

# **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” SOBRE PULGAS DE AGUA DEL GÉNERO DAPHNIA, AYACUCHO, 2019**

**Raúl A. Mamani Aycachi**

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas  
Programa de Investigación en Biodiversidad y Gestión Ambiental, Sub Programa de Gestión Ambiental.  
E-mail: profmamani@hotmail.com

## **RESUMEN**

En el presente estudio se evaluaron la toxicidad aguda del aceite esencial extracto hidroalcohólico de hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre pulgas de agua del género *Daphnia*. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre *Daphnia* sp es 737.682 ppm. Fueron identificados los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante un tamizaje fitoquímico cuyos resultados nos indican abundante cantidad para esteroides y cantidad regular para alcaloides. Se ha realizado la identificación taxonómica de las especies en laboratorio Huamanguensis de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Palabras clave: actividad biocida, toxicidad aguda, dosis letal media.

# **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” SOBRE PULGAS DE AGUA DEL GÉNERO DAPHNIA, AYACUCHO, 2019**

## **ABSTRACT**

This study evaluated the acute toxicity of essential oil of leaves of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" on water fleas of the genus *Daphnia*. The mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of the essential oil of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" leaves on *Daphnia* sp is 737,682 ppm. The main groups of secondary metabolites present in the extract were identified through a phytochemical screening, the results of which indicate an abundant amount for steroids and a regular amount for alkaloids. Taxonomic identification of the species in Huamanguensis laboratory of the Faculty of Biological Sciences of the National University of San Cristóbal de Huamanga has been carried out.

Keywords: Biocidal activity, acute toxicity, average lethal dose.

## **INTRODUCCIÓN**

El efecto curativo de las plantas aromáticas que contienen aceites esenciales se conoce desde antes de la era cristiana, siendo reconocidas por Hipócrates (460 – 370 AC). En el curso de la historia los aceites esenciales siempre se aplicaron en la medicina tradicional por sus efectos antimicrobianos. En la actualidad, son utilizados por su amplio espectro de actividades biológicas y terapéuticas (espasmolítico, antioxidante, psicotrópica, expectorante, antitumoral y antidiabética entre otras). A su vez, su uso se ha difundido a varios campos, principalmente en la industria cosmética, en la medicina alternativa, en la elaboración de productos de limpieza, aromatizantes y en la industria alimenticia (aromas, sabores y conservantes).

En la agricultura, el uso de compuestos botánicos que incluyen a los aceites esenciales para el control de plagas y enfermedades no es algo nuevo. Se cree que puede haber empezado con la domesticación de las plantas, aunque a partir de la revolución verde, fueron desconsiderados a causa de que los fungicidas sintéticos demostraron ser eficientes, fáciles de usar y de bajo costo. No obstante, en la actualidad existen varias restricciones y cuestionamientos a esta práctica, ya que algunos fungicidas sintéticos pueden causar daños en la salud de los consumidores, en el medio ambiente o dejan de ser efectivos por que los hongos tienen la capacidad de generar resistencia a los mismos.

La obtención de aceite esencial con principios biocidas a partir del follaje de plantas nativas, se presenta como una alternativa en este trabajo de investigación, cuyos objetivos fueron los siguientes:

### **Objetivo General**

Determinar la toxicidad aguda del aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre pulgas de agua del género *Daphnia*, Ayacucho, 2019.

## Objetivos específicos

- Determinar la concentración letal media del aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre pulgas de agua de género *Daphnia*.
- Establecer las características fitoquímicas del aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre pulgas de agua de género *Daphnia*.
- Extraer el aceite esencial de hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Ubicación de la zona de estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Área Académica de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de enero a diciembre del 2019.

### 2. Población y muestra

#### 2.1. Población

La población constituida por plantones de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” del distrito de Ayacucho provincia de Huamanga, de la Región Ayacucho. ubicado a 2760 m.s.n.m.

#### 2.2. Muestra

Material biológico colectada en las zonas altas del cerro picota, del distrito de Ayacucho, para lo cual se acopio plantones de “tacsana”, los cuales fueron transportados al laboratorio, de donde se obtuvo 5 Kg de hojas.

### 3. Métodos

#### 3.1. Preparación de material biológico

El material biológico es lavado cuidadosamente con agua corriente en el laboratorio, luego retiradas las hojas sanas y completas, pesado en fresco y secadas a la sombra, proceso de 30 días.

#### 3.2. Obtención de aceite esencial

Se peso 5 kg de hojas de *Colletia spinosissima*, Gmelin “tacsana” previamente seleccionas manualmente, considerando una buena presentación de la muestra, luego fueron colocadas en el equipo de arrastre de vapor para su procesamiento correspondiente.

#### 3.3. Destilación por arrastre de vapor.

Las plantas se colocaron sobre un fondo perforado ubicado a cierta distancia del fondo de un tanque. La parte más baja de esta contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal. Los componentes se volatilizan, y condensan en un refrigerante, siendo recogidos en un matraz, donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad.

#### 3.4. Caracterización fitoquímica

La metodología utilizada para la marcha fitoquímica fue la propuesta por la Dra. Migdalia Miranda Martínez- Cuba.

Se realizaron ensayos en los que se evaluó la formación de precipitado y complejos coloreados, que permiten determinar la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, amins, cumarinas, quinonas, alcaloides, triterpenos, esteroides y flavonoides. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando reactivos de Mayer's, Dragendorff, Wagner, Prueba de Borntrager, Prueba de la espuma y otros.

El método que se utilizó para el tamizaje de las muestras fue el descrito por la Dra. Migdalia Miranda Martínez en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Universidad de la Habana Cuba (Miranda, 2000).

#### 3.5. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>)

Para calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y sus respectivos límites de confianza al 95% se utilizó el método de análisis Probit con el apoyo del paquete estadístico MINITAB 16, para cuyo efecto fue elaborada una base de datos de los resultados de mortalidad halladas en las pruebas experimentales.

El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal, y con el objetivo de conocer la relación que existe entre la variable concentración del aceite esencial y la variable respuesta= mortalidad, en un determinado tiempo. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad) se transforma a unidades Probit (eje Y) y la concentración de toxicidad aguda se transforma logarítmicamente (eje X). Los resultados se interpolan al 50% de la respuesta y de esa manera se puede determinar que concentración posee toxicidad aguda al CL<sub>50</sub>.

### 3.6. Diseño de investigación

El diseño de investigación fue experimental, adecuado a una factorial de A x B; donde A= Individuos de pulgas de agua, B= Concentraciones de aceite esencial.

### 3.7. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda del aceite esencial de *Colletia spinosissima* J. F. Gmelin, en el control de pulgas de agua, se calculó la mortalidad para cada dosis formulada a través de la aplicación de la siguiente ecuación:

#### Porcentaje de mortalidad

$$\% \text{ porcentaje de mortalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de individuos muertas}}{\text{N}^\circ \text{ de individuos expuestos}} \times 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Extracción de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”

Mediante la utilización de peras de vidrio se procede a la separación del extracto acuoso del aceite esencial por decantación, mediante el proceso de arrastre por vapor.



**Fig. 1** Método de separación de la fracción de aceite esencial del extracto acuoso de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”

**Tabla 1.** Mortalidad de *Daphnia* sp “pulgas de agua” por aplicación de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

Concentración (ppm)	Número de individuos muertos				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio	%
100	0	0	1	0,33	3,00
300	1	2	2	1,67	17,00
500	3	3	4	3,33	33,00
800	5	7	6	6,00	60,00
1000	7	8	8	7,67	77,00
1200	7	9	9	8,33	83,00

**Tabla 2.** Límite superior, límite inferior y concentración letal de mortalidad de *Daphnia* sp “pulgas de agua” a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

Porcentaje %	Límite Inferior	Límite Superior	CLn (ppm)
10	-237.102	405.719	84.3085
20	65.7134	551.483	308.5982
30	272.357	668.296	470.3265
40	434.336	782.700	608.518
<b>50</b>	<b>568.016</b>	<b>907.347</b>	<b>737.6815</b>
60	683.195	1050.500	866.8475
70	790.084	1219.990	1005.037
80	901.722	1431.810	1166.766
90	1044.01	1738.110	1391.06
99	1359.69	2487.750	1923.72

Fuente: Elaboración propia.

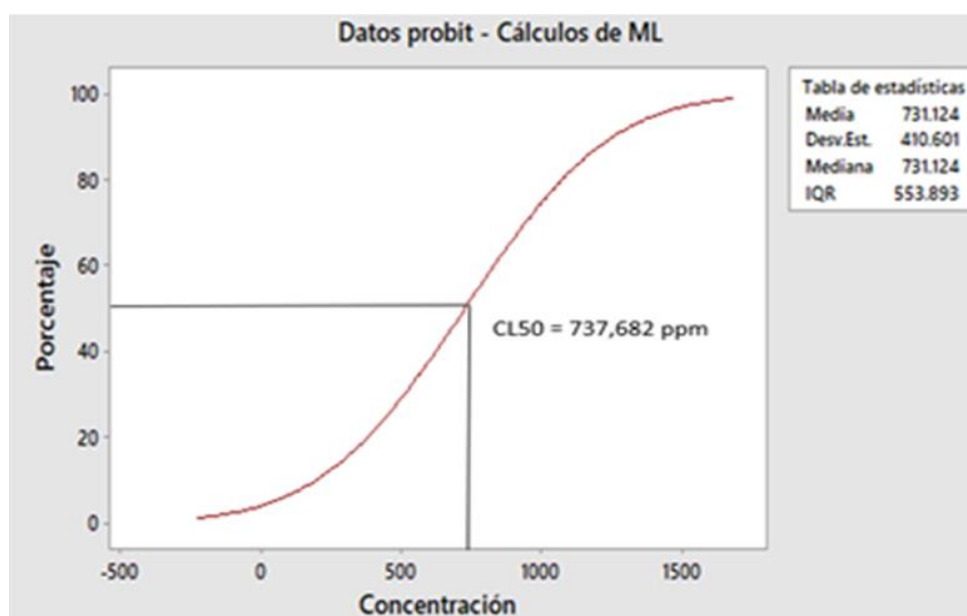


Fig. 2 Análisis Probits de mortalidad de *Daphnia* sp “pulgas de agua” por aplicación de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de principios bioactivos del aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”. Ayacucho, 2019.

Metabolito	Prueba fitoquímica	Extracto etanólico
Saponinas	Espuma	-
Esteroides	Liberman- Burchard	+++
Taninos	Gelatina	+
Flavonoides	Shinoda	+
Carbohidratos	Molish	+
Quinonas	Bortranger	---
Alcaloides	Dragendorff.	++

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

(--) Ausencia

(+) Poca cantidad

(++) Regular cantidad

(++++) Abundante cantidad

Los resultados de la investigación realizada, según la fig N°01, indican la separación mediante peras de vidrio el aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" por decantación, precedidos del método de arrastre por vapor.

Fernández y et al (2013) el arrastre por vapor es considerado en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática. Se caracteriza ser un sistema cerrado en donde el solvente o material extraído "devueltos o retornados" al balón de destilación en un proceso que se repite hasta que se haya considerado la total extracción del aceite esencial. Este proceder resulta particularmente efectivo cuando los aceites esenciales a extraer resultan parcialmente solubles en agua, o en su defecto cuando se desconoce su solubilidad en este solvente.

En la tabla 1, referido a la mortalidad de *Daphnia* sp "pulgas de agua" por aplicación de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", podemos resaltar que a medida se incrementa la concentración de aceite esencial se va incrementado el número de individuos muertos.

Reyes y col (2012) manifiesta en su investigación titulada "Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de eucalyptus sobre rhyzopertha dominica y su efecto en enzimas digestivas de progenies La fracción volátil de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis* fueron utilizadas para evaluar su actividad insecticida sobre el barrenador menor de los granos *Rhyzopertha dominica*, encontrando que la fracción volátil de los aceites esenciales de eucalipto, especialmente la de *E. globulus*, es un agente insecticida efectivo para el control de *R. dominica* en trigo almacenado.

En la tabla 2 se indica el límite superior, límite inferior y concentración letal de mortalidad de *Daphnia* sp "pulgas de agua" a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". Se detalla valores porcentuales de concentración de aceite esencial de hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" con su respectiva concentración letal y límites superiores e inferiores de concentración.

En la figura 3 sobre el análisis probits de mortalidad de *Daphnia* sp "pulgas de agua" por aplicación de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". De la figura podemos manifestar que la  $CL_{50}$  es 737,682 ppm, siendo este un valor cercano a la media que reporta 731,124 ppm.

Jaramillo y col (2007) en su investigación "Composición química volátil y toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) frente a *Artemia* salina del aceite esencial del *Croton malambo* colectado en la costa norte colombiana." Manifiesta que los aceites obtenidos fueron utilizados para la determinación de su efecto toxicológico frente a *Artemia* salina dando como resultado una  $CL_{50}$  de 15,32 y 3,20  $\mu\text{g/mL}$  después de ser expuestas por 24 y 48 horas respectivamente.

En la tabla 3 sobre tamizaje fitoquímico de principios bioactivos del aceite esencial de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", podemos resaltar la presencia en abundante cantidad de esteroides y en regular cantidad alcaloides.

Maldonado y col (2007) en su investigación titulada "Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) *McVaugh*, *Myrtaceae*, y evaluación de su actividad biológica." manifiesta que la investigación fitoquímica a través del tamizaje del aceite esencial de arrayán evidencia la presencia de diversos compuestos químicos, entre los que se destacan alcaloides, azúcares y compuestos fenólicos, obteniéndose el aceite esencial de las hojas de arrayán mediante la técnica de arrastre de vapor, con un rendimiento del 2% de extracción del material vegetal seco y pulverizado.

Se concluye señalando:

1. La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del aceite esencial de hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" sobre *Daphnia* sp es 737.682 ppm
2. El tamizaje fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", indica abundante cantidad de esteroides y alcaloides en regular cantidad.
3. El método de arrastre por vapor y luego la pera de decantación, fueron los procedimientos aplicados para la extracción de aceite esencial de las hojas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana".

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albo, G, Henning, C, Reynaldi, F, Ringuelet, J, Cerimele, (2010) E. Dosis Letal Media (DL50) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaeraapis* en *Apis mellifera*L.. REDVET.

- Revista Electrónica de Veterinaria [Internet]. 2010;11(10):1-12. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63615698005>
2. Álvarez, David (2015) *Actividad biocida del aceite esencial de Lippia Origanoides H.B.K sobre algunos fitopatógenos de papa (Solanum Tuberosum L.)*. Maestría thesis, Universidad de Nariño. Disponible en URL: <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/90634.pdf>
  3. Aular, Y, Villamizar, M, Pérez, Y, Pérez, V. (2016) Composición química y toxicidad aguda oral del aceite esencial de Lippia alba en ratones. *Salus* [Internet]. 2016;20(1):43-51. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375946213008>.
  4. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>.
  5. Cabrera, A. (1953) "Manual de la Flora de los alrededores de Buenos Aires". Primera Edición. Buenos Aires Universidad Nacional de la Plata, p 106.
  6. Fernández-Sánchez, Félix y Marín-Morán, Jorge Eric y Teixeira-Pinto, Zeneida y de Carvalho-Queiroz, Margareth María y Escalona-Arranz, Julio César y (2013), "Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea Morelet* var. *caribaea* (droga seca)." *Revista Cubana de Química*, Vol. XXV, núm.1, pp.100-108 [Consultado: 5 de mayo de 2020]. ISSN: 0258-5995. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4435/443543730013>.
  7. Gañan, N. (2014) "Extracción y Fraccionamiento de Biocidas de origen natural mediante el uso de fluidos supercríticos" Tesis de Doctor de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca Argentina. 2014. Disponible en URL: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/532/1/TESIS%20Ga%C3%B1an%20N.%202014.pdf>
  8. Hoss, Reinhart (1999) "Recursos botánicos con Potencial Biocida; Conceptos básicos y Métodos de análisis. Ira edición. Lima Perú: Red de Acción en Alternativa al uso de agroquímicos (RAAA), 80 pp.
  9. Hostettmann, K. y et al (2008) "Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos" Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología. Bogotá. Colombia. ISBN: 978-958-698-210-8.
  10. Jaramillo-Colorado, B. y Duarte-Restrepo, E. y Pino-Benítez, N. (2015). Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia. *Revista de Toxicología*, [en línea] 32(2), pp.112-116. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91942717007>
  11. Lock, O. (2016) "Investigación Fitoquímica; Métodos en el estudio de productos naturales" Tercera edición. Pontificia Universidad Católica del Perú.
  12. Maldonado R., M. y Dacarro, C. (2007). Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthesrhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, y evaluación de su actividad biológica. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, [en línea] (6), pp.17-24. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047390004>.
  13. Martínez, F., (2008) Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia Daphnidae disponible en URL: [http://www.sepi.ench.ipn.mx/ofertaeducativa/maestria\\_cqb/documents/mart\\_nez\\_jer\\_nimo\\_felipe\\_fer.pdf](http://www.sepi.ench.ipn.mx/ofertaeducativa/maestria_cqb/documents/mart_nez_jer_nimo_felipe_fer.pdf).
  14. Mendoza-Meza, D. y Benavides-Henríquez, H. y Taborda-Martínez, M. (2014). Actividad acaricida del aceite esencial de la corteza de *Croton malambo* H. Karst, metil-eugenol y metil-isoeugenol contra *Dermatophagoidesfarinae* Hughes, 1961. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, [en línea] 13(6), pp.537-544. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85632545004>.
  15. Miranda, M. (2000) "Manual de prácticas de laboratorio; Farmacognosia y Productos Naturales" Ciudad Habana. Cuba.
  16. Murillo, E.; y col. (2007) "Fitoquímica Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios". Ibagué Universidad del Tolima, p 301.
  17. Ochoa, K. Pumaylle, L. Paredes, D. Bejarano, L. Luján. Silva, J. (2012) Extracción, Caracterización y Evaluación de la Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Seneciograveolens* Wedd (Wiskataya) *Scientia Agropecuaria Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Trujillo*. URL Disponible en: [www.sci-agropecu.unitru.edu.pe](http://www.sci-agropecu.unitru.edu.pe).
  18. Peredo – Luna (2009) *Aceites esenciales: Métodos de extracción*. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla san Andres Cholula, Puebla. Mexico. Disponible en: URL [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
  19. Ratera. (1980) *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Pág. 108. Disponible en URL: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-003.pdf>.
  20. Ratera. (1980) *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Pág. 108. Disponible en URL: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-003.pdf>.
  21. Reyes-Guzmán, R. y Borboa-Flores, J. y Cinco-Moroyoqui, F. y Rosas-Burgos, E. y Osuna-Amarillas, P. y Wong-Corral, F. y Ortega-Nieblas, M. y León-Lara, J. (2012). Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de *Eucalyptus* sobre *Rhyzopertha dominica* y su efecto en enzimas digestivas de progenies. *Revista*

- Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, [en línea] 18(3), pp.385-394. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62926234010>.
22. Rojas Armas Juan, Palacios Agüero Olga, Ortiz Sánchez José Manuel, López de la Peña Leavit. Evaluación de la toxicidad del aceite esencial de *Aloysiatriphylla britton* (cedrón) y de la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* del citral, in vivo. An. Fac. med. [Internet]. 2015 abr [citado 2019 Abr 11]; 76(2): 129-134. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832015000300004&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832015000300004&lng=es).  
<http://dx.doi.org/10.15381/anales.v76i2.11137>.
23. Rojas Armas, J, Ortiz Sánchez, J, Jáuregui Maldonado, J, Ruiz Quiroz, J, Almonacid Román, R. Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema. Anales de la Facultad de Medicina [Internet]. 2015;76(3):235-240. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37942607002>.
24. Silbergeld, E. (1998) Toxicología. Herramientas y enfoques. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>.
25. Valdés-Pérez, O. y Borrego-Alonso, S. y Vivar-González, I. y Anaya-Villalpanda, M. y Molina-Veloso, A. (2016). Actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor en el control del biodeterioro fúngico de documentos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, [en línea] 47(2), pp.78-85. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181245821002>.