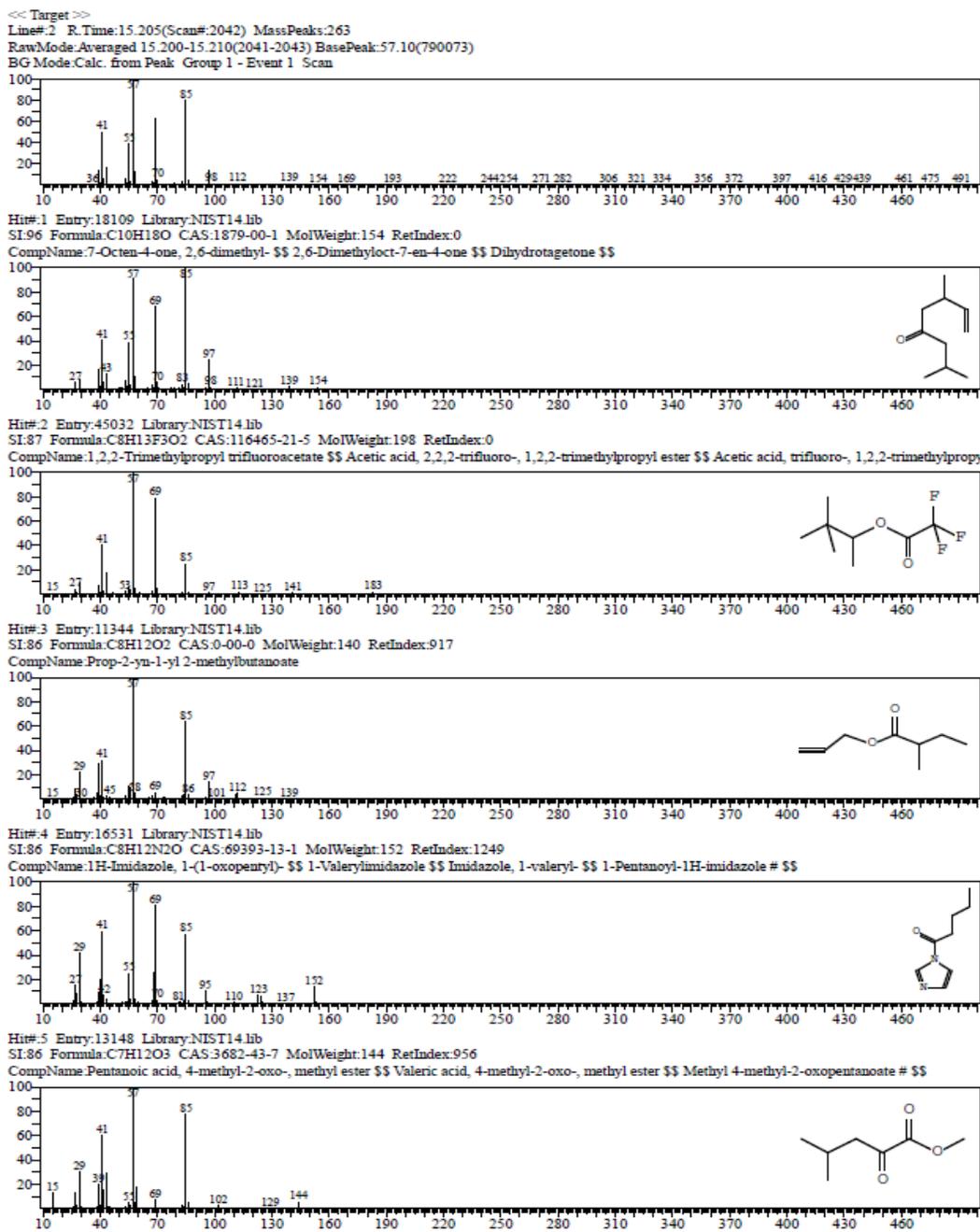
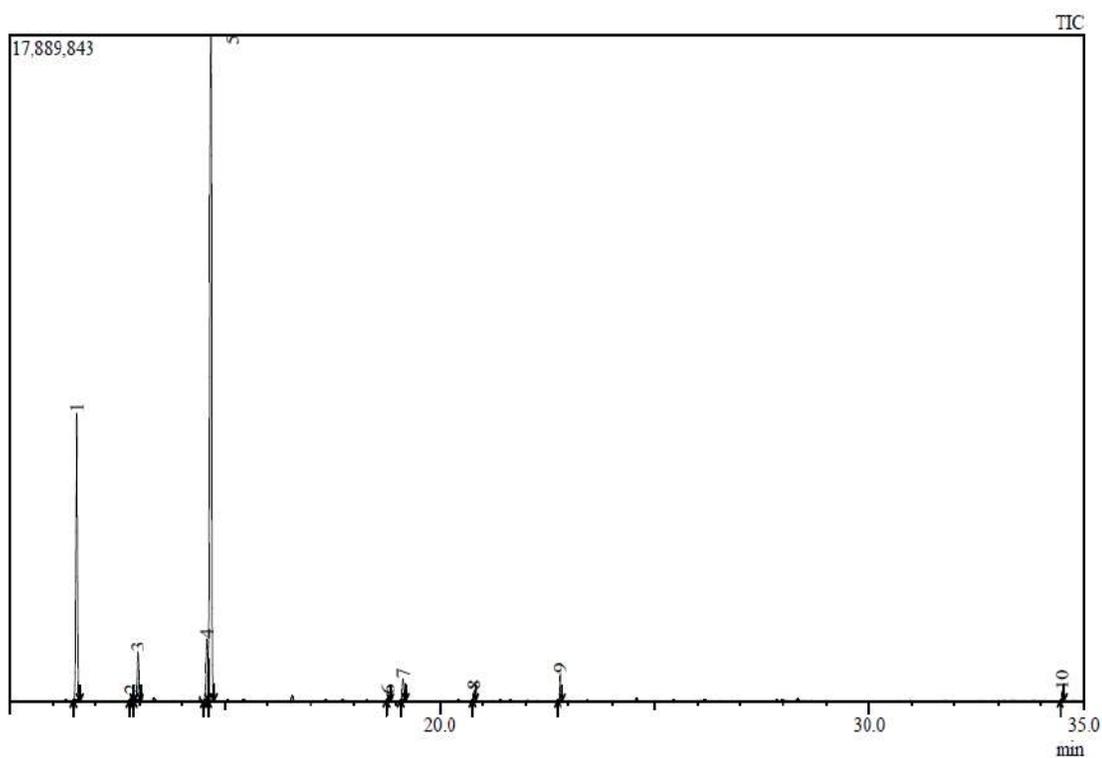


Figura 17. Comparación de espectro de dihidro tagetona con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas

ANEXO 17



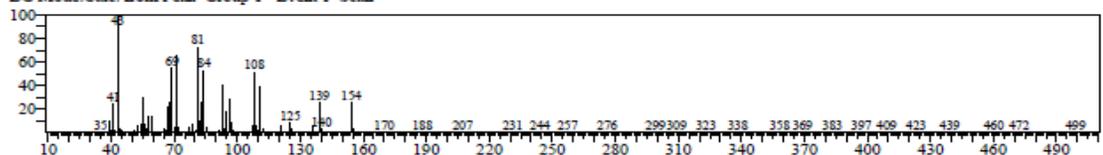
Peak Report TIC				
Peak#	R. Time	Area%	Height%	A/H Name
1	11.546	20.62	25.19	2.31 (1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-en
2	12.822	0.38	0.45	2.37 Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-metl
3	12.970	3.61	4.24	2.41 beta.-Pinene
4	14.590	5.42	5.35	2.86 D-Limonene
5	14.677	64.68	58.34	3.13 Eucalyptol
6	18.792	0.39	0.47	2.35 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methyleth
7	19.154	1.61	1.88	2.42 .alpha.-Terpineol
8	20.798	0.70	0.91	2.17 Cyclopentane, 2-propenyl-
9	22.803	1.96	2.36	2.34 .alpha.-Terpinyl acetate
10	34.494	0.64	0.80	2.24 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-ethylh

Figura 18. Cromatograma de gases de *M.osteomeloides* (Inquisivi)

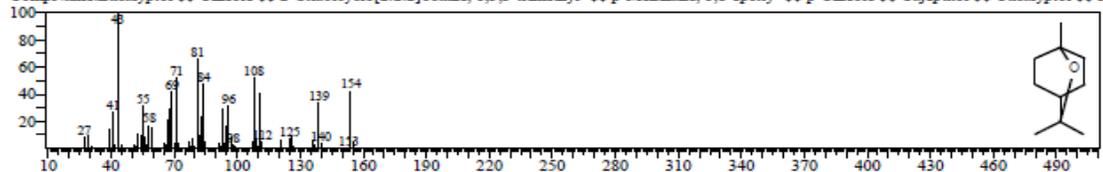
ANEXO 18

<< Target >>

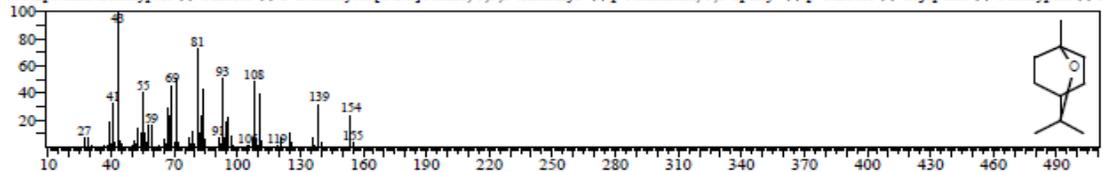
Line# 5 R.Time:14.675(Scan#:1936) MassPeaks:265
RawMode:Averaged 14.670-14.680(1935-1937) BasePeak:43.00(1976044)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



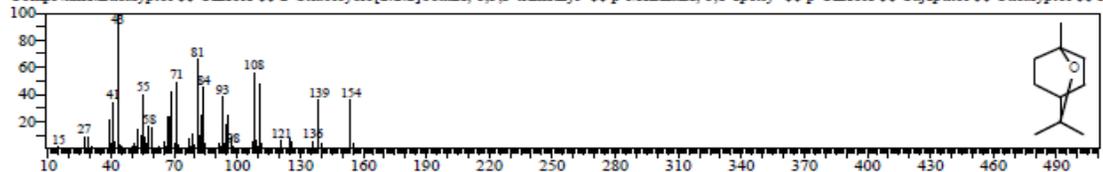
Hit# 1 Entry:10306 Library:NIST14s.lib
SI:95 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059
CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Cucalyptol \$\$\$



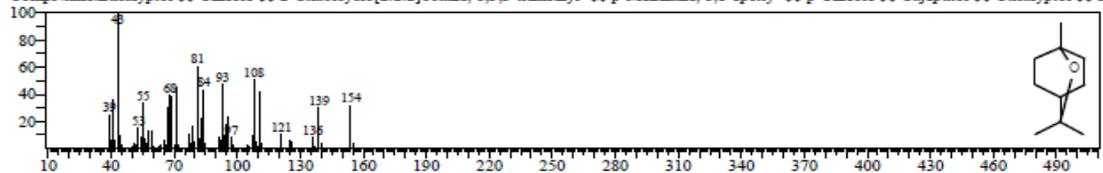
Hit# 2 Entry:10304 Library:NIST14s.lib
SI:95 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059
CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Cucalyptol \$\$\$



Hit# 3 Entry:17977 Library:NIST14s.lib
SI:95 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059
CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Cucalyptol \$\$\$



Hit# 4 Entry:10307 Library:NIST14s.lib
SI:92 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059
CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Cucalyptol \$\$\$



Hit# 5 Entry:10305 Library:NIST14s.lib
SI:91 Formula:C10H18O CAS:470-82-6 MolWeight:154 RetIndex:1059
CompName:Eucalyptol \$\$ Cineole \$\$ 2-Oxabicyclo[2.2.2]octane, 1,3,3-trimethyl- \$\$ p-Menthane, 1,8-epoxy- \$\$ p-Cineole \$\$ Cajeputol \$\$ Cucalyptol \$\$\$

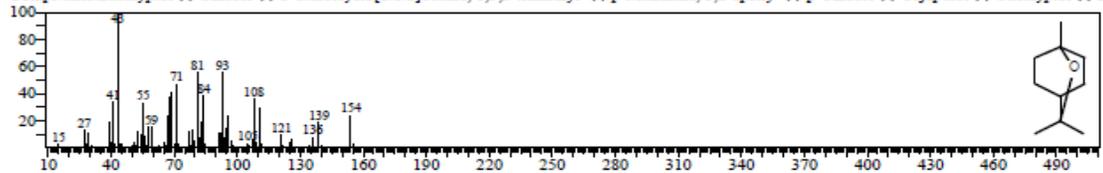


Figura 19. Comparación del espectro de eucaliptol con el espectro de la biblioteca de espectrometría de masas

ANEXO 19
CURVA DE CALIBRACION DE PIROGALOL

LINEALIDAD					
PATRON	PIROGALOL				
PRINCIPIO ACTIVO	PIROGALOL				
CONCENTRACION	98%				
LONGITUD DE ONDA	723,0 nm				
ESPECTROFOTOMETRO	PERSEE UV-Vis doble haz				
METODO	COLORIMETRICO				
DETERMINACION	CONCENTRACION (mg/L)	RESPUESTA ANALÍTICA	X²	Y²	X*Y
1	1,0100	0,131	1,020	0,017	0,132
2	2,1300	0,203	4,537	0,041	0,432
3	2,1300	0,213	4,537	0,045	0,453
4	2,1300	0,211	4,537	0,044	0,449
5	2,9300	0,294	8,585	0,086	0,861
6	2,9300	0,288	8,585	0,083	0,843
7	2,9300	0,274	8,585	0,075	0,802
8	4,0000	0,386	16,000	0,149	1,544
9	4,0000	0,383	16,000	0,149	1,532
10	4,0000	0,383	16,000	0,149	1,532
11	5,3300	0,510	28,409	0,260	2,718
12	5,3300	0,504	28,409	0,254	2,686
13	5,3300	0,508	28,409	0,258	2,707
14	8,0000	0,740	64,000	0,547	5,920
15	8,0000	0,742	64,000	0,550	5,936

16	8,0000	0,767	64,000	0,588	6,136
17	1,0100	0,138	1,020	0,019	0,139
18	1,0100	0,131	1,020	0,017	0,132
SUMA	70,200	6,806	367,652	3,329	34,960
	Intercepto	Pendiente	r	r²	
	0,0284	0,0896	0,9987	0,9974	

Figura 20. Calibración de pirogalol



ANEXO 20

Formato de encuesta de aceptación del gel

ENCUESTA		Composición						
GEL TERAPEUTICO "MYRTUS"		Carbopol Agua destilada Trietanolamina Glicerina A.E. Arrayan						
Femenino <input type="checkbox"/>	Masculino <input type="checkbox"/>	Edad <input style="width: 50px;" type="text"/>						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; text-align: center;">1</td><td>En desacuerdo</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td><td>De acuerdo</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td><td>Completamente de acuerdo</td></tr> </table>		1	En desacuerdo	2	De acuerdo	3	Completamente de acuerdo	
1	En desacuerdo							
2	De acuerdo							
3	Completamente de acuerdo							
1.- ¿Le resulta agradable la textura del producto al aplicarlo?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
2.- ¿Le resulta agradable el olor del producto al aplicarlo?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
3.- ¿El producto hidrata correctamente en la aplicación a su piel?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
4.- ¿Ha notado mejoría en el estado general de su inflamación dolor.....?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
5.- ¿Le resulto el producto de aplicación rápida y sencilla?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
6.- ¿El producto se aplicaba uniformemente?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
7.- Comparando con cremas antiinflamatorias ¿Le gusta más este producto?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
8.- ¿Compraría este producto?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
9.- ¿Recomendaría este producto?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3				
1								
2								
3								
10.- ¿Le ha gustado este producto?	<table border="1" style="width: 30px; height: 30px; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td></tr> </table>	1	2	3	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> <p style="text-align: center;">.....</p> <p style="text-align: center;">Aceptación de prueba</p> </div>			
1								
2								
3								
<p>Que recomendación daría para mejorar el producto?</p> <p>.....</p>								

Figura 21. Formato de encuesta

ANEXO 21

Prueba de aceptación del gel y llenado de encuesta

