



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

“Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts de la provincia de Loja”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Autor: Aldas Palacios, Ana Belén

Director: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D

Loja – Ecuador

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ph.D

Benito Eduardo Valarezo Valdez.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “**Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts de la provincia de Loja**” realizado por: Aldas Palacios, Ana Belén; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2014

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Aldas Palacios Ana Belén declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **“Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts de la provincia de Loja”**, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdéz director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y asus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.....

Aldas Palacios, Ana Belén

1804251492

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño a mi madre y a mis hermanos que han estado siempre conmigo, comprendiéndome, alentándome y ayudándome a salir adelante

Madre, tu que te desvelas por tus hijos, quiero darte las gracias por todas tus bendiciones, por ser ejemplo y líder de nuestro hogar, tu que todo lo puedes, Gracias.

También esto es para ti, amigo y amor; por toda tu ayuda, paciencia y el tiempo que me das sin pedir nada. Por la lucha continua que venimos emprendiendo, esto es por nosotros y para nosotros.

AGRADECIMIENTO

Principalmente a Dios por brindarme la vida y a mi madre por enseñarme a vivirla, por su ejemplo de valores, por la dicha y todo el amor que me has dado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos por ser la alegría, la fuerza y las ganas de siempre volver a mi hogar. Gracias por todos los buenos momentos que me han dado, por la hermandad y gran amistad que tenemos.

A mi novio, Freddy por ser el mejor ejemplo de superación que puedo tener, por todas las veces que te amaneciste ayudándome o dándome ánimos para continuar. Por todo el cariño y la comprensión que me brindas.

A las amigas que he conocido a lo largo del desarrollo de este tema de tesis, por el gran compañerismo, generosidad y todos los buenos momentos que hemos compartido.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y al Ingeniero Eduardo Valarezo, por brindarme sus conocimientos y el tiempo necesario para ir desarrollando este tema de investigación.

Ana

INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO	
1.1. Aceites esenciales.....	6
1.2. Cromatografía de gases.....	7
1.3. Actividad biológica.....	8
1.4. Organismos biológicos.....	9
1.4.1. Bacterias gram-negativas.....	9
1.4.1.1. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	9
1.4.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
1.4.1.3. <i>Proteus vulgaris</i>	10
1.4.1.4. <i>Escherichia coli</i>	10
1.4.1.5. <i>Salmonella typhimurium</i>	11
1.4.2. Bacterias gram-positivas.....	11
1.4.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	11
1.4.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.4.3. Hongos.....	12
1.4.3.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	12
1.4.3.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	12
1.5. Actividad antioxidante.....	13
1.5.1. ABTS ⁺	13

1.5.2. Radical DPPH.....	13
1.6. Plantas aromáticas.....	13
1.7. <i>Clinopodium taxifolium</i> (kunth) govaerts.....	14
1.8. Antecedentes.....	15

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental.....	19
2.2. Recolección de la materia vegetal.....	20
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	21
2.2.2. Selección de la materia vegetal.....	22
2.2.3. Determinación de la Humedad.....	22
2.3. Extracción del aceite esencial.....	22
2.3.1. Determinación del Rendimiento.....	24
2.3.2. Recolección del aceite esencial.....	24
2.3.3. Envasado y almacenado del aceite esencial.....	24
2.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.....	25
2.4.1. Análisis del aceite esencial por de cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas CG/MS y al detector de ionización de llama (FID).....	25
2.4.1.1. Preparación de las muestras.....	26
2.4.1.2. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplado a espectrometría de masas.....	27
2.4.1.3. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.....	28
2.4.1.4. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i> , tanto en la columna polar como en la columna no polar.....	30
2.4.1.5. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	31
2.4.1.6. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID).....	33
2.4.1.7. Cuantificación de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.....	34

2.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	34
2.5.1. Microorganismos empleadas.....	34
2.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica.....	35
2.5.2.1. Microdilución en caldo.....	35
2.5.2.1.1. Preparación de la muestra de aceite esencial.....	35
2.5.2.1.2. Preparación del cultivo bacteriano, “Cultivo Overnight”.....	36
2.5.2.1.3. Suspensión del inóculo bacteriano.....	36
2.5.2.1.4. Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI).....	37
2.5.2.1.5. Inóculo fúngico.....	38
2.5.2.1.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.....	39
2.5.2.2. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.....	39
2.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	40
2.5.1. Preparación de la muestra de aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	41
2.5.2. Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS ⁺	41
2.5.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS ⁺	42
2.5.2.2. Estándar Trolox para ABTS ⁺	42
2.5.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.....	42
2.5.3. Método Radical DPPH'.....	43
2.5.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH'.....	44
2.5.3.2. Estándar Trolox para DPPH'.....	44
2.5.3.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.....	44
2.5.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS ⁺ y DPPH'.....	45
2.6. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.....	46
2.6.1. Densidad relativa.....	46
2.6.2. Índice de Refracción.....	47

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Humedad de <i>Clinopodium taxifolium</i>	49
3.2. Rendimiento de <i>Clinopodium taxifolium</i>	50
3.3. Composición química del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	51
3.3.1. Análisis cualitativo.....	51

3.3.2. Análisis cuantitativo.....	57
3.3.3. Análisis de la composición química mediante espectrometría de masas.....	61
3.4. Actividad Biológica del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	63
3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	63
3.4.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.....	64
3.5. Actividad antioxidante.....	66
3.5.1. Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+.....	66
3.5.1.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.....	66
3.5.1.2. Lectura del estándar de Trolox.....	68
3.5.1.3. Determinación de TEAC de ABTS ⁺	70
3.5.2. Método radical DPPH:.....	71
3.5.2.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.....	71
3.5.2.2. Lectura del estándar de Trolox.....	74
3.5.2.3. Determinación de TEAC de DPPH:.....	76
3.6. Propiedades Físicas.....	76
3.6.1. Densidad relativa.....	76
3.6.2. Índice de refracción.....	77
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXOS	
Anexo 1. Determinación de Humedad.....	88
Anexo 2. Determinación del porcentaje de rendimiento.....	90
Anexo 3. Determinación de la densidad relativa.....	91
Anexo 4. Determinación del índice de refracción.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases.....	8
Figura 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Figura 3. <i>Escherichia coli</i>	11
Figura 4. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figura 5. <i>Trichophyton rubrum</i>	12
Figura 6. Esquema metodológico.....	19
Figura 7. Ubicación del área de recolección de la especie <i>Clinopodium taxifolium</i>	20
Figura 8. Muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i> , en su hábitat natural.....	21
Figura 9. Muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i> , perteneciente al herbario de la UTPL...	21
Figura 10. Explicación gráfica del funcionamiento de un destilador.....	23
Figura 11. Destilador armado.....	24
Figura 12. Aceite envasado y rotulado.....	25
Figura 13. Muestra con sulfato de sodio anhidro.....	26
Figura 14. Muestra en reposo con sulfato de sodio anhidro.....	26
Figura 15. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS.....	28
Figura 16. Condiciones operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX.....	29
Figura 17. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplada a un detector de ionización de llama (FID)	32
Figura 18. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	33
Figura 19. Dilución de aceite esencial y solvente.....	35
Figura 20. Placas de microdilución selladas con parafina previas a la incubación.....	38
Figura 21. Muestras del aceite <i>Clinopodium taxifolium</i> , analizadas mediante método ABTS ⁺	43
Figura 22. Muestras del aceite <i>Clinopodium taxifolium</i> , analizadas mediante método DPPH:.....	45
Figura 23. Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.....	45
Figura 24. Fórmula para calcular TEAC.....	46

Figura 25. Picnómetro con agua destilada.....	47
Figura 26. Picnómetro con aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	47
Figura 27. Perfil cromatográfico en la columna no polar.....	51
Figura 28. Perfil cromatográfico en la columna polar.....	52
Figura 29. Compuestos mayoritarios en columna no polar.....	52
Figura 30. Compuestos mayoritarios en columna polar.....	53
Figura 31. Compuesto NO IDENTIFICADO – Columna no polar DB-5MS.....	61
Figura 32. Compuesto NO IDENTIFICADO – Columna polar HP-INNOWAX.....	62
Figura 33. Gráfica de Cl_{50} de la muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i>	67
Figura 34. Gráfica del estándar de Trolox.....	69
Figura 35. Gráfica de Cl_{50} de DPPH' del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i> ...	72
Figura 36. Muestras del aceite esencial con el reactivo de DPPH'.....	74
Figura 37. Curva de estándar de Trolox.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismo de prueba.....	34
Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.....	36
Tabla 3. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.....	38
Tabla 4. Valor asignado a cada fila en CMI.....	40
Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución.....	41
Tabla 6. Humedad relativa.....	49
Tabla 7. Rendimiento.....	50
Tabla 8. Composición química de <i>Clinopodium taxifolium</i> . Índice de Kovats calculado y de referencia.....	55
Tabla 9. Porcentaje de cada compuesto identificado mediante el detector de ionización de llama (FID). Tanto para la columna no polar (DB-5MS) como polar (HP-INNOWAX).....	58
Tabla 10. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Clinopodium taxifolium</i> ...	63
Tabla 11. CMI antifúngica de los aceites esenciales de <i>Clinopodium taxifolium</i>	65
Tabla 12. Datos ABTS ⁺	66
Tabla 13. Fórmula necesaria para calcular CI ₅₀ de la muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i>	68
Tabla 14. Datos obtenidos para calcular el estándar de Trolox.....	69
Tabla 15. TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) ABTS ⁺	70
Tabla 16. Datos DPPH.....	72
Tabla 17. Ecuación necesaria para determinar CI ₅₀ en DPPH.....	73
Tabla 18. Datos obtenidos para calcular el estándar de Trolox de DPPH.....	75
Tabla 19. TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) DPPH.....	76
Tabla 20. Densidad relativa del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	77
Tabla 21. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Clinopodium taxifolium</i>	78

RESUMEN

Se determino las propiedades químicas, físicas y la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* obtenido por destilación por arrastre con vapor de agua. La composición química del aceite esencial se determinaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/MS y al detector de ionización de llama CG/FID; obteniendo un total de 48 compuestos que representan el 97,20% del aceite esencial, siendo los compuestos mayoritarios: mentha (3,19%), Iso-pulegyl acetate (7,30%), α – Copaene (4,98%), Z-Caryophyllene (24,09%), Germacrene-D (12,82%), Bicyclgermacrene (8,80%) y δ -Cadinene (5,89%). Dentro de las propiedades físicas consta el índice de refracción ($n_D^{20}=1,4904$) y la densidad relativa ($0,9317 \text{ g/cm}^3$). Esta especie no tiene actividad antibacteriana, pero presenta una leve actividad frente al hongo *Trichophyton rubrum* ($500 \mu\text{g/mL}$). Se evaluo también la actividad antioxidante mediante dos métodos: ABTS⁺ y DPPH[·]. para cada método se calculó la concentración media inhibitoria (CI_{50}). *Clinopodium taxifolium* presentó mayor actividad antioxidante con el método de DPPH[·] con un valor de $CI_{50}= 17,15 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$. Frente al método de ABTS⁺ que el valor fue $CI_{50}=7,3 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$.

Palabras Clave: *Clinopodium taxifolium*, cromatografía de gases, compuestos mayoritarios, índice de refracción, densidad relativa, actividad biológica, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The chemical, physical and biological and antioxidant activity of the essential oil obtained by distillation *Clinopodium taxifolium* by stripping with water vapor was determined. The chemical composition of the essential oil were determined by gas chromatography-mass spectrometry GC / MS and the flame ionization detector GC / FID; obtaining a total of 48 compounds representing 97,20% of the essential oil, being the main compounds: mentha (3,19%), Iso-pulegyl acetate (7,30%), α - Copaene (4,98%) , Z-Caryophyllene (24,09%), Germacrene-D (12,82%), Bicyclogermacrene (8.80%) and δ -cadinene (5.89%). Among the physical properties has the refractive index ($n_D^{20} = 1,4904$) of and the relative density (0,9317 g / cm³). This species has no antibacterial activity, but has a slight activity against *Trichophyton rubrum* (500 μ g/mL). Antioxidant activity was also assessed by two methods: ABTS⁺ and DPPH \cdot . for each method DPPH \cdot mean inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. *Clinopodium taxifolium* showed higher antioxidant activity with the DPPH \cdot method with an IC₅₀ = 17.15×10^{-6} g/mL. Facing the ABTS⁺ method was that the IC₅₀ value = 7.3×10^{-7} g/mL.

Keywords: *Clinopodium taxifolium*, gas chromatography, major compounds, refractive index, relative density, biological activity and antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias sintetizadas por las plantas, siendo posible su extracción en el laboratorio químico mediante hidrodestilación por arrastre con vapor de agua (Rodríguez et al, 2012).

La composición de cada aceite esencial depende de las condiciones en las que se encuentre la planta; como las condiciones climáticas, geológicas, geográficas, y el estado fenológico de la planta.

En Ecuador, el uso de aceites esenciales o esencias es muy reciente, siendo utilizados principalmente en aromaterapia. La investigación de la composición química de las esencias es una necesidad que se ha visto reflejada en la falta de información de varias especies. Además de caracterizar las esencias, las características organolépticas propias de cada aceite esencial, pueden determinar su uso en la industria cosmetológica.

Este estudio está enfocado en *Clinopodium taxifolium*, una especie de la familia Lamiaceae. Comúnmente es conocida como poleo o romerillo de campo y su uso es común en dolores estomacales, musculares, en la tos y en el adorno de templos por sus flores de colores vivos.

Se determinaron las propiedades químicas y físicas, así como también la resistencia o sensibilidad de microorganismos patógenos (hongos y bacterias) frente al aceite esencial. La composición química se determinó mediante CG/EM y CG/FID, empleando dos tipos diferentes de columnas, DB-5MS y HP-INNOWAX.

Los parámetros, densidad e índice de refracción sirven como indicadores de calidad del aceite esencial. También es necesario documentar estas características para estudios más avanzados del aceite dentro de la industria farmacológica.

En la actualidad se incorpora en la mayoría de productos alimenticios y cosméticos compuestos antioxidantes artificiales, de ahí parte el objetivo de evaluar si el aceite esencial de esta planta posee actividad antioxidante. Para determinar dicha actividad se utilizaron dos métodos: Capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ y del radical DPPH. A través de estos métodos se obtiene la CI₅₀ es decir la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH· y ABTS⁺ en un 50%, con la

finalidad de evaluar la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), el cual es un estándar utilizado para ambos métodos (Granados et al, 2012).

La investigación fue desarrollada en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja; el objetivo general de realizar estos estudios es contribuir al conocimiento de la flora aromática del Sur del Ecuador.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de monoterprenos, sesquiterpenos e hidrocarburos, producidos en respuesta a un mecanismo de defensa frente a estímulos ambientales, a temperatura ambiente son líquidos poco densos pero con mayor viscosidad que el agua (Rodríguez et al, 2012). Se encuentran distribuidos ampliamente por toda la planta: en las hojas (eucalipto, hierbabuena), en las raíces (jengibre), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, naranja, mandarina), en el tallo (canela), en las flores (lavanda, manzanilla) y en los frutos (pimienta);

En función de su consistencia, los aceites esenciales se pueden clasificar en: esencias fluidas, bálsamos, oleorresinas o según su origen en: naturales, artificiales y sintéticos (Palá, 2004). Sin embargo, la composición química de una especie puede diferir considerablemente de otra, así sean de la misma familia, por esto es conveniente saber la composición exclusiva de cada especie. Es aconsejable hacer un estudio de la composición química presente en la esencia, determinando que compuesto está en mayor cantidad (> 1 o 0,5%) o menor cantidad (por centenares) (Bandoni, 2002).

El método más utilizado comúnmente es la destilación por arrastre con vapor de agua o hidrodestilación; este procedimiento consiste en obtener el aceite esencial de una planta aromática mediante la aplicación de una fuente de calor externa, conforme el calor entra en contacto con la materia prima, la calienta y va liberando el aceite esencial contenido en ella, y este a su vez se va volatizando, al ser soluble es arrastrado corriente arriba donde forma una mezcla con el vapor saturado, esta mezcla es enfriada y condensada en el condensador, al salir del condensar se obtiene una emulsión líquida, que posteriormente se separa en un florentino (Rodríguez et al, 2012).

Los aceites esenciales obtenidos a partir de hidrodestilación son utilizados ampliamente en la industria cosmetológica para la elaboración de perfumes, cremas, jabones, colonias maquillaje, etc. En la industria farmacéutica, como aditivo e insumo para sintetizar compuestos y en industria alimentaria como condimentos; además, son utilizados como aditivos e insumos para la fabricación de productos de higiene personal y de limpieza doméstica. Actualmente las esencias son utilizadas también en aromaterapia debido a su olor y las propiedades pseudo-farmacológicas que ofrece su composición (Rodríguez et al, 2012).

La composición química de los aceites esenciales en su mayoría poseen monoterpenos y sesquiterpenos; es posible identificar los compuestos volátiles mediante algunos métodos cromatográficos tales como la cromatografía en columna, de capa fina y HPLC, sin embargo actualmente existen técnicas de separación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficacia HPLC y la cromatografía de gases (CG); así como también combinaciones “ON-LINE-HPLC-CG-EM”; esta última técnica gracias al desarrollo de columnas capilares de alta resolución permite analizar mezclas complejas presentes en aceites esenciales, e identificar los componentes a partir de los tiempos de retención a través de los denominados Índice de Retención de Kovats (IK); estos valores son característicos para cada componente y existen bases de datos con los índices de muchos componentes de los aceites esenciales (Martínez, 2003).

1.2. Cromatografía de gases

La cromatografía es un método poderoso para separar los componentes de mezclas como las que se forman en las reacciones químicas. Esta técnica se usa para obtener los componentes individuales (puros) de una mezcla y también para determinar la proporción en la que se encuentran (Fox y Whitesell, 2000).

Las separaciones cromatográficas se consiguen por lo común utilizando compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Cada componente interactúa con la fase estacionaria y se disuelve en la fase móvil en diferente medida (Fox y Whitesell, 2000).

En la cromatografía de gases, se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas acarreador (gases inertes como el argón, el helio, nitrógeno), que arrastra la muestra desde un bloque de inyección caliente hasta el interior de una larga columna cromatográfica que se calienta en un horno. La corriente gaseosa que sale fluye sobre un detector que registra el paso de cada compuesto y la cantidad en la que se encuentra; y la fase estacionaria puede ser un sólido.

En la figura 1, se muestra un diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases. La muestra del aceite se inyecta a través de un septo (diagrama de silicona), en un inyector caliente, en cuyo interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador, helio en este caso; y los analitos después de separados

llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador. La columna utilizada debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más elevada que la columna, de forma que los analitos se encuentren en forma gaseosa.

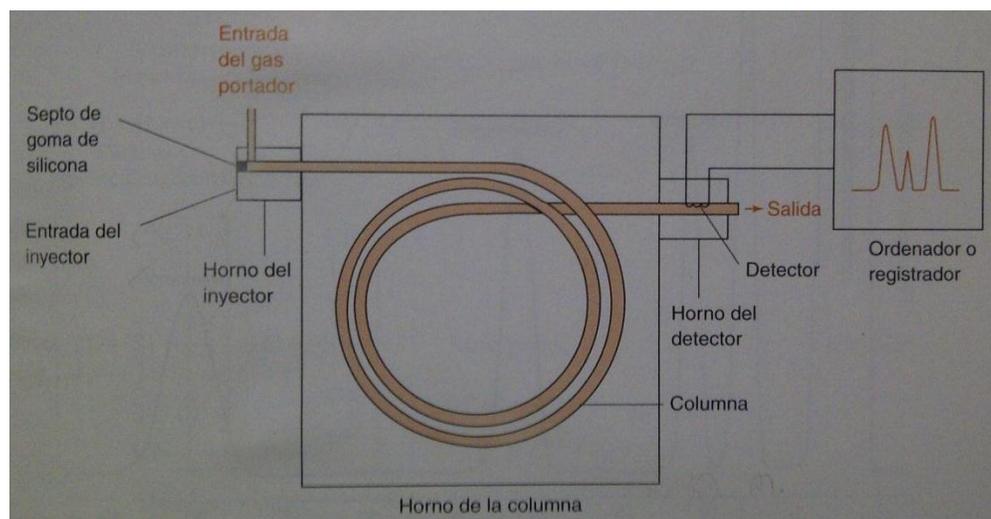


Figura 1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases.
Fuente: Harris, 2007.

La cromatografía de gases suele ser utilizada para separar cantidades de hasta cientos de miligramos; pero en este caso la cantidad de aceite a utilizar fue mínima.

1.3. Actividad biológica

Las bacterias son seres vivos unicelulares, bajo el lente de un microscopio se ven como pelotas, varas o espirales; son muy pequeñas, un número muy limitado de bacterias son causantes de enfermedades, mientras que la mayoría son útiles para realizar diversas funciones vitales como: ayudar a digerir la comida, destruir células causantes de enfermedades, suministrar vitaminas, también son útiles en la industria alimenticia como en la producción de yogurt o queso. Las bacterias patógenas se reproducen con rapidez dentro del cuerpo, produciendo sustancias llamadas toxinas, estas dañan los tejidos para provocar las enfermedades (Brooks et al, 2005).

Al tratar una enfermedad de origen bacteriano con los antibióticos recetados comúnmente, nos recuperamos de la afección pero nuestro sistema inmune también ha

quedado abatido, volviéndonos cada vez más propensos a las enfermedades bacterianas. Por otro lado esto no sucede con los componentes químicos de los aceites esenciales, ya que actúan de manera selectiva frente a microorganismos patógenos.

Debido al uso irracional de los antibióticos, las bacterias generan mecanismos de resistencia que les permiten sobrevivir, por lo que los tratamientos medicamentosos resultan cada vez menos efectivos. Esto no sucede con los aceites esenciales, ya que su composición química varía con el tiempo, con las condiciones climáticas, con el suelo, o el cuidado que reciba la planta; ya que el aceite esencial es producido por el metabolismo de la planta dependiendo de sus necesidades de supervivencia. Debido a esta imprevisibilidad de los aceites esenciales las bacterias nunca aprenderán a reconocerlos, por tanto no pueden volverse inmunes a ellos y jamás podrán crear cepas resistentes (Jacob, 2012).

1.4. Organismos biológicos:

En este estudio se van emplear algunas cepas bacterianas, entre ellas 5 cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*. También dos cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*; y dos especies fúngicas: *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

1.4.1. Bacterias Gram-negativas.

1.4.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*. (Ver figura 2) Es un bacilo, patógeno oportunista, aeróbico; productor de pigmentos como piocianina, fluoresceína y piorubina. En individuos inmunocomprometidos se encuentra infectando el tracto pulmonar, urinario, tejido, heridas, además de causar infecciones en la sangre. Para su identificación en la clínica se toma en cuenta la producción de estos pigmentos por su habilidad para desarrollarse a una temperatura de 42°C y por el olor característico a uvas que despiden.

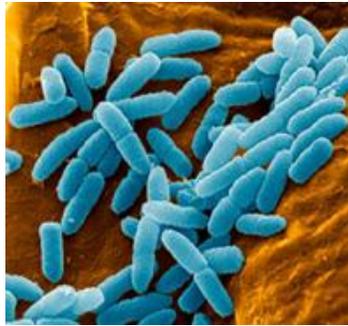


Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*.
Fuente: Global medical discovery, 2011.

1.4.1.2. *Klebsiella pneumoniae*. Tiene forma bacilar y desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades infecciosas oportunistas, también en aquellos que tienen predisposición a las enfermedades infecciosas como los ancianos, diabéticos, alcohólicos, pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, pacientes que han sido ingresados en UCI (Unidad de cuidados intensivos), neonatos. Principalmente causa infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infección de tejidos blandos y de heridas.

Estas bacterias, al ser inoculadas en agar MacConkey, fermentan la lactosa dando la formación de colonias rosadas; en cambio en un medio kligler o TSI donde son ácido/ácido, la fermentación de lactosa también da lugar a la producción de gas. Las condiciones adecuadas de cultivo son en agar nutritivo a 37°C.

1.4.1.3. *Proteus vulgaris*. Bacilo facultativo, anaeróbico, habita principalmente en el tracto intestinal, cuando abandona su hábitat actúa como oportunista causando infecciones urinarias principalmente, también puede provocar infecciones de heridas y en abscesos hepáticos. Un parámetro para su diagnóstico es que fermenta glucosa sucrosa y amigdalina.

1.4.1.4. *Escherichia coli*. (Ver figura 3) Bacilo anaeróbico, facultativo del sistema digestivo, móvil, vive en el intestino de la mayoría de los mamíferos sanos actuando como comensal formando parte de la flora intestinal ayudando así a la absorción de los nutrientes en el organismo.

La mayoría de las *E.coli* no causan problemas pero algunos tipos pueden producir malestares como la diarrea, diarrea hemorrágica e infecciones urinarias.

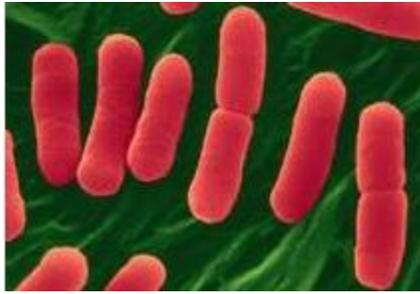


Figura 3. *Escherichia coli*
Fuente: Bacteria in photos, 2014.

1.4.1.5. *Salmonella typhimurium*. Es una de las dos especies de bacterias del género salmonella que son las principales causantes de la intoxicación alimentaria por salmonelosis. No causa una enfermedad tan severa y normalmente no es fatal, los síntomas que presenta suelen ser diarrea, dolores abdominales, vómito, náusea; suele durar alrededor de 7 días.

1.4.2. Bacterias gram-positivas.

1.4.2.1. *Enterococcus faecalis*. Es una bacteria gram positiva inmóvil, anaeróbica facultativa, habita principalmente en el tracto digestivo del hombre y los mamíferos. Debido a su ubicación son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia indica la falta de higiene en los alimentos o condiciones de conservación inadecuadas. También es el más común en causar infecciones en humanos en ambientes hospitalarios.

1.4.2.2. *Staphylococcus aureus*. (Ver figura 4) Es una bacteria anaeróbica facultativa, inmóvil; es el principal causante de infecciones nosocomiales, además de ser el productor de múltiples enfermedades como: conjuntivitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, neumonía, endocarditis, puede afectar también al aparato gastrointestinal por la presencia de la bacteria, o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.



Figura 4. *Staphylococcus aureus*
Fuente: Med ciencia, 2013.

1.4.3. Hongos.

1.4.3.1. *Trichophyton rubrum*. (Ver figura 5) Es un organismo fúngico dermatofito antropofilico; este tipo de hongos son capaces de invadir tejido queratinizado como la piel, el pelo y las uñas; es por esto que es la causa más frecuente de enfermedades como el pie de atleta, prurito del jockey y tiña o dermatofitosis. El crecimiento de las colonias de trichophyton es moderadamente rápido (Gómez, 2008).



Figura 5. *Trichophyton rubrum*
Fuente: Mycology onlyne, 2014.

1.4.3.2. *Trichophyton mentagrophytes*. Es un género de hongos que se caracteriza por desarrollar micro y macronidios de paredes lisas, son dermatofitos, queratinofilicos es decir que muestran afinidad a la queratina, lo que significa que pueden infectar la piel, pelo y uñas del hombre o los animales.

1.5. Actividad antioxidante

Los aceites esenciales extraídos de las especies vegetales aromáticas son utilizados en muchas áreas de medicina, nutrición, como saborizantes en bebidas, como repelentes de insectos, en fragancias y cosméticos, y en diversos propósitos industriales, aprovechando sus propiedades preservantes (Ortuño, 2006). El interés de encontrar antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente, tanto para su uso farmacológico, como en alimentos.

1.5.1. ABTS⁺.

Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante en una esencia, entre ellos se encuentra el ensayo del ácido 2,2-azinobis-3(-etilbenzotioaxolín-6-sulfónico) o ABTS⁺. Este método se basa en la captación de los antioxidantes por el radical ABTS⁺, generado en el medio de reacción, usando como patrón el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico o también denominado Trolox, que es un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Este radical catión ABTS⁺ posee una coloración verde-azulada, que en presencia del patrón se va decolorando (Granados et al, 2012).

1.5.2 Radical DPPH

Otro método útil para determinar actividad antioxidante, se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los componentes antioxidantes del aceite esencial de la muestra. Este radical es estable y tiene una coloración púrpura que se va perdiendo progresivamente cuando se añade la muestra de aceite esencial que contenga sustancias antioxidantes. Con este método también se utiliza un patrón de Trolox (Granados et al, 2012).

1.6. Plantas aromáticas

El uso de las plantas medicinales tiene su nacimiento junto con la aparición del hombre, posteriormente desde el siglo XIX se iniciaron los estudios de las plantas en la medicina tradicional. Dentro del reino vegetal existen plantas aromáticas, algunas de ellas son medicinales. La característica de las plantas aromáticas es la presencia de aceite esencial, propia de cada especie, y producto del metabolismo vegetal, son volátiles y responsables del olor de la planta; la mayoría en su composición química cuenta con

monoterpenos y sesquiterpenos principalmente, aunque también pueden estar acompañados de otros compuestos químicos (Lizcano y Vergara, 2008).

1.7. *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts

Ecuador, es considerado como uno de los 17 países megadiversos del mundo, debido a que en su superficie de 258.000 Km² alberga alrededor de 17.748 especies nativas confirmadas; alrededor de 1422 son pteridofitas, 18 gimnospermas y 16.308 son angiospermas (Neill, 2012). Además se encuentra en la región andina que cubre cerca del 25% de la diversidad biológica mundial, esto se debe a su ubicación intertropical y a la presencia de la Cordillera de los Andes que divide al territorio andino en diferentes regiones ecológicas con variabilidad climática. La topografía junto con la variación del clima crea hábitats propicios para que se desarrollen elementos florísticos propios de cada región (Jorgensen et al, 2006).

En Ecuador, el 60% de las plantas tienen usos medicinales, de estas la mayoría son nativas y endémicas de nuestro país. De este porcentaje, hay cuatro familias que sobresalen: Asteraceae, Solanaceae, Fabaceae y Lamiaceae; comúnmente las especies de estas familias son utilizadas para tratar dolores de cabeza, estomacales y musculares, también para bajar la fiebre, diarrea, tos, mareos, gases, calambres, etc (Torre et al, 2008). Además, existen diversas especies vegetales que se utilizan para tratar infecciones e infestaciones, inflamaciones, heridas y lesiones y desordenes del sistema digestivo, de la piel, del sistema respiratorio, del sistema urogenital (Jorgensen et al, 2006).

La familia Lamiaceae que originalmente se la llamaba labiada, como se ha dicho anteriormente es una de las familias botánicas medicinales más utilizadas; dentro de esta se encuentran 240 géneros y alrededor de 6.500 especies. Esta familia de plantas es comúnmente utilizada para aliviar males como dolor e inflamación de estómago, diarrea, disentería, tos, pulmonía, gripa, entre otros padecimientos que pudieran ser producidos por cepas bacterianas (Tobar, 2007).

Dentro de la familia de las lamiaceae, se encuentra el género *Clinopodium* que posee el mayor grupo de especies de la familia, cuenta con 271 especies descritas, de estas, solo 142 aceptadas (The plant list, 2010).

Clinopodium taxifolium (Kunt) Govaerts, pertenece a la familia de las labiadas o Lamiaceae. Esta especie crece a una altitud de 1500 a 3000 m s.n.m.; se la ha

encontrado en Perú, Bolivia y en la provincia sur de Ecuador, exactamente en Azuay, El Oro y Loja (Tropicos, 2014).

Esta especie es nativa en Ecuador, científicamente se la conoce con nombres como *Gardoquia taxifolia* Kunth y *Satureja taxifolia* (Kunth) Briq (Tropicos, 2014). Comúnmente también tiene otros nombres como romero de campo, poleo, poleo del inca y culantrillo del cerro. Tradicionalmente es usada para aliviar síntomas como tos, dolor estomacal, resfrió, mal de aire; también se la coloca en templos como adorno, debido a sus coloridas flores.

1.8. Antecedentes

Alrededor de la región sur del Ecuador, se han realizado algunos estudios orientados hacia las especies nativas propias de dos provincias principalmente: Loja y Zamora Chinchipe; se han reportado un total de 275 especies de plantas con 68 usos terapéuticos diferentes. De esta cantidad total 152 especies son nativas, 57 son introducidas, 5 son cultivadas tradicionalmente, 8 son endémicas de Loja o de Zamora Chinchipe y las 53 especies sobrantes ya han sido estudiadas y publicadas (Tene et al, 2006).

Dentro de las plantas analizadas se encuentra una especie perteneciente a la familia de las Lamiaceae, *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Harley, llamada comúnmente como poleo de castilla; se usan las hojas de la planta para preparar infusiones que pueden aliviar síntomas producidos por la malaria, así como también la inflamación interna, espanto y la tos (Jorgensen et al, 2006).

En este estudio se encontró que algunas especies de esta familia (Lamiaceae), se encuentran principalmente en estas regiones, especies como: *Salvia scutellarioides* Kunth, *Salvia* sp. L., *Salvia tiliifolia* Vahl, *Ocimum basilicum*, *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Mentha spicata* L. y *Mentha pulegium* L. Estas especies de plantas aromáticas son utilizadas comúnmente en el alivio de síntomas como inflamación, dolor, fiebre y tos (Jorgensen et al, 2006).

En otros estudios con especies de la misma familia de las Lamiaceas, se ha encontrado que muchas especies tienen efecto antibacteriano, por ejemplo *O. vulgare* y *T. vulgaris* son activos contra cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*; la actividad antibacteriana del aceite de dichas especies, fue medida como la concentración mínima bacteriana (CMB) usando el método de dilución en agar. El potencial antimicrobiano de

los aceites esenciales de estas especies no solo depende de la composición química del aceite sino también del microorganismo por sí mismo (Roldan et al, 2010).

Además la composición química determinada mediante cromatografía de gases-espectrofotometría de masas (CG-EM) revelo que dichas especies poseen de 16 -28 compuestos en cada aceite, correspondiendo principalmente a monoterpenos fenólicos, oxigenados e hidrocarbonados (Torre et al, 2008).

Dentro del género *Clinopodium* existen numerosos estudios en base a su diversidad de especies. *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) fue analizado por CG-MS y CG-FID, encontrando alrededor de 70 compuestos en su mayoría monoterpenos oxigenados, además se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de esta especie, obteniendo resultados efectivos en pruebas in vitro contra *Candida albicans*. Del extracto acuoso MeOH de las partes aéreas de la planta, se aislaron dos compuestos no volátiles llamados schizonepetoside A y schizonepetoside C los cuales son terpenoides glicosilados, que no han sido aislados anteriormente en el género *Clinopodium* (Gilardoni et al, 2011).

Clinopodium vulgare, pertenece también a la familia Lamiaceae, comúnmente llamada clinopodium. Tradicionalmente esta especie en Bulgaria se utilizaba como cicatrizante y en el tratamiento de verrugas. En un screening de la actividad antitumoral realizado con extractos acuosos de las hojas de la planta frente a líneas celulares A2058 (melanoma metastásico humano), Hep-2 (carcinoma epidermoide de laringe humano) y L5178Y (linfoma de ratos) se encontró que presenta una fuerte actividad antitumoral sobre estas líneas celulares (Peñay Pérez, 2007).

El estudio del reino vegetal experimenta un crecimiento constante, debido al uso medicinal que poseen ciertas especies. En investigaciones realizadas se ha determinado la composición química se han aislado los componentes con la finalidad de caracterizarla y determinar su potencial en las diversas industrias.

En la región sur de Ecuador contamos con una riqueza floral abundante por tal razón este estudio, está orientado hacia una especie nativa de nuestro país, determinando la calidad del aceite esencial y la actividad biológica sobre cepas bacterianas y fúngicas. En base a los resultados obtenidos se podrían desarrollar futuras investigaciones orientadas en sí, al

desarrollo y producción de fitofármacos específicos para combatir enfermedades producidas por microorganismos.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Diseño experimental

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Química (DQ) de la Universidad Técnica Particular de Loja. Consta de un componente químico: determinación de la composición química, propiedades físicas; y de un componente biológico: determinación de la actividad biológica frente a bacterias y hongos, y potencial antioxidante.

La metodología que se llevó a cabo es la siguiente:

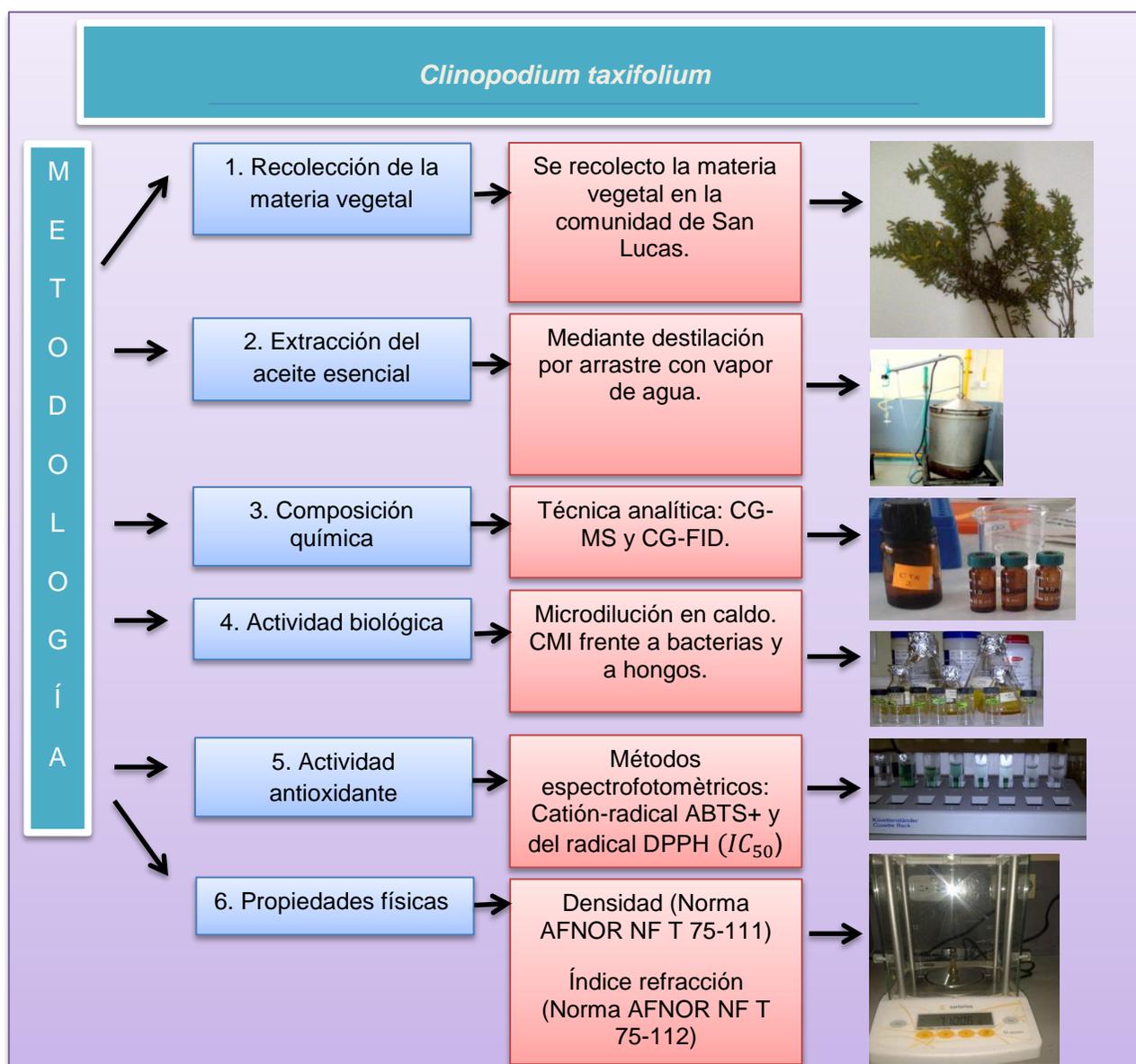


Figura 6. Esquema metodológico.

2.2. Recolección de materia vegetal

La recolección de la materia vegetal se llevó a cabo en la provincia de Loja del Sur del Ecuador, específicamente en el Cerro Acacana ubicado en la vía que conecta la provincia de Loja con Cuenca, a una altura de 3439 m s.n.m. En la figura 7 se observa la ubicación geográfica de dicha especie, el mapa fue elaborado utilizando el programa ArcGis v3.21 en las instalaciones de la UTPL.

Ubicado en la montaña de Acacana se encuentra la parroquia de San Lucas, un poblado pequeño perteneciente a la comunidad de Saraguro. Las coordenadas de recolección de la materia vegetal en esta localidad son las siguientes: latitud 17692602E, longitud 9590410N y altura 2695 m s.n.m.

La materia vegetal fue recolectada en toda la amplitud de la montaña Acacana, se recogió en sacos de lona para poder transportar a las instalaciones del laboratorio de procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Las recolecciones se realizaron cada mes, desde septiembre de 2013 hasta diciembre de 2013.

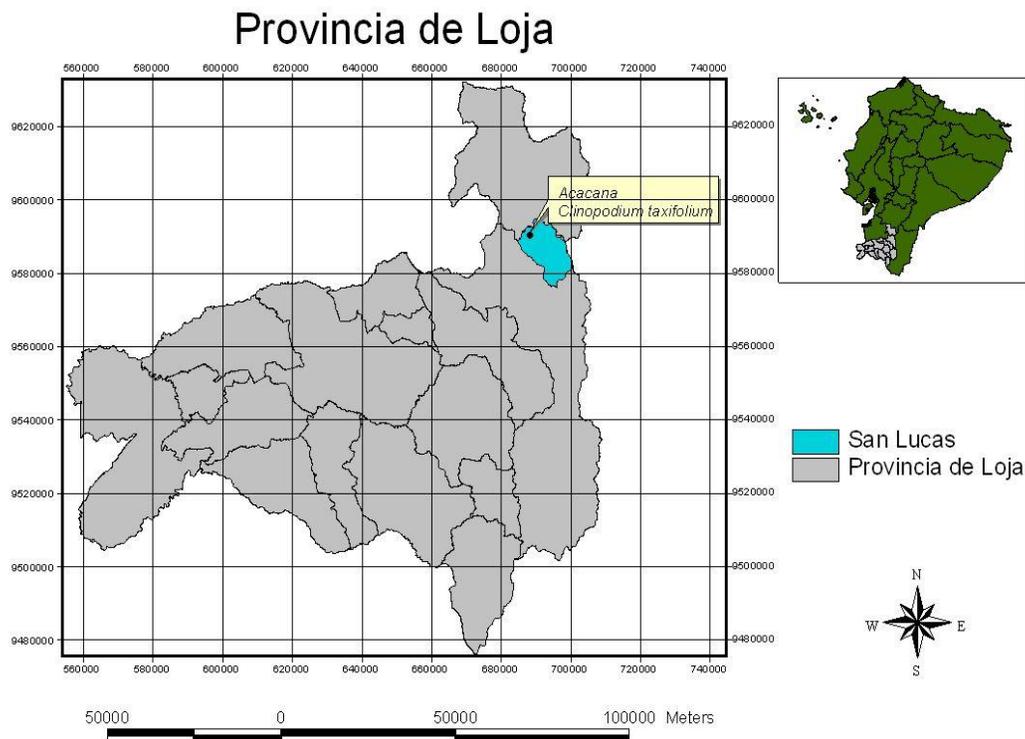


Figura 7. Ubicación del área de recolección de la especie *Clinopodium taxifolium*.
Fuente: Ph.D Vladimir Morocho.

Clinopodium taxifolium, es un arbusto perteneciente a la familia Lamiaceae, tiene una altura de aproximadamente 1,50 metros presenta hojas pequeñas y ovaladas, flores de varios colores claros y un olor muy característico de la planta debido a la composición química del aceite esencial.

En las siguientes fotografías se muestra a esta especie en su hábitat natural (figura 8) y una muestra depositada en el herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (figura 9).



Figura 8. Muestra de *Clinopodium taxifolium*, en su hábitat natural
Fuente: La autora



Figura 9. Muestra de *Clinopodium taxifolium*, perteneciente al herbario de la UTPL
Fuente: Herbario HUTPL

2.2.1. Clasificación taxonómica.

***Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts

2.2.2. Selección de la materia vegetal.

Posterior a la recolección se traslado la materia vegetal al laboratorio de procesos, para continuar con la selección de la materia vegetal más apta para la extracción del aceite esencial.

Se eliminó todo tipo de impurezas, hojas secas, material vegetal que este en descomposición, restos vegetales perteneciente a otras especies, tierra, insectos; se eliminó cualquier posible contaminación.

2.2.3. Determinación de la Humedad.

Se realizaron 3 destilaciones de la materia vegetal de esta especie, previo a cada destilación la muestra fue pesada y se guardó aproximadamente 2-5 gramos de materia vegetal para determinar la humedad según el método descrito en el anexo 1. De cada recolección se calculó la humedad relativa por triplicado obteniéndose el valor medio de las tres destilaciones.

2.3. Extracción del aceite esencial

Se realizó la extracción del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* por el método de destilación por arrastre con vapor de agua; se colocó la materia vegetal en los equipos de destilación durante un tiempo mínimo de 3 a 4 horas.

La cantidad de materia vegetal requerida y el tiempo mínimo y máximo que se necesita para la extracción del aceite esencial de esta especie fue determinada en ensayos previos.

El equipo utilizado en la destilación de la materia vegetal consta de un tanque de acero inoxidable que posee una tapa del mismo material adaptado para que cierre herméticamente (ver figura 10). Este equipo de destilación está colocado sobre una fuente de calor.

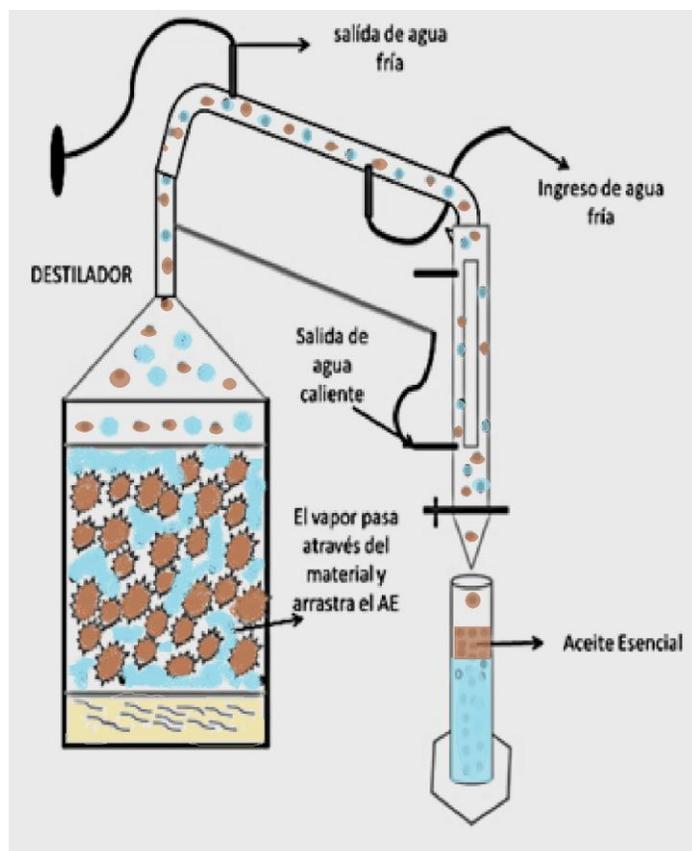


Figura 10. Explicación gráfica del funcionamiento de un destilador.
Fuente: La autora.

En el tanque de acero se coloca aproximadamente 20 litros de agua, hasta tocar el límite de la placa perforada en la cual se coloca la materia vegetal troceada y bien espaciada, para que el vapor de agua pueda circular adecuadamente alrededor de toda la materia vegetal. En el borde del tanque de acero se coloca un sello de agua para evitar que haya escapes de vapor de agua, posteriormente se coloca la tapa de acero y se cierra herméticamente. Las mangueras de entrada y salida se colocan al tapan el tanque, finalmente en el cuello de cisne se coloca el florentino.

Al terminar de armar todo el equipo necesario para la destilación, se expone la base del tanque a la fuente de calor; cuando se observa la primera gota de agua en el florentino, se abren las llaves de agua para el refrigerante para que se produzca el proceso de condensación es decir el paso del estado gaseoso al líquido de la esencia y sea conducido hacia el florentino donde se separa por diferencia de densidades, el aceite obtenido permanece en el florentino hasta que termine la destilación (ver figura 11).



Figura 11. Destilador armado

Fuente: La autora

2.3.1. Determinación del Rendimiento.

El rendimiento se determinó de cada destilación, relacionando el volumen de aceite obtenido con la cantidad de materia vegetal utilizada en la destilación; finalmente se reportó un valor medio de todas las destilaciones (ver anexo 2).

2.3.2. Recolección del aceite esencial

Posterior al enfriamiento del aceite esencial en el florentino se elimina el exceso de agua, se recoge el aceite en una probeta para medir el volumen.

2.3.3. Envasado y almacenamiento del aceite esencial.

El aceite esencial recolectado, es envasado en frascos de vidrio de color ámbar para protegerlo de la luz, además el frasco debe contener una tapa hermética. Se rotula el

frasco y se almacena en el congelador a 4°C para conservarlo adecuadamente para posteriores análisis.

La etiqueta colocada en el contenedor de aceite debe contener información como: nombre de la tesista, nombre o iniciales de la planta, volumen de aceite, fecha de destilación y código que identifique el número de destilación (ver figura 12).



Figura 12. Aceite envasado y rotulado
Fuente: La autora

2.4. Determinación de la composición química del aceite esencial

La composición química del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A continuación se detalla el proceso que se siguió.

2.4.1. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC/MS y al detector de ionización de llama (FID).

El aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, fue analizado mediante el cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert.

El equipo dispone de una base de datos “software MSD-Chem station D.01.00 SP1” y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno (Gas Generator 9150 Packard).

Se utilizó dos tipos de columnas capilares, una columna no polar que fue DB-5MS y una columna polar que fue HP-INNOWAX. El tamaño de las columnas fue de 30m x 0,25mm x 0,25 µm

La columna no polar esta recubierta internamente de fenilmetilpolisiloxano 5% y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol.

La temperatura límite para la columna DB-5MS es de 325°C y para la columna HP-INNOWAX la temperatura es de 260°C.

2.4.1.1. Preparación de las muestras.

Un tratamiento especial que se le dio a cada muestra de aceite esencial previo a ser analizado en el cromatógrafo de gases, fue extraer completamente el agua que pudiera haber sido envasada junto con el aceite en el frasco ámbar; para esto se colocó una cantidad mínima de sulfato de sodio anhidro en el frasco de vidrio que contiene la muestra de aceite esencial (ver figura 13), tratando de que el polvo caiga exactamente donde se encuentren las burbujas de agua, para que las absorba; se deja reposar la muestra por aproximadamente 30 minutos (ver figura 14) y se trasvasa a un frasco de vidrio color ámbar libre de impurezas y rotulado adecuadamente para proceder con la preparación de las muestras que van a ser analizadas.



Figura 13. Muestra con sulfato de sodio anhidro.

Fuente: La autora.



Figura 14. Muestra en reposo con sulfato de sodio anhidro.

Fuente: La autora.

Las muestras de aceites esencial libres de agua que fueron analizadas en el cromatógrafo de gases, se prepararon colocando 990 μ L de diclorometano con 10 μ L de

aceite esencial en un vial de cromatografía, el vial debe contener un código que indique de que muestra procede la alícuota. La solución tiene una concentración al 1%.

Previamente a inyectar la muestra en el cromatógrafo se lava la jeringa con el mismo diluyente que utilizamos para la muestra, es decir diclorometano para evitar que en la corrida cromatografía aparezcan trazas de la muestra corrida anteriormente.

2.4.1.2. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplado a espectrometría de masas.

Además de correr las muestras en esta columna, se analizó también una mezcla de hidrocarburos partiendo desde el decano (C_{10}) hasta el pentacosano (C_{25}). Este conjunto de hidrocarburos comercialmente es conocido como TPH-6RPM de CHEM SERVICE.

Las condiciones utilizadas para realizar correctamente la cromatografía son las que se exponen en la figura 15.

Los hidrocarburos y todas las muestras de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* fueron tratadas siguiendo los mismos parámetros anteriormente mencionados.

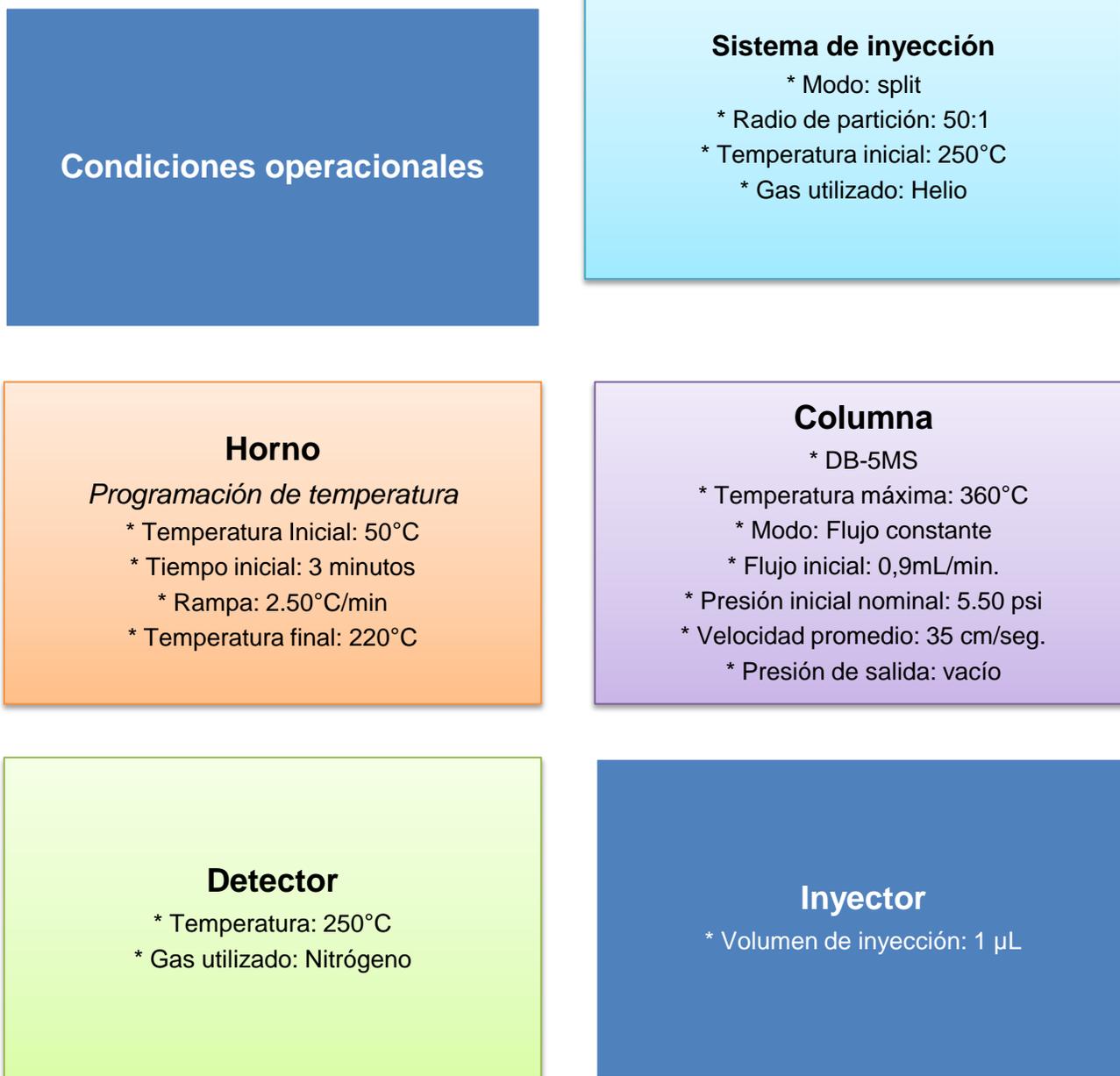


Figura 15. Condiciones operacionales de la corrida cromatografica en la columna no polar DB-5MS.

Fuente: La autora.

2.4.1.3. Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas.

Al igual que en la columna no polar, en esta columna también se inyecta hidrocarburos, siendo los mismos que se utilizaron en el análisis anterior.

Además las muestras del aceite esencial fueron preparadas siguiendo la metodología descrita en la sección 2.4.1.1. Las características bajo las cuales se inyectó la muestra en el cromatógrafo se describen en la figura 16.

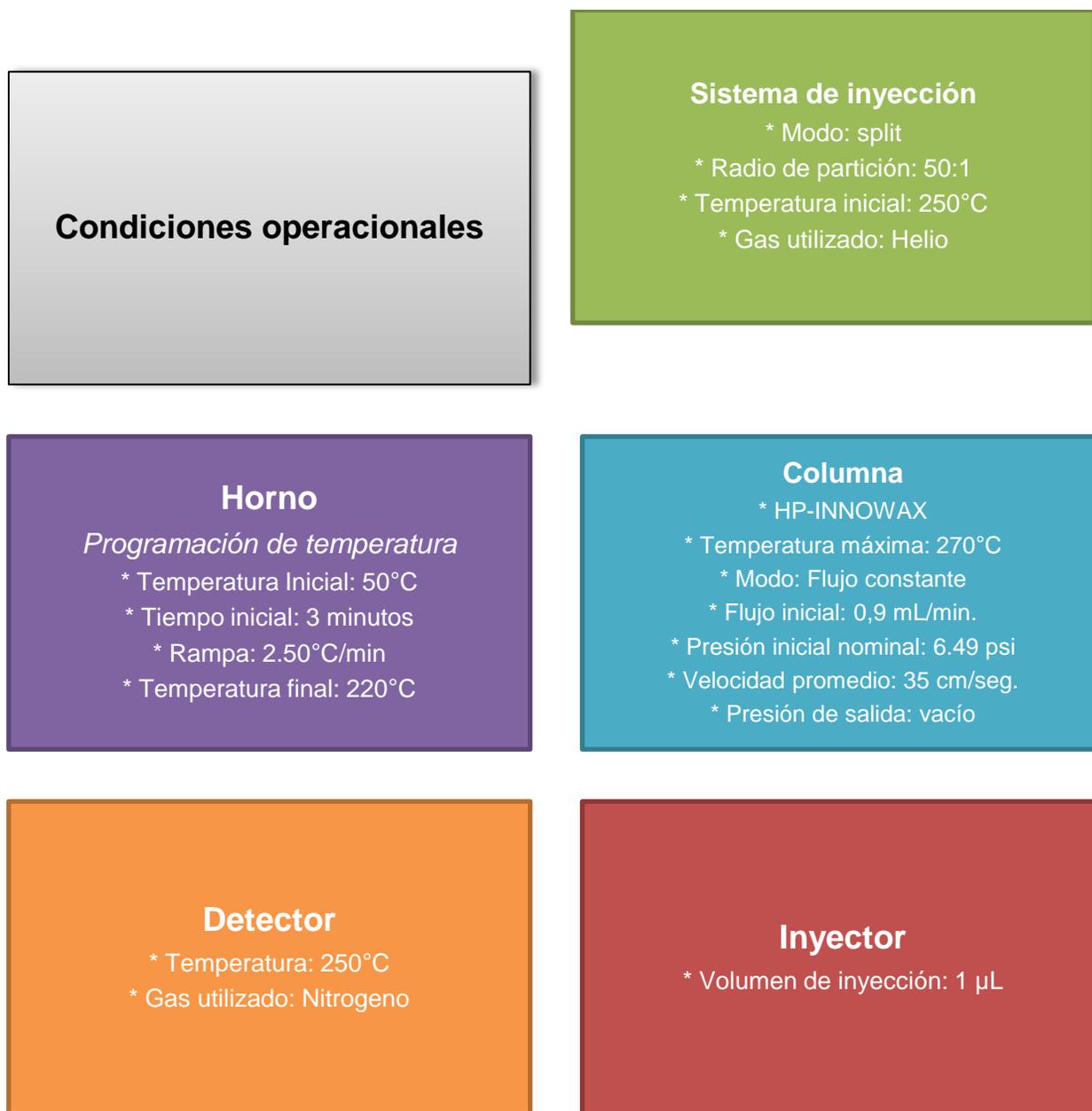


Figura 16. Condiciones operacionales de la corrida cromatografica en la columna polar HP-INNOWAX.

Fuente: La autora.

2.4.1.4. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, tanto en la columna polar como en la columna no polar utilizadas.

La composición química del aceite esencial comprende tres pasos vitales: 1). Separación de los componentes, 2). Identificación de los componentes por parte del equipo y 3). Cuantificación de los componentes determinados (Rubiolo et al, 2010).

Para poder obtener el cromatograma y poder analizar los compuestos, el cromatógrafo calcula los tiempos de retención, esto depende de la fuerza de las interacciones no covalentes de los compuestos que se pretende separar con la fase estacionaria. Estas interacciones están gobernadas por los efectos de polaridad molecular y de las interacciones de van der Waals, mismos que también influyen en los puntos de ebullición (Fox y Whitesell, 2000).

Es por esto que el gas portador utilizado para acarrear las muestras es el helio, debido a que es el gas más común y más compatible con la mayoría de detectores (Harris, 2007).

Como resultado final lo que obtuvimos fue un cromatograma en el cual se visualiza los compuestos que fueron detectados por el equipo, esta representación gráfica se da por la señal producida en el detector mediante el tiempo y el volumen de elución. Es así que la identificación se da por la posición de picos respecto al tiempo en dicha representación gráfica; mientras que el área de cada pico nos permite analizar la concentración de cada compuesto mediante análisis cuantitativo (Guiteras et al, 2007).

Para el análisis manual de estos picos, se integró el cromatograma mediante el sistema de integración Chemstation Integrator-autoint 1. e. que es propio del equipo de cromatografía de gases.

Posteriormente a realizar la integración de los picos, se determinó el índice de Kovats de cada uno de ellos partiendo del índice de retención de los mismos.

El índice de retención se define como la relación del tiempo de retención de un soluto con los tiempos de retención de los alcanos lineales (hidrocarburos inyectados previamente) (Harris, 2007).

Los índices de Kovats (IK) experimentales de cada compuesto arrojado por el equipo se calcula comparando los tiempos de retención de los hidrocarburos anteriormente inyectados con los tiempos de retención de los compuestos aplicando la siguiente fórmula:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats;

n: Número de átomos de carbono en el n-alcano;

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n- alcanos;

t_{Rn}: Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado;

t_{RN}: Tiempo de retención de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

Después de haber calculado el índice de Kovats de cada compuesto detectados en las columnas polar y no polar; se realizó una comparación de todos los índices de Kovats obtenidos experimentalmente con índices de Kovats de referencia de los mismos compuestos encontrados, para esto se utilizó diferente bibliografía y bases de datos electrónicas. Se tomó en cuenta que los datos de referencia y los datos experimentales de los índices de Kovats, no tengan una diferencia mayor a 30 unidades.

Además de analizar un compuesto mediante la comparación de los índices de Kovats también se puede utilizar como referencia el espectro de masas característico de cada compuesto, este espectro posee la información estructural de cada analito analizado. El equipo además de arrojar los tiempos de retención también compara los espectros de masas de cada compuesto con la base de datos del equipo, es decir con la librería Wiley 7n. 1. Los compuestos que el equipo analiza también poseen un número de registro CAS, que facilita aún más la búsqueda del material bibliográfico de referencia.

2.4.1.5. Corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS, acoplada al detector de ionización de llama (FID).

La metodología llevada a cabo con el detector de ionización de llama (FID), es igual a la metodología que se llevó a cabo en la cromatografía de gases acoplada al

espectrómetro de masas. Las muestras fueron tratadas de igual manera antes de ser analizadas en el cromatógrafo; de igual manera también se inyectó hidrocarburos, previo a la inyección de las muestras de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*. Lo que difiere son las condiciones en las que operó el cromatógrafo. Estas condiciones se exponen en la figura 17.



Figura 17. Parámetros operacionales de la corrida cromatográfica en la columna no polar DB-5MS acoplada a un detector de ionización de llama (FID)
Fuente: La autora

2.4.1.6. *Corrida cromatográfica en la columna polar HP-INNOWAX, acoplada al detector de ionización de llama (FID).*

Las muestras inyectadas tuvieron el mismo tratamiento que en las cromatografías realizadas anteriormente y también se inyectó los hidrocarburos, de la misma forma que se llevó a cabo con la columna no polar.

Las condiciones operacionales utilizadas en el tratamiento de estas muestras son las siguientes, (ver figura 18).



Figura 18. Parámetros operacionales de la corrida cromatografica en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID)
Fuente: La autora

2.4.1.7. Cuantificación de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.

Posteriormente a la elución de los compuestos, se procedió a la cuantificación de los mismos. Los datos de hidrocarburos obtenidos en masas y en FID se utilizaron para calcular una ecuación de la recta con la cual se calcula los tiempos de retención de cada compuesto. Estos tiempos de retención calculados se comparan con los tiempos de retención que el equipo arroja de cada muestra; los tiempos de retención se van ajustando a los compuestos encontrados en cada columna, polar y no polar.

2.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

La actividad biológica fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo frente a diferentes cepas bacterianas y fúngicas y se calculó la Concentración mínima inhibitoria.

2.5.1. Microorganismos empleados.

Se utilizó diferentes tipos de cepas bacterianas patógenas, para determinar si el aceite de *Clinopodium taxifolium*, puede ser utilizado como un antibacteriano de amplio espectro.

Los microorganismos utilizados son cepas bacterianas y fúngicas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) las cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismo de prueba.

Microorganismo de prueba.		
<i>Bacterias Gram-negativas</i>	<i>Bacterias Gram-positivas</i>	<i>Hongos</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 • <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185 • <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188

Fuente: La autora

2.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, se determinó utilizando el método de microdilución en caldo reportando los resultados como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); que se define como la concentración más baja que puede tener un antimicrobiano al inhibir el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (Andrews, 2001).

2.5.2.1. Microdilución en caldo.

El procedimiento de microdilución en caldo, es un método que posee la ventaja de que se utilizan volúmenes mínimos de la muestra a analizar. Se utiliza una placa que contiene 96 pocillos, en los cuales se realizan diluciones seriadas. Previamente se debe preparar las muestras a utilizar.

2.5.2.1.1. Preparación de la muestra de aceite esencial.

La muestra de aceite esencial que se va a emplear en este ensayo, debe estar diluida en un disolvente adecuado y a una concentración determinada. Con fines de bioprospección se emplea una solución de 20 μ L del aceite esencial en 980 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido), equivalente a 20mg/mL de muestra. Esta dilución se utiliza tanto para bacterias como para hongos (ver figura 19).



Figura 19. Dilución de aceite esencial y solvente.
Fuente: La autora.

2.5.2.1.2. Preparación del cultivo bacteriano, “Cultivo Overnight”.

Para la preparación del inóculo bacteriano, previamente se realizó los caldos de cultivo específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30 µL de cada cepa bacteriana, que se encontraban almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Posteriormente a realizar la siembra de cada cepa se incuban los medios por 14 – 16 horas a 37°C, por esta razón el cultivo se denomina overnight. Las condiciones necesarias para el crecimiento de cada bacteria y los medios de cultivo necesarios se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.

Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada bacteria.			
<i>Cepa bacteriana</i>	<i>Condiciones de incubación</i>	<i>Medio de cultivo</i>	
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>	
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo Muller Hinton</i>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo Nutritivo Oxoid</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo infusión cerebro- corazón</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Temperatura: 37°C</i> <i>Tiempo: 14- 16 horas</i>	<i>Caldo triptisoya</i>	

Fuente: American Type Culture Collection

2.5.2.1.3. Suspensión del inóculo bacteriano.

Se transfiere 150 – 300 µL del cultivo overnight que fue incubado, a un tubo que contenga 7 mL de suero fisiológico estéril; con esta mezcla se ajusta el inóculo bacteriano a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland.

De la suspensión realizada anteriormente se toma 140 μL para inocular en un vial que contenga 6,86 mL de Caldo Muller Hinton, ajustando la población bacteriana a 2×10^6 ufc/mL. De esta solución final se toman 100 μL y se colocan en la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 μL , de forma que ahora en cada pocillo la población bacteriana es 5×10^5 ufc/mL.

2.5.2.1.4. Concentración mínima inhibitoria antibacteriana (CMI).

El análisis de la concentración mínima inhibitoria del aceite, se realizó en una cabina de seguridad, que previamente fue limpiada y esterilizada para evitar contaminaciones. La prueba se realizó en placas esterilizadas de 96 pocillos, mediante diluciones dobles seriadas. Del caldo Muller Hinton se transfirió 180 μL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocó 100 μL del mismo caldo. A continuación se colocó 20 μL de la dilución de aceite esencial más DMSO solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: 1). Control positivo, que es una mezcla de 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de Gentamicina de 1000 mg/ml para todas las bacterias, excepto para *E. faecalis* y *S. typhimurium* que se utilizó Gentamicina de 5000 mg/mL. 2). Control negativo, que se realizó con 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de DMSO. Y 3). Control de esterilidad, que contenía 200 μL de caldo Muller Hinton.

Para que el medio y la solución de aceite se mezclen correctamente, se pipeteó de 15 a 20 veces la solución de todos los pocillos de la primera fila y se transfirió 100 μL de la solución homogénea a los pocillos de la siguiente fila, se mezcló correctamente los 100 μL transferidos con los 100 μL que contenía cada pocillo previamente y se continúa realizando el mismo procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; en la última fila de la placa se desechan los 100 μL sobrantes. Se debe realizar el mismo procedimiento con el control positivo, negativo y el control de esterilidad.

La concentración final de cada solución de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$.

Finalmente, cuando la placa de microdilución ya está preparada se procede a inocular todos los pocillos con 100 μL de la suspensión bacteriana obtenida previamente excepto el pocillo que contiene el control de esterilidad. Completando así un volumen final

de 200 μL y ajustando a una población bacteriana de 5×10^5 ufc/mL. En el control de esterilidad se completó el volumen final con 100 μL de caldo Muller Hinton.

Al concluir con la inoculación las placas de microdilución se sellan con parafilm y se incuban a 37°C de 18-24 horas (ver figura 20).



Figura 20. Placas de microdilución selladas con parafina previas a la incubación.
Fuente: La autora.

2.5.2.1.5. Inóculo fúngico.

Las especies de ensayo se encuentran almacenadas en reserva criogénica a -80°C a una concentración particular de esporas/mL de medio; de donde se toma una cantidad adecuada para obtener una concentración de 1×10^5 esporas/mL en medio Sabouraud. De esta solución se transfieren 100 μL para completar un volumen final de 200 μL en la placa de cultivo con una concentración de 5×10^4 esporas/mL. Las condiciones mínimas necesarias para que la suspensión fúngica crezca se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.

Medio de cultivo y condiciones de incubación necesarias para cada hongo.		
Hongo	Condiciones	Medio de cultivo
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185 <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	Temperatura: 28°C Tiempo de incubación: 24 – 72 horas.	Caldo Sabouraud

Fuente: American Type Culture Collection.

2.5.2.1.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antifúngica.

Básicamente el procedimiento es el mismo que se utilizó en la Concentración mínima inhibitoria antibacteriana, con unas leves variaciones.

La concentración final del aceite fue de 1000 a 0,48 µg/ml, y se realizaron 12 diluciones seriadas, en los hongos se coloca los 100 µL de suspensión del inoculo fúngico en el último pocillo y este va a tener un total de 5×10^4 esporas/mL.

Al igual que en la concentración mínima inhibitoria bacteriana, también se utilizan tres tipos de control: 1). Control positivo, que es una mezcla de 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de Itraconazol de 1000 mg/mL 2). Control negativo, que consta de 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de DMSO y 3). Control de esterilidad, que contiene 180 µL de caldo Sabouraud + 20 µL de aceite diluido.

Cuando las placas de microdilución están inoculadas totalmente, se sellan las cajas con parafilm, se incuba las cajas a 28°C por 96 horas.

2.5.2.2. Lectura de las placas e interpretación de los resultados.

Posteriormente a retirar las placas de microdilución de la incubadora, se observa detalladamente cada caja utilizando luz reflejada, así podremos examinar el control de esterilidad para descartar cualquier tipo de contaminación; si se diera el caso de que en el control de esterilidad se evidencia contaminación la prueba de CMI no puede ser interpretada y se debe repetir toda la prueba.

Por otro lado el control positivo nos indica que si habido un crecimiento adecuado, ya sea de las bacterias o los hongos en la placa de microdilución. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de > 2 mm.

Finalmente en el control negativo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez.

Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el último pocillo en el cual se distingue turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

En la tabla 4 se muestran los valores que fueron asignados a cada fila. Es decir si el último pocillo en el cual se evidencia turbidez es el A la CMI sería de 1000 µg/mL.

Tabla 4. Valor asignado a cada fila en CMI.

Valor asignado a cada fila en CMI.

<i>Fila</i>	<i>Valor asignado (µg/mL)</i>
Fila A	1000
Fila B	500
Fila C	250
Fila D	125
Fila E	62,5
Fila F	31,25
Fila G	15,62
Fila H	7,81
Fila I	3,9
Fila J	1,95
Fila K	0,97
Fila L	0,48

Fuente: La autora.

Cabe recalcar que en la concentración mínima inhibitoria antibacteriana el límite de diluciones que se realizaron fue de 8 diluciones es decir solo hasta la fila H; mientras que en la concentración mínima inhibitoria antifúngica se realizaron 12 diluciones, es decir hasta la fila L.

2.5. Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*

La evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, se obtuvo mediante dos métodos espectrofotométricos: 1). Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS+ y 2). Radical DPPH.

Las mediciones se determinaron según la absorbancia que leía el equipo de cada muestra. Se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907. Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515nm respectivamente.

2.5.1. Preparación de la muestra de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

Para realizar el análisis de la muestra mediante los métodos anteriormente mencionados, se procedió a colocar en un vial 350 μL de cada muestra de aceite esencial, hasta obtener un volumen final de 1000 μL .

Posteriormente se procedió a realizar diluciones del aceite esencial, la primera dilución que se realizó fue partiendo de una concentración máxima inicial de 100ppm, hasta llegar a una concentración mínima final de 0ppm.

Los volúmenes respectivos de cada dilución deben ser los necesarios para analizar cada muestra por triplicado. En la tabla 5 se explica cómo se realizó cada dilución. Cabe destacar que el volumen final de cada dilución es de 1000 μL .

Tabla 5. Volumen necesario para cada dilución.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (100 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de aceite esencial
Concentración 2 (50 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 1
Concentración 3 (25 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 2
Concentración 4 (12,5 ppm)	1800 μL MeOH + 200 μL de concentración 3
Concentración 5 (5 ppm)	1200 μL MeOH + 800 μL de concentración 4
Concentración 6 (0 ppm)	1000 μL MeOH

Fuente: La autora.

2.5.2. Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS⁺

ABTS⁺, o ensayo del ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozalin-6sulfónico); también se denomina ensayo TEAC por sus siglas en inglés: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*. Este método se realiza usando un patrón que es Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico), el fundamento se basa en que usando este patrón se genera la captación de los antioxidantes del aceite esencial por parte del catión ABTS⁺ (Granados et al, 2012).

El radical ABTS⁺ posee una coloración verde azulada que se va perdiendo según la capacidad antioxidante del aceite esencial.

2.5.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

Partiendo de una solución patrón que se obtuvo mezclando dos reactivos diferentes. El primer reactivo fue el reactivo de ABTS⁺ (2,2 –azinobis-3-etil-benzotiazolina-6sulfónido), del cual se tomó una cantidad de 0,1015 g que se aforo a 25 mL con agua destilada. El segundo reactivo fue persulfato de potasio, del cual se pesó una cantidad de 0,01757 g, e igualmente se aforo a 25 mL con agua destilada. El primer y segundo reactivo se mezclan y se deja reposar por 12 horas protegido de la oscuridad.

Para obtener la solución de trabajo de ABTS⁺ se tomó 2,16 mL de la solución patrón y se mezcló con 127,84 mL de metanol. Se enciende el espectrofotómetro y se procede a medir la absorbancia a una longitud de onda de 734 nm, se debe ir ajustando la solución de trabajo hasta que el resultado de la absorbancia sea de $1,1 \pm 0,02$. Si la lectura de la absorbancia es mucho menor al resultado que queremos obtener se debe ir añadiendo más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a la esperada se debe añadir metanol puro.

Previamente a realizar la lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se debe encerrar el equipo con metanol.

2.5.2.2. Estándar Trolox para ABTS⁺.

Trolox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico, fue utilizado como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial. Trolox equivalente es un análogo sintético de la vitamina E, que se mide en unidades llamadas Trolox equivalente (Re et al, 1999).

Para realizar el estándar de Trolox, se debe pesar 0,025 gr de reactivo de Trolox y se aforo a 100 mL con metanol puro. De esta solución se toman alícuotas de 0, 250, 1500, 3000, 4500, 6000 y 8000 μ L y se aforo a 10 mL con metanol.

2.5.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.

Para determinar si el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* posee capacidad antioxidante, se debe evaluar cada muestra con suma precisión, cada dilución que se realizó anteriormente del aceite esencial así como cada alícuota de Trolox deben ser tratadas de la misma manera.

Para determinar la absorbancia de cada alícuota y de cada dilución de aceite esencial, se debe colocar en un vial previamente rotulado, 150 μ L de cada alícuota de Trolox o de cada dilución de aceite esencial más 2850 μ L de la solución de trabajo previamente ajustada a la absorbancia establecida por el método, llevando el volumen a 3 mL. Todas las muestras se analizaron por triplicado (ver figura 21).

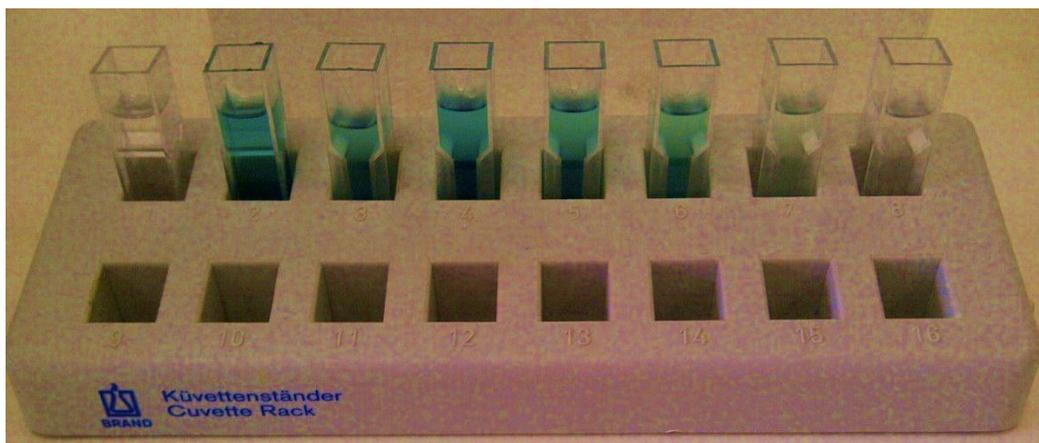


Figura 21. Muestras del aceite *Clinopodium taxifolium*, analizadas mediante método ABTS⁺. Fuente: La autora.

Posteriormente a la mezcla de la alícuota con la solución de trabajo se deja reposar los viales por dos horas en la oscuridad y después se lee la absorbancia a 734 nm. Previamente a cada lectura se comprueba que el encerado este correcto, para que no altere la lectura de nuestras muestras.

2.5.3. Método Radical DPPH:

Este método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los componentes antioxidantes de la muestra de aceite esencial. Este radical posee una coloración púrpura que se va perdiendo progresivamente cuando la muestra que se añade posee capacidad antioxidante. Esta decoloración se puede medir mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

Aparentemente los compuestos que posean moléculas más pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen mayor afinidad por este método.

2.5.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.

La solución patrón se realizó pesando 0,024 g de reactivo de DPPH y aforando a 100 mL con metanol puro. De esta solución se transfirió 27,63 mL a un vaso de precipitación con 106,37 mL de metanol puro para obtener la solución de trabajo. De esta última solución se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm, la lectura de la absorbancia establecida previamente por el método es de $1,08 \pm 0,02$. Si la lectura de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol puro y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución patrón.

Previo a la lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se encera el equipo con metanol, ya que este es el disolvente que estamos usando en todo el método.

2.5.3.2. Estándar Trolox para DPPH.

Como ya se mencionó previamente Trolox fue utilizado como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial para ambos métodos.

Para realizar el estándar de Trolox, se debe pesar 0,025 g de reactivo de Trolox y se afora a 100 mL con metanol puro. De esta solución se toman alícuotas de 0, 250, 1500, 3000, 4500, 6000 y 8000 μL y se afora a 10 mL con metanol.

2.5.3.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.

Al igual que al realizar la parte experimental del método de ABTS⁺, en este método también se utilizó las muestras diluidas a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*. Además, las alícuotas del estándar de Trolox reciben el mismo tratamiento que las muestras diluidas.

Cabe destacar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. Entonces, de cada muestra se transfirió 150 μL a un vial previamente rotulado y si no es de color ámbar, debe estar protegido de la luz. Este vial contiene también 2850 μL de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, estos viales se dejan reposar por 24 horas en la oscuridad y posteriormente se lee la absorbancia de cada muestra a 515 nm (ver figura 22).

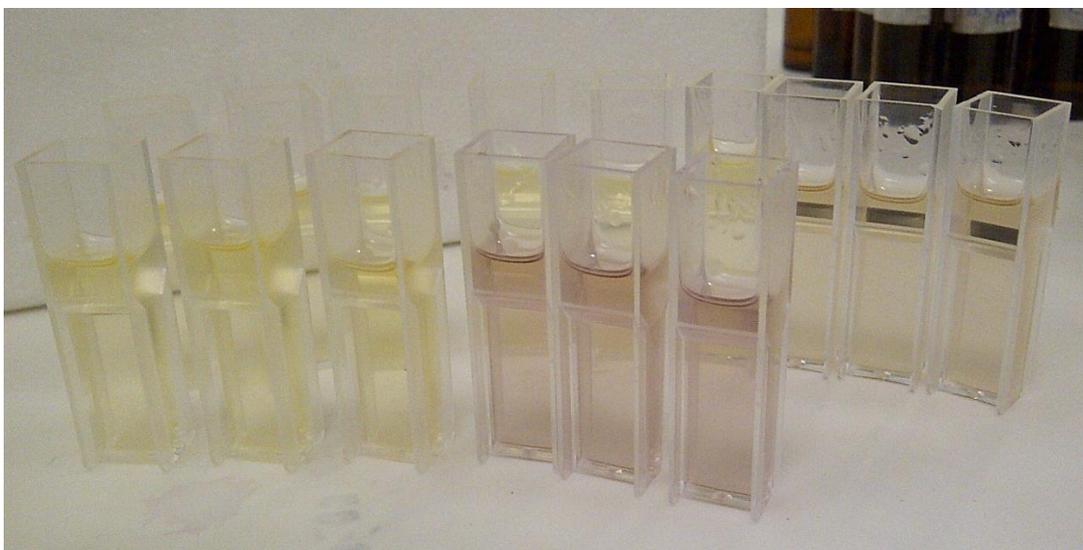


Figura 22. Muestras del aceite *Clinopodium taxifolium*, analizadas mediante método DPPH.
Fuente: La autora.

2.5.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS⁺ y DPPH.

Las absorbancias determinadas para cada muestra mediante el método ABTS⁺ y DPPH, permiten calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los radicales, en la figura 23 se observa la fórmula utilizada para calcular el % de inhibición.

$$\% \text{ Inhb.} = \left\{ \left(\frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}} \right) * 100 \right\}$$

Figura 23. Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.
Fuente: Granados et. al., 2012.

Posteriormente con el porcentaje de inhibición se halló el valor de la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de cada muestra diluida de aceite esencial. La CI₅₀ se halló realizando una gráfica de concentración vs. Porcentaje de inhibición, obteniendo así una ecuación para la recta, con la cual se determina la concentración necesaria para que el porcentaje de inhibición sea del 50%.

Para obtener la ecuación necesaria para calcular CI₅₀, se utilizó el programa OriginPro versión 8.5.

Las alícuotas tomadas del estándar de Trolox fueron tratadas como una muestra más, con los datos de concentración y absorbancia obtenidos, se realizó una gráfica lineal. Que determinaba si los valores obtenidos en la parte experimental, verificaban que el método había sido llevado a cabo correctamente.

Los resultados de CI_{50} del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, son expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC: μmol de Trolox/g de aceite esencial). Para esto es necesario determinar el valor de CI_{50} de la muestra y del estándar de Trolox. Para reemplazarlos en la fórmula de TEAC (ver figura 24).

$$TEAC = \left\{ \frac{CI_{50} \text{ TROLOX } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right)}{IC_{50} \text{ MUESTRA } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)} \right\}$$

Figura 24. Fórmula para calcular TEAC.
Fuente: Re et. al., 1999.

Cabe destacar que para calcular el CI_{50} mediante el método de $ABTS^+$ es necesario calcular el equivalente de $ABTS^+$, esto se realiza mediante la fórmula de la pendiente que se puede calcular con los datos de absorbancia vrs. Concentración en Microsoft Excel.

2.6. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.

2.6.1. Densidad relativa.

La densidad es una magnitud física que relaciona la cantidad de materia existente con el volumen que ocupa, a una determinada temperatura y presión atmosférica. La densidad del aceite esencial se determina tomando como referencia al agua.

Según la norma AFNOR NF T 75-111 (ver anexo 3), los materiales necesarios para determinar la densidad son un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un termómetro.

Para determinar la densidad relativa del aceite esencial de *Cinopodium taxifolium*, se unió las tres muestras de aceites esenciales provenientes de cada destilación, este procedimiento se realizó a una temperatura de 20°C con tres repeticiones (ver figura 25 y 26 respectivamente).



Figura 25. Pícnometro con agua destilada.
Fuente: La autora



Figura 26. Pícnometro con aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*
Fuente: La autora.

2.6.2. Índice de Refracción.

El índice de refracción también es una magnitud física, que en los aceites esenciales es un parámetro utilizado para determinar pureza. El índice de refracción se puede definir como la proporción del cambio de dirección de un rayo de luz al cambiar el medio en el que se mueve, específicamente cuando entra en contacto con un líquido.

La determinación del índice de refracción se lo realizó en base a la norma AFNOR NF T 75-112 (ver anexo 4) del aceite esencial; se utilizó un refractómetro ABBE, que es un dispositivo electrónico que mide la velocidad de una propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura determinada de 20°C.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Humedad de *Clinopodium taxifolium*.

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos en los ensayos de determinación de humedad relativa de esta especie, para cada recolección el procedimiento se realizó por triplicado. También constan los valores de la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 6. Humedad relativa.

HUMEDAD			
RECOLECCIONES	CT1	CT2	CT3
Humedad relativa (%)	54,52	36,24	56,98
\bar{x}	49,25		
σ	11,33		
C.V.	0,23		
CT1: Primera recolección. CT2: Segunda recolección. CT3: Tercera recolección \bar{x}: Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones. σ: Desviación estándar C.V.: Coeficiente de variación			

Fuente: La autora.

Las recolecciones de la materia vegetal fueron realizadas en diferentes condiciones climáticas.

La segunda destilación fue la que presentó menor humedad relativa (36,24%), este resultado podría deberse a que la planta se encontraba en verano al momento de ser recogida, por lo tanto había perdido más agua mediante la transpiración vegetal; además realiza este proceso para absorber más nutrientes y agua del suelo.

La humedad de la planta depende también de las condiciones climáticas, como luz, temperatura, viento, CO₂; en las que haya sido recolectada la materia vegetal (Reyes, 2013). La tercera recolección fue realizada en invierno, y al realizar el cálculo de humedad, los ensayos demostraron que la materia vegetal procedente de esta recolección posee más humedad relativa (56,98%) que las anteriores recolecciones.

3.2. Rendimiento de *Clinopodium taxifolium*.

El rendimiento se determinó estableciendo una relación entre el peso de la materia vegetal recolectada y el volumen de aceite esencial obtenido.

En la tabla 7 se detalla el rendimiento obtenido por cada destilación, así como su valor medio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 7. Rendimiento.

RENDIMIENTO			
RECOLECCIONES	CT1	CT2	CT3
Rendimiento (%)	0,03	0,05	0,05
\bar{X}	0,04		
σ	0,01		
C.V.	0,28		
CT1: Primera recolección. CT2: Segunda recolección. CT3: Tercera recolección \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones. σ : Desviación estándar C.V.: Coeficiente de variación			

Fuente: La autora.

Mediante los resultados obtenidos se observa que el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, presenta un rendimiento bajo, que se encuentra entre 0,03% y 0,05%.

Para la destilación se utilizó la materia vegetal fresca. Se puede observar que en la primera recolección el rendimiento es mucho menor (0,03%) que en la segunda (0,05%) y tercera recolección (0,05%), la cantidad de materia vegetal que se utilizó en la primera destilación fue de aproximadamente 7 kg, obteniéndose aproximadamente un volumen de 1 mL de aceite. Mientras que en la segunda y tercera recolección se utilizó aproximadamente 10 kg, obteniendo un volumen de aceite esencial de 3 mL.

El contenido de aceite esencial en las plantas es bajo, por ello es necesario destilar una cantidad abundante de materia vegetal por un tiempo prolongado de 3 a 4 horas, generalmente el rendimiento suele ser de 1 a 2%, regularmente el contenido de aceite esencial en las plantas aumenta en invierno por las continuas lluvias que se dan (SENA,

2004). Además esta cantidad depende de factores químicos o físicos que afecten a la planta en el momento de la recolección.

3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium taxifolium*.

3.3.1. Análisis cualitativo.

La identificación cualitativa de la composición química se llevó a cabo mediante el análisis CG/MS de las muestras de aceite esencial. Cada compuesto detectado por el equipo, fue identificado mediante la base de datos de la librería WILEY 7n, con un porcentaje de coincidencia mayor al 90% para cada compuesto.

Además del porcentaje de coincidencia, el equipo arroja los datos necesarios para calcular el índice de Kovats propio de cada compuesto. El cromatógrafo también determina el porcentaje en el que esta presente cada compuesto en el aceite esencial, tanto en la columna polar como no polar.

En la figura 27 y 28 se puede observar el perfil cromatografico del aceite esencial de *C. taxifolium*, en la columna no polar o DB-5MS y en la columna polar o HP-INNOWAX respectivamente, mediante la técnica de CG-MS acorde a los parámetros operacionales descritos en el capítulo de metodología.

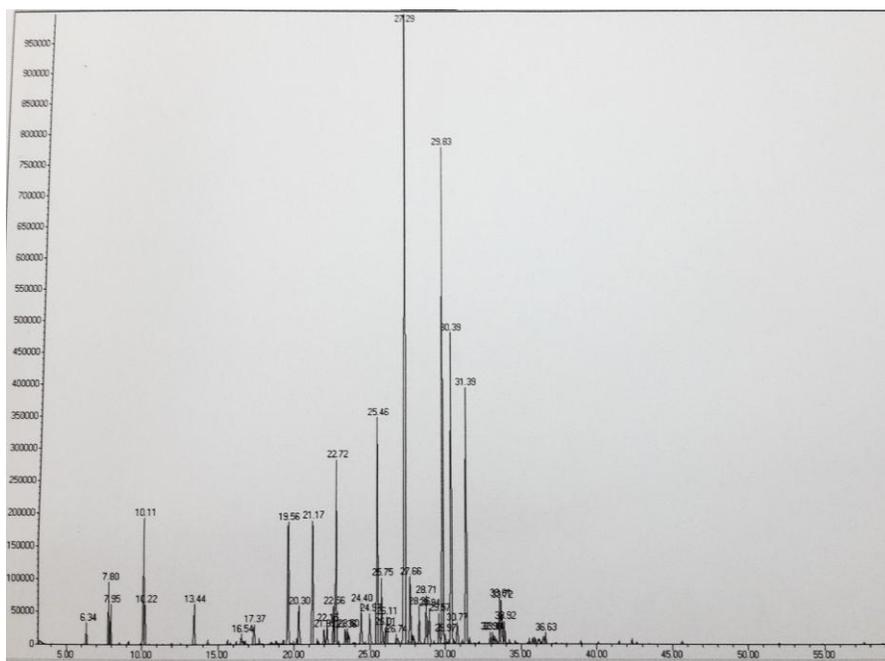


Figura 27. Perfil cromatográfico en la columna no polar.

Fuente: La autora.

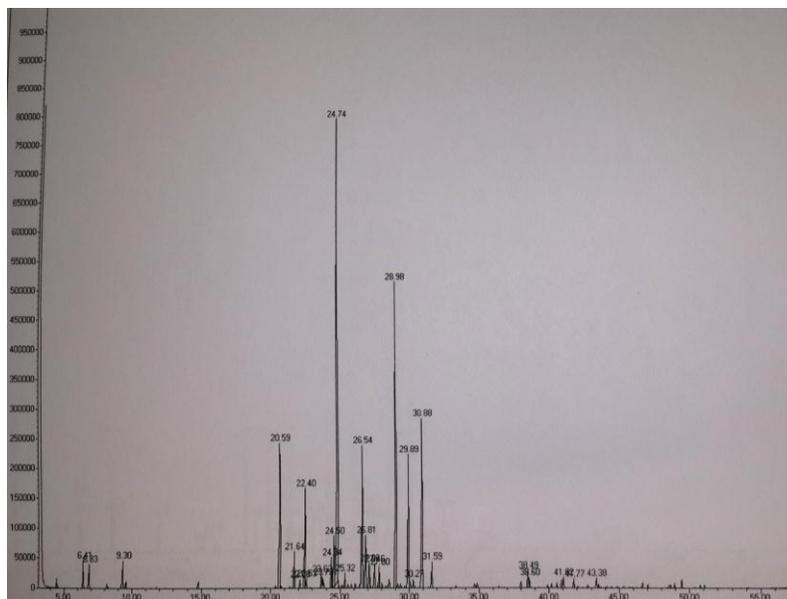


Figura 28. Perfil cromatografico en la columna polar.
Fuente: La autora.

Dentro de las tres corridas cromatográficas que se realizaron en cada columna, se analizó un total de 50 a 52 compuestos, los mismos que representan un 97,60% en la columna no polar (DB-5MS) y un 94,70% en la columna polar (HP-INNOWAX). Los compuestos mayoritarios en la columna no polar fueron se exponen en la figura 29.

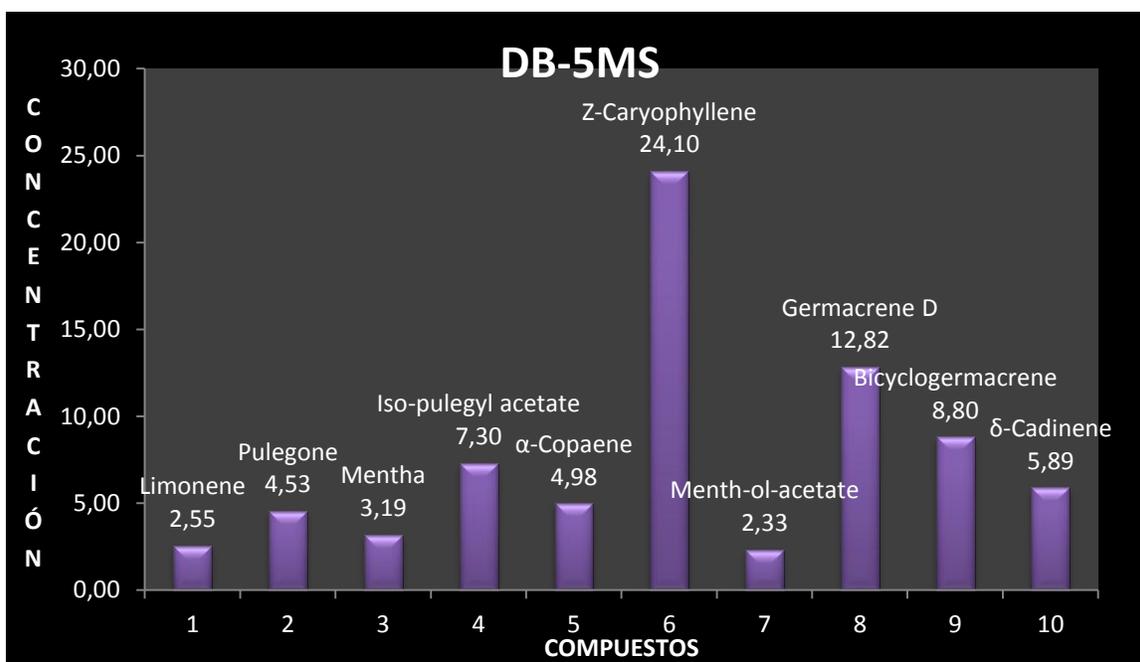


Figura 29. Compuestos mayoritarios en columna no polar.
Fuente: La autora.

En la figura 30 se expresan los compuestos mayoritarios en la columna polar.

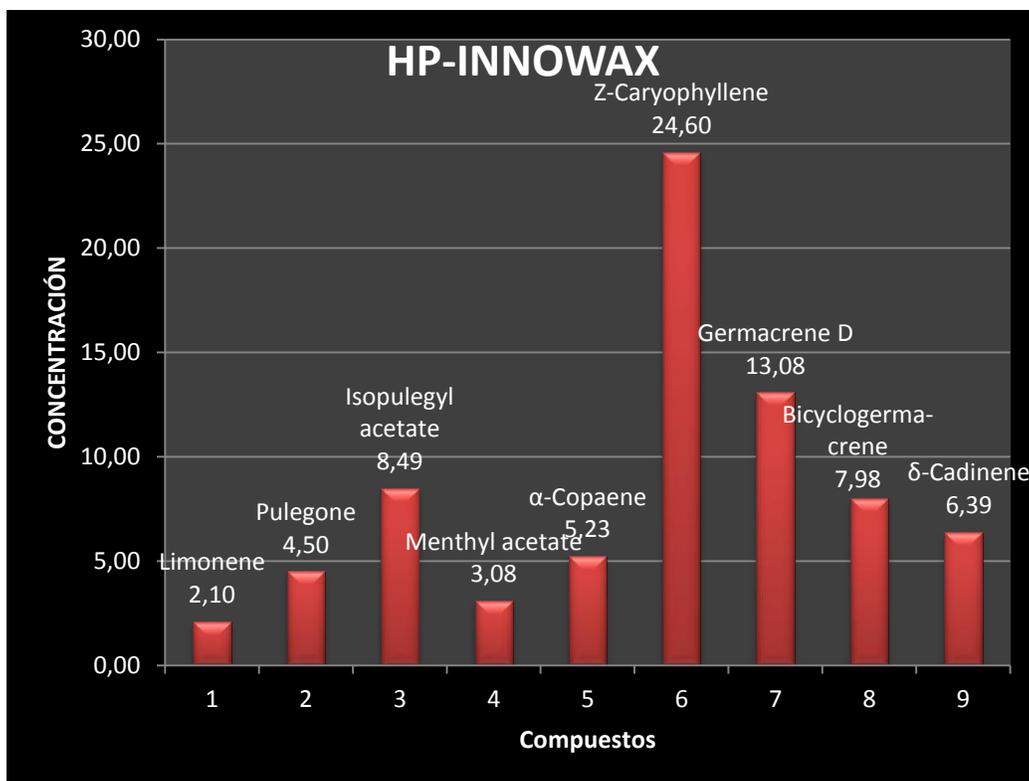


Figura 30. Compuestos mayoritarios en columna polar.
Fuente: La autora.

Clinopodium taxifolium, es una especie que no cuenta con estudios acerca de sus propiedades físicas o químicas, por eso no es posible comparar la composición química obtenida con alguna referencia. Debido a esto se tomó como referencia la composición química de otra especie de la misma familia.

Se determinó que la composición química de *Clinopodium taxifolium*, es muy similar a otras especies de su misma familia.

Un estudio realizado en *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze), revela que posee compuestos mayoritarios similares a la especie estudiada en la presente investigación, como: pulegone, isopulegone, α-copaene, linalool, limonene, piperitenone, etc (Tene et. al., 2006).

Los compuestos mayoritarios son los mismos en las dos columnas utilizadas, en la tabla 8, se indican los índices de Kovats pertenecientes a cada compuesto tanto, el índice de Kovats calculado como el de referencia utilizado, además se visualiza el porcentaje en el que se encuentra cada compuesto presente en los aceites obtenidos de cada recolección.

Consta también el valor de la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de cada compuesto; perteneciente a cada columna.

El orden de los compuestos, es de acuerdo a la elución de cada uno de ellos en la columna no polar (DB-5MS).

Tabla 8. Composición química de *Clinopodium taxifolium*. Índice de Kovats calculado y de referencia.

DB-5MS										HP-INNOWAX							
% DE CANTIDAD RELATIVA										% DE CANTIDAD RELATIVA							
	COMPUESTOS	IK ^c	IK ^r	CT1	CT2	CT3	\bar{X}	Σ	C.V.	IK ^c	IK ^r	CT1	CT2	CT3	\bar{X}	σ	C.V.
1	α -Pinene	933	932 ^a	0,34	0,17	0,43	0,31	0,13	0,42	1035	1039 ^c	0,23	0,20	0,43	0,29	0,13	0,44
2	Sabinene	969	936 ^a	1,12	0,77	1,47	1,12	0,35	0,31	1114	1129 ^c	0,73	0,85	1,49	1,02	0,41	0,40
3	B-Pinene	973	974 ^a	0,70	0,25	0,55	0,50	0,23	0,46	1101	1118 ^c	0,87	0,26	0,53	0,56	0,31	0,55
4	Limonene	1025	1024 ^a	2,66	0,89	4,11	2,55	1,61	0,63	1194	1202 ^c	0,96	1,03	4,31	2,10	1,92	0,91
5	1,8-Cineole	1027	1026 ^a	0,79	0,83	1,26	0,96	0,26	0,27	1202	1213 ^c	0,27	0,86	1,19	0,77	0,46	0,60
6	Linalool	1100	1095 ^a	0,89	0,67	1,28	0,95	0,31	0,32	1559	1544 ^c	0,59	1,00	1,49	1,03	0,45	0,44
7	Menthol	1168	1167 ^a	0,23	0,22	-----	0,22	0,13	0,58	1603	1614 ^c	0,61	0,33	0,14	0,36	0,24	0,66
8	α -Terpineol	1193	1186 ^a	-----	0,14	0,24	0,19	0,12	0,64	1705	1688 ^d	0,18	0,31	0,43	0,31	0,13	0,41
9	Pulegone	1234	1233 ^a	3,14	6,58	3,87	4,53	1,82	0,40	1642	1662 ^c	2,45	7,02	4,03	4,50	2,32	0,52
10	E-Piperitone oxide	1251	1249 ^a	0,95	0,17	1,54	0,89	0,69	0,77	1729	1740 ^c	0,28	0,25	1,67	0,74	0,81	1,10
11	Mentha	1270	1273 ^a	3,11	4,38	2,10	3,19	1,15	0,36	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
12	Isopulegyl acetate	1277	1275 ^a	-----	0,68	0,13	0,40	0,36	0,89	1635	1608 ^c	7,09	13,63	4,75	8,49	4,60	0,54
13	Menth-ol	1287	1294 ^a	0,38	0,31	0,24	0,31	0,07	0,23	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
14	Menthyl acetate	1301	1295 ^a	0,89	0,77	0,89	0,85	0,07	0,08	1529	1541 ^e	4,42	2,98	1,84	3,08	1,29	0,42
15	Iso-pulegyl acetate	1304	1312 ^a	4,46	13,22	4,24	7,30	5,12	0,70	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16	Myrtenyl acetate	1319	1324 ^a	0,33	0,27	0,33	0,31	0,03	0,10	1688	1677 ^f	0,38	0,37	0,37	0,37	0,01	0,02
17	Cyclohexanol acetate <trans-2terp-butyl>	1323	1312 ^a	0,36	0,13	0,36	0,28	0,13	0,47	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
18	Bicycloelemene	1325	1326 ^b	0,20	0,15	0,22	0,19	0,04	0,18	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
19	Benzenemethanol <3hidroxy>	1343	1339 ^a	1,10	0,58	1,12	0,93	0,31	0,33	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
20	Piperitenone oxide	1357	1366 ^a	0,88	0,40	1,42	0,90	0,51	0,56	1957	1918 ^c	0,26	0,52	1,38	0,72	0,58	0,81
21	α -Copane	1368	1374 ^a	5,64	4,28	5,02	4,98	0,68	0,14	1483	1481 ^c	6,57	4,17	4,96	5,23	1,22	0,23
22	β -Bourbonene	1375	1387 ^a	1,61	0,79	1,52	1,31	0,45	0,34	1509	1509 ^c	1,57	0,71	1,39	1,22	0,45	0,37
23	β -Cubebene	1381	1387 ^a	0,39	0,22	0,31	0,31	0,08	0,27	1532	1544 ^c	0,60	0,20	0,43	0,41	0,20	0,49
24	β -Elemene	1383	1389 ^a	0,64	0,44	0,54	0,54	0,10	0,19	1578	1570 ^g	1,36	2,45	1,28	1,69	0,65	0,39
25	Z-Caryophyllene	1411	1417 ^a	21,61	21,08	25,60	24,10	2,62	0,11	1588	1593 ^g	26,41	20,59	26,82	24,60	3,48	0,14
26	β -Gurjunene	1420	1431 ^a	1,77	1,20	0,92	1,29	0,43	0,33	1582	1593 ^g	2,72	1,17	0,80	1,56	1,02	0,65
27	Menth-ol-acetate	1434	1421 ^a	0,96	4,81	1,23	2,33	2,15	0,92	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
28	α -Humulene	1445	1452 ^a	1,43	1,02	1,32	1,26	0,21	0,17	1659	1670 ^c	1,06	0,86	1,08	1,00	0,12	0,12
29	Z- β -Farnesene	1451	1444 ^a	1,25	0,73	1,05	1,01	0,26	0,26	1668	1665 ^h	0,78	0,55	0,70	0,68	0,12	0,18
30	NO IDENTIFICADO ^s	1466	-----	0,85	3,38	1,12	1,78	1,39	0,78	2047	-----	0,31	3,41	1,07	1,60	1,62	1,01

31	Germacrene-D	1472	1484 ^a	14,68	10,54	13,25	12,82	2,10	0,16	1700	1700 ^h	16,06	9,91	13,27	13,08	3,08	0,24		
32	Bicyclogermacrene	1486	1500 ^a	8,39	8,42	9,61	8,80	0,70	0,08	1725	1724 ^h	6,47	7,85	9,62	7,98	1,58	0,20		
33	Aciphyllene	1495	1501 ^a	0,88	0,47	0,91	0,75	0,25	0,33	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
34	δ-Cadinene	1511	1522 ^a	6,76	5,23	5,68	5,89	0,79	0,13	1752	1748 ^h	8,15	5,16	5,85	6,39	1,56	0,25		
35	Nerolidol-E	1559	1561 ^a	0,20	0,27	-----	0,23	0,14	0,60	2051	2054 ⁱ	0,48	0,43	0,27	0,39	0,11	0,27		
36	Spathulenol	1568	1577 ^a	1,20	1,01	1,36	1,19	0,17	0,15	2126	2129 ⁱ	0,38	0,79	0,98	0,72	0,31	0,43		
37	Caryophyllene oxide	1571	1582 ^a	1,15	0,72	1,23	1,03	0,27	0,26	1972	1999 ⁱ	0,75	0,54	0,96	0,75	0,21	0,28		
38	Selina-3,7(11)-diene	1576	1545 ^a	0,60	0,29	0,62	0,51	0,18	0,36	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
39	Isospathulenol	1625	1639 ^a	0,15	-----	0,19	0,17	0,10	0,59	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
40	α-Cadinol	1648	1652 ^a	0,32	0,24	0,30	0,29	0,04	0,14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
41	Viridoflorol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1836	1846 ⁱ	0,19	1,23	0,42	0,61	0,55	0,89		
42	Neomenthol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1562	1997 ^h	0,49	0,28	0,16	0,31	0,17	0,54		
43	2-2-pyrrol-me-3me6me-pyrrazine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1615	1570 ^j	0,15	0,13	-----	0,14	0,08	0,58		
44	Trans-Carvyl acetate	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1735	1606 ^j	0,35	0,15	0,35	0,28	0,12	0,42		
45	Carveol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1772	1759 ^k	1,06	0,86	1,19	1,04	0,17	0,16		
46	Globulol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2074	2051 ^h	0,36	0,13	0,34	0,28	0,12	0,45		
47	γ-Eudesmol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2235	2240 ^c	-----	0,45	0,37	0,41	0,24	0,59		
*TOTAL:									97,50	*TOTAL									94,70

Fuente: La autora.

El orden de los compuestos es de acuerdo a la elución en la columna DB-5MS.

CT1: aceite de la primera recolección. **CT2:** aceite de la segunda recolección. **CT3:** aceite de la tercera recolección.

IK^C: Índice de Kovats calculado.

IK^R: Índice de Kovats de referencia. a. Adams (2009), b. Nickavar et.a. (2006), c. Stashenko et.al. (2003), d. Jordan et.al. (2002), e. Ka et.al. (2005), f. Cavalli et.al. (2003), g. Adams (1995), h. Julien et.al. (2007), i. Choi (2003), j. Chen y Ho (1998), k. Pino et.al. (2005), l. Choi (2003).

-----: Compuesto no detectado.

*: % total de compuestos identificados en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.

NO IDENTIFICADO^S: 110(100); 43(51,04); 95(50,10); 152(34,87); 69(29,50); 109(23,07); 155(22,62); 137(19,32); 41(17,70); 55(17,24); 83(16,76); 115(14,16); 56(11,79); 111(11,05); 81(10,95).

3.3.2. Análisis cuantitativo.

El análisis cuantitativo de *Clinopodium taxifolium*, se llevó a cabo mediante la comparación del porcentaje de cantidad relativa de cada pico detectado en el detector de ionización de llama (FID) con el porcentaje de cantidad relativa de cada pico identificado en masas, tanto en la columna no polar como polar.

Mediante el análisis cualitativo y cuantitativo se confirma la presencia de los compuestos identificados en el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

En la tabla 9, se muestran los compuestos identificados en las columnas no polar (DB-5MS) y polar (HP-INNOWAX) con sus respectivos porcentajes de cantidad relativa identificados mediante el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas. Además se presentan los datos de los porcentajes de cantidad relativa proporcionados por el equipo al utilizar el detector de ionización de llama (FID).

De cada compuesto se calculó la media aritmética del porcentaje de cantidad relativa tanto para masas y FID conjuntamente con la desviación estándar en FID.

Tabla 9. Porcentaje de cada compuesto identificado mediante el detector de ionización de llama (FID). Tanto para la columna no polar (DB-5MS) y polar (HP-INNOWAX).

DB-5MS-FID										HP-INNOWAX-FID								
COMPUESTOS	% DE CANTIDAD RELATIVA									% DE CANTIDAD RELATIVA								
	CT1		CT2		CT3		MS	FID		CT1		CT2		CT3		MS	FID	
	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	\bar{X}	σ	MS	FID	MS	FID	MS	FID	\bar{X}	\bar{X}	σ
α -Pinene	0,34	0,28	0,17	0,26	0,43	0,49	0,31	0,35	0,13	0,23	0,26	0,20	0,25	0,43	0,52	0,29	0,34	0,15
Sabinene	1,12	0,85	0,77	0,99	1,47	1,62	1,12	1,15	0,41	0,73	0,86	0,85	1,04	1,49	1,76	1,02	1,22	0,48
B-Pinene	0,70	1,16	0,25	0,40	0,55	0,71	0,50	0,75	0,38	0,87	1,07	0,26	0,37	0,53	0,71	0,56	0,72	0,35
Limonene	2,66	0,94	0,89	1,00	4,11	4,31	2,55	2,09	1,93	0,96	1,17	1,03	1,30	4,31	5,14	2,10	2,53	2,26
1,8-Cineole	0,79	0,42	0,83	1,09	1,26	0,96	0,96	0,99	0,53	0,27	0,37	0,86	0,95	1,19	1,27	0,77	0,86	0,46
Linalool	0,89	0,33	0,67	0,77	1,28	0,95	0,95	0,77	0,45	0,59	0,56	1,00	1,32	1,49	1,91	1,03	1,26	0,68
Menthol	0,23	0,51	0,22	0,31	-----	-----	0,22	0,41	0,26	0,61	0,70	0,33	0,42	0,14	0,22	0,36	0,45	0,24
A-Terpineol	-----	-----	0,1	0,18	0,24	0,22	0,19	0,20	0,12	0,18	0,27	0,31	0,18	0,43	0,14	0,31	0,20	0,06
Pulegone	3,14	1,93	6,58	7,18	3,87	3,34	4,53	4,18	2,70	2,45	2,70	7,02	7,89	4,03	4,45	4,50	5,01	2,64
E-Piperitone oxide	0,95	0,25	0,17	0,25	1,54	1,58	0,89	0,69	0,76	0,28	0,60	0,25	0,35	1,67	1,70	0,74	0,88	0,72
Mentha	3,11	4,15	4,38	4,27	2,10	1,93	3,19	3,45	1,32	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Isopulegyl acetate	-----	-----	0,68	0,72	0,13	0,17	0,40	0,45	0,38	7,09	5,25	13,63	13,99	4,75	4,58	8,49	7,94	5,25
Menth-ol	0,38	0,57	0,31	0,39	0,24	0,29	0,31	0,42	0,14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Menthyl acetate	0,91	0,89	0,77	0,79	0,89	0,82	0,85	0,84	0,05	4,42	3,65	2,98	2,61	1,84	1,61	3,08	2,62	1,02
Iso-pulegyl acetate	4,46	4,74	13,22	13,30	4,24	4,04	7,30	7,36	5,16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Myrtenyl acetate	0,33	0,25	0,27	0,32	0,33	0,33	0,31	0,30	0,04	0,38	0,35	0,37	0,36	0,37	0,47	0,37	0,39	0,07
Cyclohexanol acetate <trans-2terp-butyl>	0,36	0,24	0,13	0,21	0,36	0,38	0,28	0,28	0,09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Bicycloelemene	0,20	0,31	0,15	0,28	0,22	0,33	0,19	0,31	0,03	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Benzenemethanol <3hidroxy>	1,10	0,65	0,58	0,45	1,12	0,83	0,93	0,64	0,19	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Piperitenone oxide	0,88	0,40	0,40	0,31	1,42	1,13	0,90	0,61	0,45	0,26	0,26	0,52	0,30	1,38	1,38	0,72	0,65	0,64
α -Copane	5,64	5,67	4,28	3,73	5,02	4,27	4,98	4,55	1,00	6,57	5,28	4,17	3,59	4,96	4,15	5,23	4,34	0,86
β -Bourbonene	1,61	1,69	0,79	0,86	1,52	1,46	1,31	1,34	0,43	1,57	1,56	0,71	0,80	1,39	1,41	1,22	1,26	0,41
β -Cubebene	0,39	0,42	0,22	0,32	0,31	0,28	0,31	0,34	0,07	0,60	1,09	0,20	0,30	0,25	0,65	0,41	0,68	0,40
β -Elemene	0,64	0,87	0,44	0,58	0,54	0,60	0,54	0,68	0,16	1,36	1,29	2,45	2,33	1,28	1,24	1,69	1,62	0,61

Z-Caryophyllene	25,61	27,87	21,08	22,00	25,60	27,47	24,10	25,78	3,28	26,41	25,45	20,59	20,59	26,82	26,10	24,60	24,05	3,01	
β-Gurjunene	1,77	2,53	1,20	1,08	0,92	0,83	1,29	1,48	0,92	2,72	2,43	1,17	1,20	0,80	0,76	1,56	1,46	0,86	
Menth-ol-acetate	0,96	0,35	4,81	4,01	1,23	1,13	2,33	1,83	1,92	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
α-Humulene	1,43	1,43	1,02	0,83	1,32	1,43	1,26	1,20	0,32	1,06	1,15	0,86	0,97	1,08	1,16	1,00	1,09	0,11	
Z-β-Farnesene	1,25	1,02	0,73	0,45	1,05	1,06	1,01	0,84	0,34	0,78	1,21	0,55	0,88	0,70	1,10	0,68	1,06	0,17	
NO IDENTIFICADO ^{SS}	0,85	0,30	3,38	3,03	1,12	1,05	1,78	1,46	1,41	0,31	0,30	3,41	2,65	1,07	0,86	1,60	1,27	1,23	
Germacrene-D	14,68	16,00	10,54	10,29	13,25	13,62	12,82	13,30	2,87	16,06	14,58	9,91	9,56	13,27	12,41	13,08	12,18	2,52	
Bicyclogermacrene	8,39	6,59	8,42	8,22	9,61	10,00	8,80	8,27	1,70	6,47	6,39	7,85	7,71	9,62	9,22	7,98	7,78	1,42	
Aciphyllene	0,88	0,31	0,47	0,35	0,91	0,58	0,75	0,41	0,14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
δ-Cadinene	6,76	6,60	5,23	4,29	5,68	4,87	5,89	5,25	1,20	8,15	6,51	5,16	4,39	5,85	4,83	6,39	5,24	1,12	
Nerolidol-E	0,20	0,54	0,27	0,06	-----	-----	0,23	0,30	0,30	0,48	0,54	0,43	0,53	0,27	0,32	0,39	0,46	0,12	
Spathulenol	1,20	0,90	1,01	0,97	1,36	1,22	1,19	1,03	0,17	0,38	0,45	0,79	0,17	0,98	0,90	0,72	0,51	0,37	
Caryophyllene oxide	1,15	1,07	0,72	0,87	1,23	1,33	1,03	1,09	0,23	0,75	1,28	0,54	0,63	0,96	2,01	0,75	1,31	0,69	
Selina-3,7(11)-diene	0,60	0,61	0,29	0,38	0,62	0,69	0,51	0,56	0,16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Isospathulenol	0,15	0,09	-----	-----	0,19	0,16	0,17	0,13	0,08	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
α-Cadinol	0,32	0,66	0,24	0,48	0,30	0,36	0,29	0,50	0,15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Viridoflorol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,19	0,12	1,23	0,88	0,42	0,40	0,61	0,47	0,39	
Neomenthol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,49	0,45	0,28	0,33	0,16	0,24	0,31	0,34	0,11	
2-2-pyrrol-me-3me6me-pyrrazine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,15	0,26	0,13	0,24	-----	-----	0,14	0,25	0,15	
Trans-Carvyl acetate	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,35	0,38	0,15	0,20	0,35	0,39	0,28	0,32	0,10	
Carveol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1,06	1,23	0,86	1,07	1,19	1,39	1,04	1,23	0,16	
Globulol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,36	0,43	0,13	0,23	0,34	0,41	0,28	0,36	0,11	
γ-Eudesmol	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,45	0,12	0,37	0,27	0,41	0,19	0,13	
*TOTAL IDENTIFICADO:							97,50	96,56		** TOTAL IDENTIFICADO:							94,64	92,48	

Fuente: La autora.

El orden de los compuestos es de acuerdo a la elución en la columna DB-5MS.

CT1: aceite de la primera recolección. **CT2:** aceite de la segunda recolección. **CT3:** aceite de la tercera recolección.

*: Porcentaje total de identificación en la columna DB-5MS-MASAS y DB-5MS-FID.

**: Porcentaje total de identificación en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID.

NO IDENTIFICADO^{SS}: 110(100); 43(53,60); 95(49,02); 152(35,12); 69 (29,77); 109(22,59); 155(21,19); 83(18,32); 137(18,27); 41(17,09); 55(16,80); 115(14,22); 56(14,03); 111(11,08); 81(10,63); 87(10,16); 68(10,07).

3.3.3. Análisis de la composición química mediante espectrometría de masas.

Después de analizar la mayoría de los compuestos con la bibliografía de referencia, para uno de los picos que no fue identificado se presenta el espectro de masas del compuesto analizado.

Se analizó también los espectros de masas, es decir los valores de abundancia de los diferentes iones (eje y) en función de la relación masa/carga (m/z) (eje x).

En las figuras 31 y 32 se observa el espectro de masas de un compuesto que no se logró identificar, el espectro de masas es el mismo tanto en la columna no polar como en la columna polar.

Se expresa el espectrograma del compuesto no identificado para que se analice más profundamente en estudios que se realicen en el futuro.

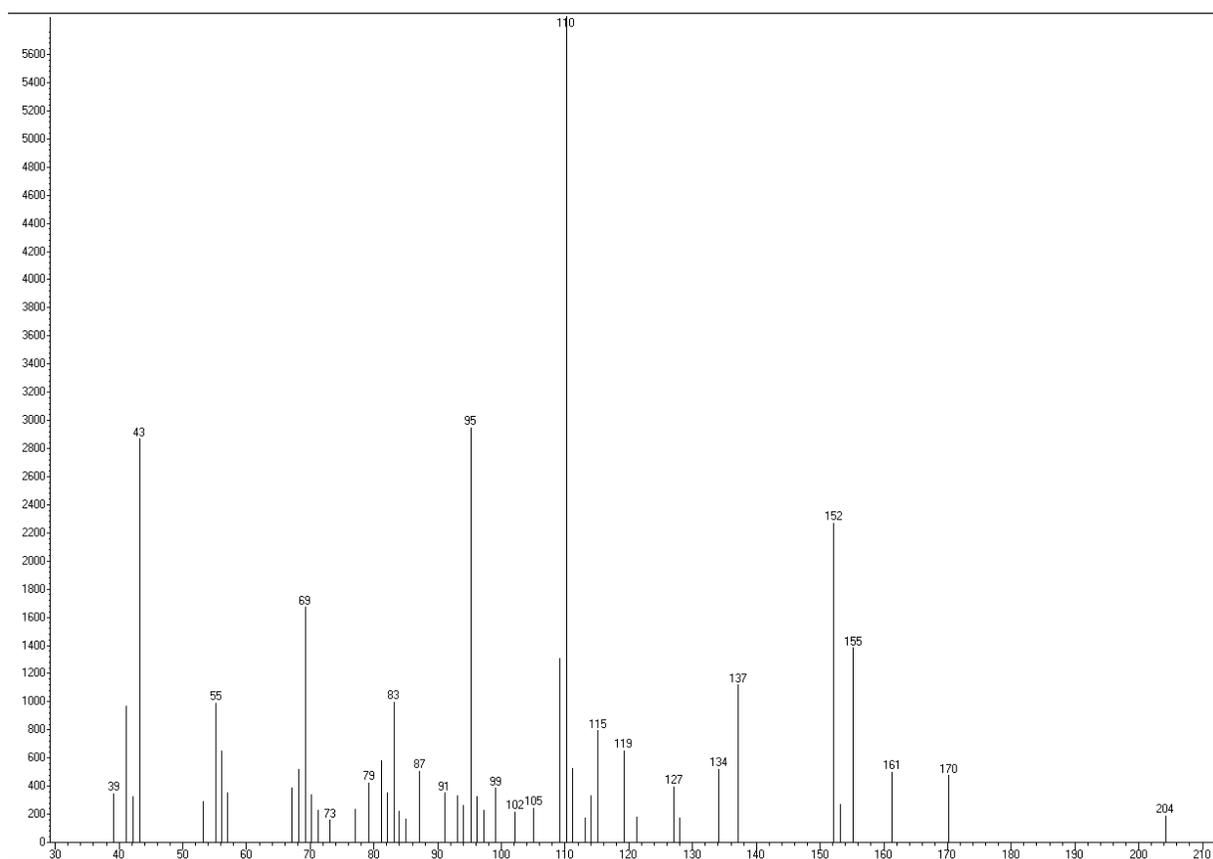


Figura 31. Compuesto NO IDENTIFICADO – Columna no polar DB-5MS.

Fuente: La autora.

A continuación se muestran los datos de abundancia y de masa/carga. El primer valor corresponde a masa/carga (m/z) y el valor en paréntesis corresponde a la abundancia del ión, este valor esta dado en porcentaje relativo.

170(7,85); 161(1,78); 155(22,62); 152(34,87); 137(19,32); 134(5,96); 127(6,34); 119(8,44); 115(14,16); 114(6,53); 111(11,05); 110(100); 109(23,07); 102(4,63); 99(5,09); 96(5,97); 95(50,10); 87(9,02); 83(16,76); 82(6,06); 81(10,95); 77(2,43); 70(6,21); 69(29,50); 68(9,02); 67(7,71); 57(5,87); 56(11,79); 55(17,24); 43(51,04); 41(17,70); 39(6,65).

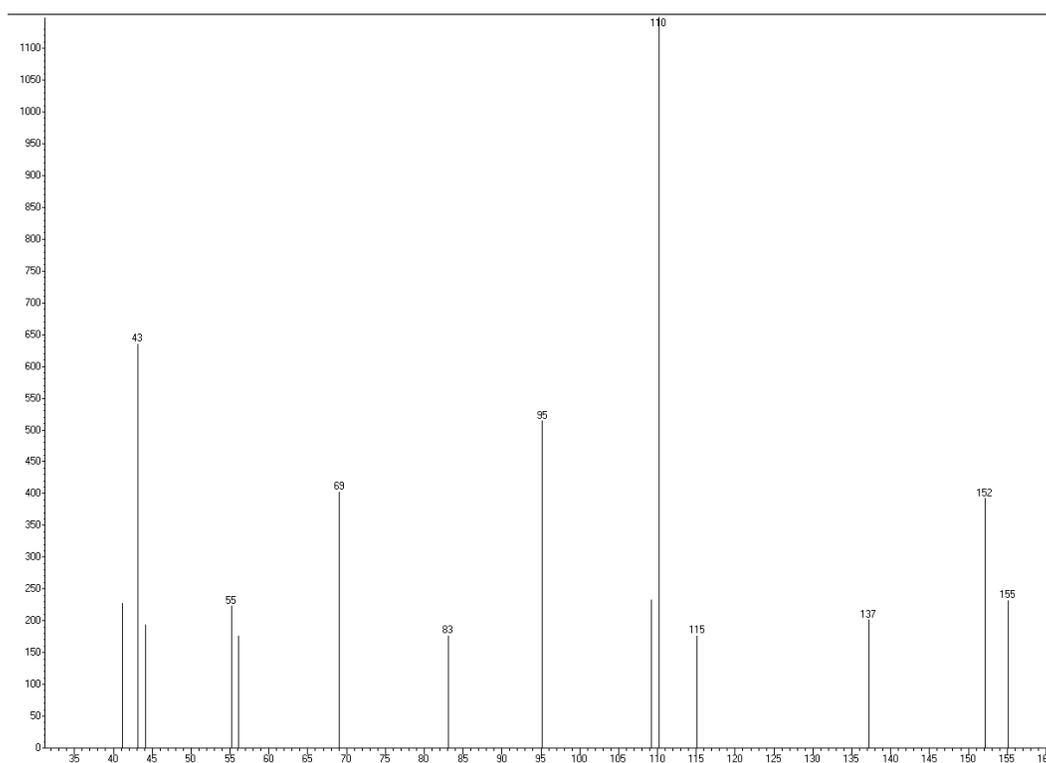


Figura 32. Compuesto NO IDENTIFICADO – Columna polar HP-INNOWAX.
Fuente: La autora.

Lo mismo que se realizó con los datos de abundancia y la relación masa/carga en la columna no polar se llevó a cabo en la columna polar HP-INNOWAX.

A continuación se muestran los datos de abundancia y masa/carga para la columna polar.

170(6,93); 155(21,19); 152(35,12); 137(18,27); 134 4,95); 127(6,64); 119(7,49); 115(14,22); 114(6,20); 111(11,08); 110(100); 109(22,59); 102(4,90); 99(5,03); 9 (5,41); 95(49,02); 87(10,16); 84(5,05); 83(18,32); 82(6,39); 81(10,63); 77(2,31); 71(5,08);

70(6,92); 69(29,77); 68(10,07); 67(7,97); 57(5,71); 56(14,03); 55(16,80); 43(53,60); 41(17,09); 39(6,30).

3.4. Actividad Biológica del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

3.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la tabla 10, se observa la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 5 cepas bacterianas Gram-negativas y 2 cepas Gram-positivas.

Tabla 10. CMI antibacteriana de los aceites esenciales de *Clinopodium taxifolium*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE <i>Clinopodium taxifolium</i> µg/mL							
Gram-negativas					Gram-positivas		
Aceite esencial	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
CT1	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL
CT2	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL
CT3	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL	> 1000 µg/mL
CONTROL	Gentamicina 1000 µg/mL 0,39 µg/MI				Gentamicina 5000 µg/mL 1,95 µg/mL		Gentamicina 1000 µg/mL 0,39 µg/mL
CT1: aceite esencial de la primera recolección. CT2: aceite esencial de la segunda recolección. CT3: aceite esencial de la tercera recolección.							

Fuente: La autora.

Como se puede observar el aceite de *Clinopodium taxifolium*, no tiene potencial como antibacteriano frente a ninguna cepa, ya que no inhibe el crecimiento ni a la concentración máxima utilizada (1000 µg/mL).

El objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria, es evaluar la susceptibilidad de un organismo bacteriano con cantidades mínimas de aceite esencial posterior a un tiempo de incubación de 18 – 24 horas.

No existen estudios de actividad biológica de esta especie con la cual se pueda comparar, pero en estudios de especies del mismo género, como en un estudio realizado

en la ciudad de Cuenca – Ecuador, de la especie *Clinopodium tenellum*, se determinó que esta especie presentaba actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, con una concentración mínima inhibitoria de 893,26 a 279,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y no presentaba actividad biológica frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Zaruma y Illescas, 2014).

En un estudio realizado en Bogotá – Colombia, sobre seis especies de la familia Lamiaceae, *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Thimus Vulgaris*; se encontró que estos aceites presentan actividad antibacteriana frente a algunas cepas. El aceite esencial de *T. vulgaris* presenta actividad contra todas las bacterias evaluadas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Por el contrario el aceite esencial de *O. basilicum* fue más activo contra estas cepas bacterianas, con una concentración mínima inhibitoria de 10 mg/mL (Roldan et. al., 2010).

La actividad biológica no solo depende del aceite esencial o de su concentración, sino también del microorganismo de prueba en sí mismo.

3.4.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) Antifúngica.

Para determinar si las muestras de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, presentan actividad inhibitoria frente a cepas fúngicas se utilizó dos tipos de hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185.

En la tabla 11 se indica los valores obtenidos de los ensayos de la concentración mínima inhibitoria antifúngica para cada recolección.

Tabla 11. CMI antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium taxifolium*.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA de <i>Clinopodium taxifolium</i> µg/mL		
Aceite esencial	<i>Trichopyton rubrum</i> ATCC 28188	<i>Trichopyton mentagrophytes</i> ATCC 28185
CT1	500	> 1000 µg/mL
CT2	1000	> 1000 µg/mL
CT2	1000	1000
CONTROL Itraconazol 1000 mg/mL 0,39 µg/mL		
NA: No activo a la concentración de 1000 µg/mL, que fue la concentración más alta utilizada. CT1: aceite esencial de la primera recolección. CT2: aceite esencial de la segunda recolección. CT3: aceite esencial de la tercera recolección.		

Fuente: La autora.

Los aceites esenciales de las tres recolecciones realizadas tuvieron actividad frente a *Trichopyton rubrum* ATCC 28188, el valor de la concentración mínima inhibitoria para la primera recolección fue de 500 µg/mL, mientras que para la segunda y tercera recolección la concentración mínima inhibitoria fue de 1000 µg/mL. Con *Trichopyton mentagrophytes* ATCC 28185 únicamente el aceite esencial de la tercera recolección tuvo actividad inhibitoria, con un valor de concentración mínima inhibitoria de 1000 µg/mL.

De acuerdo con la clasificación de la actividad antimicótica para aceites esenciales, pero Holetz citado por Zapata et al. (2010) clasifica el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la siguiente manera, si la CMI es igual o menor a 100 µg/mL se considera buena, si la CMI está entre 100 – 500 µg/mL se considera como moderada y si la CMI está entre 500 – 1000 µg/mL se considera como débil (Zapata et. al., 2010).

De acuerdo a esta clasificación el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, se puede considerar como un antimicótico débil frente a cepas fúngicas como *Trichopyton rubrum* y *Trichopyton mentagrophytes*.

De esta especie en específico no existen estudios en base a los microorganismos fúngicos que han sido evaluados en esta investigación. Pero dentro de la familia de las Lamiaceae, hay algunas especies que cuentan con investigaciones en base a organismos fúngicos.

Algunas especies del género *Origanum*, además de presentar actividad inhibitoria contra bacterias Gram – positivas y Gram – negativas; también pueden actuar sobre organismos fúngicos como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*. Los valores de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales del género *Origanum*, evaluados en la investigación mencionada establecen una CMI 0,65 -1,27 mg/mL para organismos fúngicos (Arcila et. al., 2004).

3.5. Actividad Antioxidante

3.5.1. Método Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS⁺

3.5.1.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.

Al evaluar la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, mediante el método de atrapamiento del catión – radical ABTS⁺, las diferentes concentraciones con las que se trabajó en el equipo de espectrofotometría, arrojaron datos de absorbancia, los cuales se reemplazaron en la fórmula que se encuentra en la figura 23, en el capítulo de metodología. Los resultados que se obtuvieron tras realizar estos cálculos se expresan en la tabla 12 que indica los valores de porcentaje de disminución respectivos para cada concentración, además se calculó el valor equivalente de ABTS⁺ para cada concentración, mediante la fórmula de la pendiente correspondiente para estos datos.

Tabla 12. Datos ABTS⁺.

DATOS ABTS ⁺			
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)	Equivalente de ABTS
100	0,010	98,99	832,33
50	0,005	99,55	836,92
25	0,006	99,45	836,08
12,5	0,004	99,65	837,75
5	0,017	98,34	826,92
0	0,957	3,87	22,33

Fuente: La autora.

Posteriormente a calcular el porcentaje de disminución de $ABTS^+$ y el equivalente de $ABTS^+$, se graficó los datos en el programa Origin Pro 8.5, obteniendo una gráfica y una ecuación para la recta, con la cual se calculó el CI_{50} de la muestra. En la figura 33 se puede observar la gráfica de CI_{50} de la muestra.

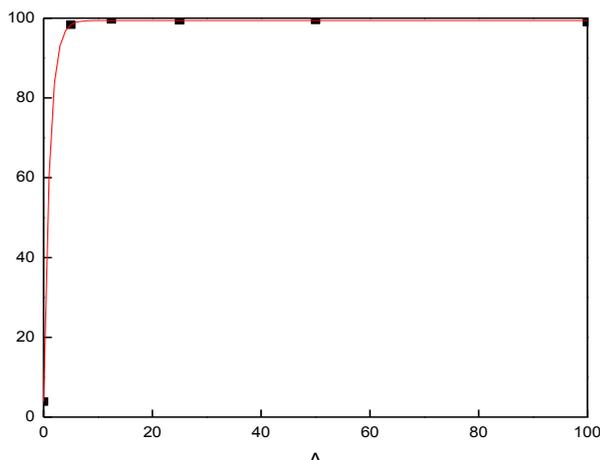


Figura 33. Gráfica de CI_{50} de $ABTS^+$ del aceite de *Clinopodium taxifolium*.
Fuente: Ing. Miguel Meneses.

En el eje "x" se expresa la concentración en ppm del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, mientras que en el eje "y" se muestra el porcentaje de disminución determinado para cada concentración establecida para esta muestra.

Con la gráfica expuesta (figura 33) se determinó una ecuación lineal, que servirá para calcular CI_{50} del aceite esencial.

En la tabla 13 se muestra la fórmula utilizada para calcular la concentración mínima necesaria para disminuir la concentración de $ABTS$ al 50% (CI_{50}).

Tabla 13. Fórmula necesaria para calcular CI₅₀ de la muestra de *Clinopodium taxifolium*.

CI₅₀ de la muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i>
$y = A_1 \times \exp\left(\frac{-x}{T_1}\right) + A_2 \times \exp\left(\frac{-x}{T_2}\right) + Y_0$
<p><i>Dónde:</i></p> <p>Y = concentración igual a 50 X = valor de acción del aceite necesario para que la concentración de inhibición sea de 50%</p> <p style="text-align: center;"> $A_1 = -47,77$ $T_1 = 1,11$ $A_2 = -47,77$ $T_2 = 1,11$ $Y_0 = 99,40$ </p>
CI ₅₀ Muestra = $7,3 \times 10^{-7}$ g/MI

Fuente: La autora.

Para poder determinar el valor de “x” se utilizó programas computarizados (origin Pro version 8.5) de análisis estadístico que despejen la incógnita necesaria y arrojen el resultado.

El evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, a diferentes concentraciones frente al radical catiónico ABTS⁺, el CI₅₀ de la muestra fue de $7,3 \times 10^{-7}$ g/mL. Este resultado sugiere que la muestra de aceite esencial posee compuestos antioxidantes relacionados a su composición química como Germacreno D, un compuesto altamente reactivo y capturador de radicales libres, este compuesto se encuentra entre los compuestos mayoritarios del aceite esencial estudiado.

El aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* puede ser un posible antioxidante natural ya que el valor de la concentración de inhibición al 50% es relativamente bajo, en comparación con el estándar de Trolox que utilizamos que tuvo un valor de la concentración de inhibición mucho más elevado.

3.5.1.2. Lectura del estándar de Trolox.

Las alícuotas que se tomaron de la solución de Trolox fueron tratadas de la misma manera que las muestras de aceite esencial, se evaluó la absorbancia de cada concentración establecida y se graficó en Microsoft Excel, los resultados obtenidos.

Los datos de absorbancia del estándar de Trolox, al igual que las muestras de aceite esencial fueron tratados con la fórmula expuesta en la figura 23 del capítulo de metodología. Se calculó el porcentaje de disminución de cada concentración y se realizó la gráfica necesaria para determinar CI_{50} del estándar de Trolox.

Tabla 14. Datos obtenidos para calcular el estándar de Trolox.

DATOS ESTANDAR DE TROLOX		
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
0	0,99	0
25	0,96	2,91
150	0,84	14,87
300	0,67	32,26
450	0,51	48,54
600	0,33	66,83
800	0,06	93,76
CI_{50} Trolox	0,46 μ mol/mL	

Fuente: La autora

En la tabla 14, se muestran los valores de absorbancia obtenidos y el porcentaje de disminución calculado de cada muestra. Con estos datos se realizó una gráfica de porcentaje de disminución vs. Concentración de Trolox. En la gráfica se extrapoló el punto 50 en el eje “y”, obteniendo el valor de la concentración en el eje “x”. Así determinamos el valor de CI_{50} del estándar de Trolox (ver figura 34).

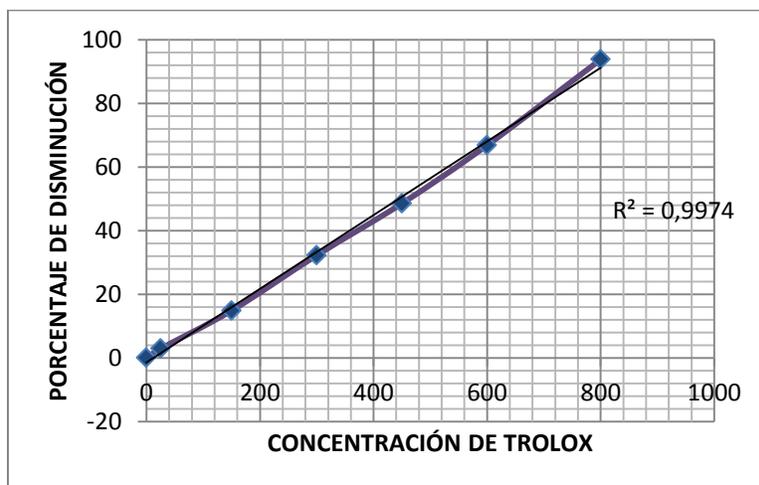


Figura 34. Gráfica del estándar de Trolox
Fuente: La autora.

3.5.1.3. Determinación de TEAC de ABTS⁺.

El ensayo TEAC, es la capacidad antioxidante equivalente al Trolox. Este valor de equivalente de Trolox es el valor referencial de la cantidad de Trolox que estaría presente por cada gramo de aceite esencial.

El valor de TEAC se calculó mediante la fórmula de la figura 24 que se encuentra en el capítulo de metodología, posteriormente a tener los datos de CI₅₀ de la muestra y del estándar de Trolox.

En la tabla 15 se presenta el valor de TEAC obtenido con método de Capacidad de atrapamiento del catión – radical ABTS⁺ para el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

Tabla 15. TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) ABTS⁺

TEAC – ABTS ⁺	
CI ₅₀ Muestra = $7,3 \times 10^{-7}$ g/mL	CI ₅₀ Trolox = 0,46 μmol/mL
TEAC ABTS ⁺ = $6,3 \times 10^5$ μmol/g	

Fuente: La autora.

Mientras el valor calculado para TEAC sea mayor, la actividad antioxidante de esta especie será mejor, ya que el estándar de Trolox tiene excelente actividad antioxidante, por eso se utiliza como referencia en el método.

El aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* en pequeñas concentraciones posee una actividad antioxidante muy buena, este potencial antioxidante se puede deber a la composición química del aceite.

En un estudio de actividad antioxidante Lamiaceae realizado en Colombia sobre dos especies vegetales de dos familias diferentes, *Calycolpus moritzianus* perteneciente a la familia Myrtaceae y *Minthostachys mollis* perteneciente a la familia Lamiaceae. Se determinó que *M. mollis* (variedad de oregano), posee actividad antioxidante debido a su composición química principalmente a Terpinen-4-ol, que es un alcohol no saturado con doble enlace que lo califica como un potencial secuestrador de radicales libres y al Germacreno D que es altamente reactivo, lo que permite que capture los radicales libres.

El valor de TEAC para *M. mollis* es de 631.72 μ moles de Trolox por cada gramo de aceite (Granados et.al., 2012).

En comparación con esta especie, el aceite esencial de *C. taxifolium* posee una TEAC de $6,3 \times 10^5$ μ moles de Trolox por cada gramo de aceite. Algunos autores atribuyen esta actividad antioxidante a su composición química rica en compuestos donadores de hidrógeno; este aceite esencial podría ser considerado para realizar más estudios específicos referidos al uso de esta especie como posible antioxidante natural en la industria alimenticia o farmacológica (Granados et.al., 2012).

La capacidad antioxidante de los aceites esenciales se debe principalmente a la ubicación geográfica en la que fue recolectada la materia vegetal, debido a que inciden los factores que estaban alterando la supervivencia de la planta. Estos factores que inciden en el desarrollo o la supervivencia de la especie vegetal pueden ser el clima, el suelo, el uso de fertilizantes o la falta de nutrientes para la planta (Arango et. al., 2012).

3.5.2. Método Radical DPPH:

3.5.2.1. Lectura de las muestras de aceite esencial.

Además del método de atrapamiento del radical ABTS⁺, también se evaluó la capacidad antioxidante de las muestras de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, mediante el método radical DPPH. El cual utiliza el radical libre DPPH, para reducir el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picril hidracina, esta reducción se produce por la acción antioxidante de los compuestos presentes en el aceite esencial que contengan grupos –OH que decoloren el reactivo DPPH.

Los datos obtenidos mediante el método de radical DPPH, fueron analizados de la misma manera que los datos obtenidos por el método ABTS⁺; las concentraciones evaluadas en el espectrofotómetro arrojaron datos de absorbancia, con los cuales se determinó el porcentaje de disminución del aceite esencial para cada concentración establecida. Para esto se utilizó la fórmula de la figura 23 que se encuentra en el capítulo de metodología.

En la tabla 16 se indican las concentraciones utilizadas, los valores de absorbancia para cada concentración y los porcentajes de disminución de DPPH calculados para cada concentración establecida.

Tabla 16. Datos DPPH:

DATOS DPPH		
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
100	0,005	95,29
50	0,021	82,05
25	0,048	58,54
12,5	0,067	42,73
5	0,084	27,77
0	0,117	0

Fuente: La autora.

Posteriormente a la obtención de estos datos, se utilizó el programa estadístico computarizado Origin Pro 8.5 para realizar la gráfica correspondiente a CI_{50} de la muestra y así obtener la ecuación de la gráfica necesaria para determinar el valor de la concentración mínima necesaria para que la inhibición sea del 50%.

En la siguiente figura 35 se observa la gráfica de la muestra obtenida para este aceite esencial.

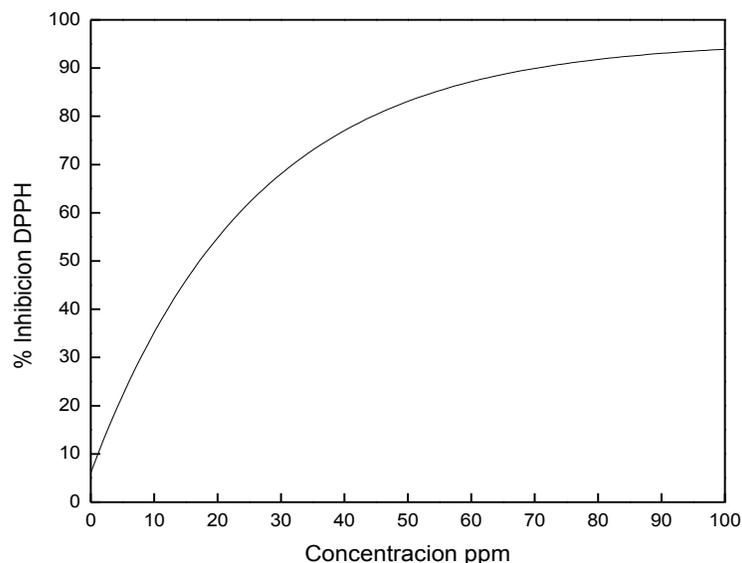


Figura 35. Gráfica de CI_{50} de DPPH del aceite de *Clinopodium taxifolium*
Fuente: La autora.

A partir de la gráfica de la figura 35 se determinó la ecuación necesaria para determinar CI_{50} de la muestra. En la tabla se muestra la ecuación y los valores determinados para cada carácter.

Tabla 17. Ecuación necesaria para determinar CI_{50} en DPPH.

CI_{50} de la muestra de <i>Clinopodium taxifolium</i>
$y = A_1 \times \exp\left(\frac{-x}{T_1}\right) + Y_0$
<p><i>Dónde:</i></p> <p>Y = concentración igual a 50 X = valor de acción del aceite necesario para que la concentración de inhibición sea de 50%</p> <p style="text-align: center;">$A_1 = -89,56$ $T_1 = 25,46$ $Y_0 = 95,66$</p>
CI_{50} Muestra = $17,15 \times 10^{-6}$ g/mL

Fuente: La autora.

Al igual que en el método ABTS⁺, para determinar el valor de “x” se utilizó programas computarizados de análisis estadístico que despejen la incógnita necesaria y arrojen el resultado.

El evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, a diferentes concentraciones frente al radical DPPH[·], el valor de CI_{50} de la muestra fue de $17,15 \times 10^{-6}$ g/mL. Este resultado es ligeramente más bajo que el valor obtenido por el método ABTS⁺. Aun así la muestra de aceite esencial posee en su composición química, compuestos antioxidantes altamente hidrófilos que reaccionan con el radical DPPH[·] y producen una decoloración del reactivo.

Como se puede observar en la figura 36 las muestras de aceite esencial al reaccionar con el reactivo de DPPH[·], producen una decoloración de la solución.

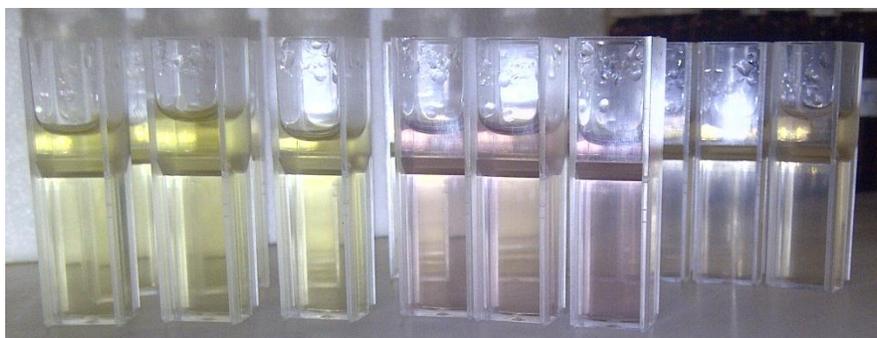


Figura 36. Muestras del aceite esencial con el reactivo de DPPH.
Fuente: La autora.

Cabe recalcar que la lectura de cada concentración se realizó por triplicado, y que previamente a cada lectura, el equipo de espectrofotometría fue encendido con metanol puro.

3.5.2.2. Lectura del estándar de Trolox.

En este método como en ABTS⁺, el estándar utilizado fue el Trolox. Las alícuotas que se tomaron de la solución estándar de Trolox tuvieron el mismo tratamiento que las muestras de aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, posteriormente a la lectura de las absorbancias de cada alícuota, proceso que se realizó por triplicado.

Se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de disminución de cada alícuota para poder realizar la gráfica en Microsoft Excel. Los cálculos se hicieron en base a la fórmula que se encuentra en la figura 26 del capítulo de metodología.

Los datos de concentración establecida, absorbancia de cada concentración y porcentaje de disminución se expresan en la tabla 18.

Tabla 18. Datos obtenidos para calcular el estándar de Trolox de DPPH.

DATOS ESTANDAR DE TROLOX – DPPH		
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
0	0,117	0
25	0,117	0
150	0,105	10,25
300	0,091	21,79
450	0,064	45,29
600	0,047	59,82
800	0,031	73,50
CI ₅₀ Trolox	0,48 μmol/MI	

Fuente: La autora

Con los datos de la tabla 18 se realizó una gráfica de porcentaje de disminución vs. Concentración de Trolox. En la gráfica se extrapolo el punto 50 del eje “y”, obteniendo el valor de la concentración en el eje “x”. Así determinamos el valor de CI₅₀ del estándar de Trolox (ver figura 37).

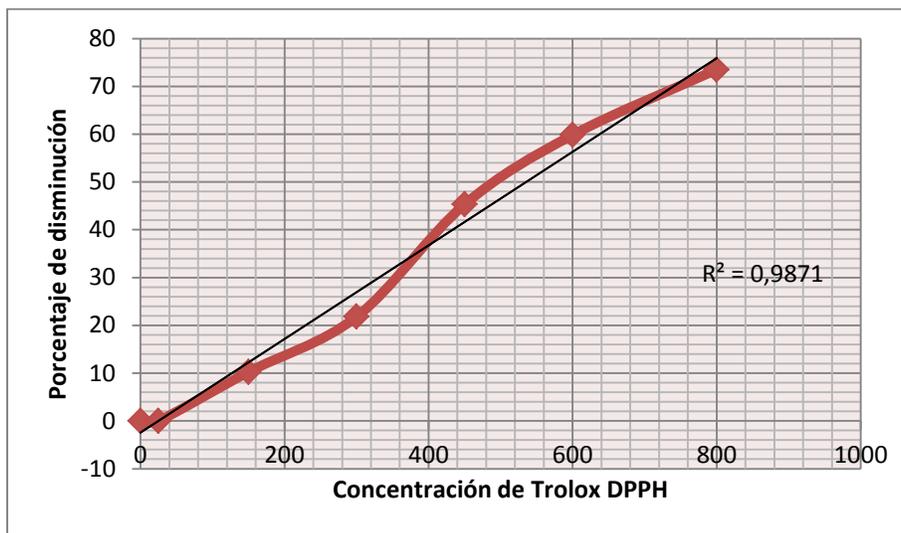


Figura 37. Curva de estándar de Trolox.

Fuente: La autora.

El valor obtenido de CI₅₀ para el estándar de Trolox por este método, es muy similar al valor obtenido de CI₅₀ para el método ABTS⁺. Tiene una variación leve, lo cual es correcto ya que se trata de la misma especie y del mismo estándar para los dos métodos.

3.5.2.3. Determinación de TEAC de DPPH.

El ensayo TEAC, es la misma fórmula aplicada en el método ABTS⁺. El valor de equivalente de Trolox es el valor referencial de la cantidad de Trolox que estaría presente por cada gramo de aceite esencial utilizado.

El valor de TEAC fue calculado a partir de los datos de CI_{50} de la muestra y del estándar de Trolox para DPPH:

En la tabla 19 se presenta el valor de TEAC obtenido por el método de radical DPPH para el aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

Tabla 19. TEAC (Capacidad antioxidante equivalente a Trolox) de DPPH:

TEAC – DPPH	
CI_{50} Muestra = $17,15 \times 10^{-6}$ g/mL	CI_{50} = 0,48 μ mol/mL
TEAC DPPH = $2,7 \times 10^4$ μ mol/g	

Fuente: La autora.

Trolox posee una actividad antioxidante excelente, por eso es utilizado como referencia en los dos ensayos utilizados. El TEAC determinado para el aceite esencial *Clinopodium taxifolium* fue de $2,7 \times 10^4$ μ mol de Trolox por cada gramo de aceite esencial.

El valor de TEAC para el método DPPH fue ligeramente menor que el valor obtenido para el ensayo ABTS⁺. Como ya se mencionó anteriormente, mientras el valor de TEAC sea más alto, la capacidad antioxidante del aceite esencial va a ser mucho más favorable.

3.6. Propiedades físicas.

3.6.1. Densidad relativa.

Para obtener el valor de la densidad relativa del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, se unieron las tres muestras de aceite y se realiza el procedimiento por triplicado.

En la tabla 20 se muestran los valores respectivos para cada ensayo perteneciente a cada repetición de densidad nrelativa.

De acuerdo a estudios de densidad relativa en aceites esenciales el rango de densidad varía entre 0,84 a 1,12 gr/cm³, dependiendo de la especie, el lugar de origen, el suelo y las condiciones climáticas que afecten el desarrollo de la planta (Costa, 2003).

Tabla 20. Densidad relativa del aceite esencial *Clinopodium taxifolium*.

Densidad relativa			
Repeticiones.	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
Densidad (gr/cm ³)	0,9258	0,9245	0,9266
\bar{X}	0,9256		
σ	0,0010		
C.V.	0,0011		

Fuente: La autora.

La composición química del aceite esencial influye mucho en la densidad relativa del mismo, ya que al estar compuesta principalmente por terpenos, sesquiterpenos o monoterpenos, forman cadenas o anillos, que tienen menor densidad que la sustancia que se utilizó como referencia, que en este caso fue el agua (Ortuño, 2006). El agua posee una densidad relativa de 1 gr/cm³.

3.6.2 Índice de refracción.

El índice de refracción es una propiedad física para controlar la pureza y calidad del aceite esencial tanto a nivel de laboratorio como industrial (Costa,2003).

En la tabla 21 se muestra el valor del índice de refracción para los aceites de cada recolección, también se muestra la media aritmética y el valor de la desviación estándar.

El índice de refracción medio es de 1,4905. Esta propiedad física es propia de cada especie y solo puede ser alterado si el aceite esencial se mezcla con otras sustancias o es disuelto en algún compuesto (Ortuño, 2006).

Tabla 21. Índice de refracción del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*.

ÍNDICE DE REFRACCIÓN			
RECOLECCIONES	CT1	CT2	CT3
Índice de refracción	1,4927	1,4863	1,4924
\bar{x}	1,4905		
O'	0,0036		
C.V.	0,0024		

Fuente: La autora.

CONCLUSIONES

- ✓ *Clinopodium taxifolium* posee un valor medio de humedad normal mientras que el valor del rendimiento del aceite esencial fue de 0,04%.
- ✓ En la composición química del aceite esencial se detectaron 48 compuestos que representan el 97,20% de la esencia, se identificaron 40 compuestos en la columna no polar (DB-5MS) y 36 compuestos en la columna polar (HP-INNOWAX).
- ✓ Se identificaron 7 compuestos mayoritarios principales: mentha (3,19%), Iso-pulegyl acetate (7,30%), α – Copaene (4,98%), Z-Caryophyllene (24,10%), Germacrene-D (12,82%), Bicyclogermacrene (8,80%) y δ -Cadinene (5,89%).
- ✓ El compuesto predominante fue Z-Caryophyllene con un porcentaje de 24,10% el cual fue identificado en las dos columnas DB5MS y HP-INNOWAX.
- ✓ El aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, no presenta actividad biológica frente a ningún tipo de bacteria estudiada en esta investigación.
- ✓ El aceite esencial tuvo una mejor actividad inhibitoria débil frente a *Trichophyton rubrum* (500ug/mL).
- ✓ *Clinopodium taxifolium*, mediante el método ABTS⁺ se determino una CI₅₀ de $7,3 \times 10^{-7}$ g/mL. Mientras que por el método del radical – DPPH[·] presenta una CI₅₀ de $17,15 \times 10^{-6}$ g/mL.
- ✓ El valor de TEAC para ABTS⁺ Y DPPH[·] fue de $6,3 \times 10^5$ μ mol/g y $2,7 \times 10^4$ μ mol/g respectivamente.
- ✓ El aceite esencial evaluado presenta actividad antioxidante frente al método ABTS⁺.
- ✓ El valor de la densidad relativa fue de 0,9317 g/cm³.

- ✓ El valor medio del índice de refracción fue de 1,4905. El cual se encuentra entre los valores establecidos para aceites esenciales.

RECOMENDACIONES

- ☞ Previamente a la elección de la especie de estudio, investigar si existen estudios de la especie, que cantidad de estudios hay, las condiciones en las que crece la planta y los usos comunes que le dan a dicha especie.
- ☞ Al momento de recolectar la materia vegetal, verificar la abundancia de la población silvestre en esa zona. Para evitar la extinción.
- ☞ Eliminar todo tipo de restos vegetales de otras plantas o contaminantes de la muestra de materia vegetal a destilar.
- ☞ Controlar la temperatura, presión de vapor y el tiempo de destilación. Para evitar pérdida de compuestos volátiles del aceite.
- ☞ Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.
- ☞ Evaluar la posibilidad de integrar el aceite esencial en una forma farmacéutica antifúngica.
- ☞ El aceite esencial de *Clinopodium taxifolium*, tiene potencial como antioxidante natural, determinar que compuestos del aceite esencial son los responsables de esta actividad.

BIBLIOGRAFIA.

Adams, R. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

Adams, R. P. (2009). Identification of Essential oil componensts by chromatography/MS Spectrometry. (vol. 4).

Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 (vol. 1). p. 5-16.

Arango, O., Pantoja, D., Santacruz, L., Hurtado, A. (2012). Actividad antioxidnte del aceite esencial de oréga no (*lippia organoides H.K.K*) del Alto Patia. Rev. Biotectonologia en elsector Agropecuario y Agroindustrial. (vol. 10) No. 2. p. 79-86.

Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., Gonzales, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Rev. SCielo. (vol. 54). p. 100-111.

Bacteria in photos. Escherichia coli. [en línea]. Disponible en: <http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20electron%20microscopy.html>. [2014, 26 de junio].

Bandoni, A. (2002). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores. Corporación Iberoamericana CYTED, (vol. 2).

Brooks, G., Butel, J., Morse, S. (2005). Microbiología Médica. México.

Cavalli, J., Tomi, F., Bernardini, A., y Casanova, J. (2003). Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. Flavour Fragr. J. (vol. 18). p. 532-538.

Chen, J., Ho, C. (1998). Volatile compounds generated in serine-monosaccharide model systems. J. Agric. Food Chem. (vol. 46). p. 1518-1522.

Choi, H. (2003). Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. (vol. 51). p. 2687-2692.

Choi, H. (2003). Characterization of Citrus unshiu (C. unshiu Marcov. forma Miyagawawase) blossom aroma by solid-phase microextraction in conjunction with an electronic nose. J. Agric. Food Chem. (vol. 51). p. 418-423.

Costa, B. (2003). Antioxidantes naturales en alimentación animal. Conferencia inaugural del curso académico 2003-2004. Real Academia de Ciencias Veterinarias. [en línea]. Disponible en: <http://www.racve.es/actividades/ciencias-basicas/2003-10-08PereCostaBatllori.htm> [2014, 14 de junio].

Fox, M., Whitesell, J. (2000). Química orgánica. México. ADDISON WESLEY LONGMAN, p. 158-165.

Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., Vidari, G., Vita, P. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. Ecuador. Revista Brasileira de Farmacognosia.

Global medical discovery. (2011, diciembre). Pseudomonas aeruginosa bacteria. [en línea]. Disponible en:

<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/the-effects-of-hyperosmosis-or-high-ph-on-a-dual-species-biofilm-of-enterococcus-faecalis-and-pseudomonas-aeruginosa-an-in-vitro-study/attachment/pseudomonas-aeruginosa-bacteria-sem/> . [2014, 26 de junio].

Gómez, E., Crespo, V., Samaniego, E., Del Boz, J., y Martínez, S., (2008). Tinea Cruris (glutealis) de importación por *Trichophyton rubrum* var. *Raubitschekii* en España. España.

Granados, C., Yáñez, X., Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Universidad de Pamplona, Colombia. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 1 (vol. 10), p. 12-23.

Guiteras, J., Rubio, R., Fonrodona, G. (2007). Curso Experimental en Química Analítica. España. Editorial Síntesis, S.A. p. 72-73.

Harris, D. (2007). Análisis químico cuantitativo. Tercera edición (Sexta edición original). Barcelona, España. Editorial Reverté. p. 578-600.

Jacob, E. (2012). Los Aceites esenciales, antibióticos, antifúngicos. [en línea]. Disponible en: <http://es.france-sante.org/foros-los+aceites+esenciales+antibioticos+antifungicos-B37.9-401-salud.php>. [2014, 22 de enero].

Jordan, M., Margaria, C., Shaw, P., y Goodner, K. (2002). Aroma active components in aqueous Kiwi fruit essence and Kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. J. Agric. Food Chem (vol. 50). p. 5386-5390.

Jorgensen, P., Ulloa, C., Maldonado, C. (2006). Riqueza de plantas vasculares. Bolivia – La Paz.

Julien, P., Muselli, A., Bernardini, A., Bighelli, A., Casanova, J. y Costa, J. (2007). Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. Rev. Flavour and Fragr. J. (vol. 22). p. 479-487.

Ka, M., Choi, E., Chun, H., y Lee, K. (2005). Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissima* roots, peppermint leaves, pine needles, and sweet flag leaves. J. Agric. Food Chem (vol. 53). p. 4124-4129.

Lizcano, A., Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Colombia.

Martínez, A. (2003). Aceites Esenciales. Medellín, Colombia.

Med ciencia. (2013, octubre). Descubriendo el punto débil de la bacteria “*Staphylococcus aureus*” multiresistente. [en línea]. Disponible en: <http://www.medciencia.com/descubierto-el-punto-debil-de-la-bacteria-staphylococcus-aureus-multirresistente/>. [2014, 26 de junio].

Mycology online. (2014, Julio). *Trichophyton rubrum* downy strain. [en línea]. Disponible en: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Dermatophytes/Trichophyton/downy.html. [2014, 26 de junio].

Neill, D. (2012). ¿Cuántas especies nativas de plantas vasculares hay en Ecuador? Ecuador.

Nickavar, B., Kamalinejad, M., Mohandesi, S., (2006). Comparison of the components of the essential oils from leaves and fruits of *Grammosciadium platycarpum*, Chem. Nat. Compd. (Engl. Transl.), (vol. 42). p. 6, 686-688, In original p. 559-560.

Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. España. Aiyana ediciones. p. 99.

Palá, J. (2004). Contribución al Conocimiento de los Aceites Esenciales del Género *Eryngium* L., en la Península Ibérica. (Tesis inédita Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Peña, D., Pérez, J. (2007). Metodologías utilizadas en la investigación de plantas antitumorales: descripción y comentarios. Perú. Revista científica.

Pino, J., Mesa, J., Muñoz, Y., Marti, M., y Marbot, R. (2005). Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. J. Agric. Food Chem. (vol. 53). p. 2213-2223.

Re, R., Pellegrini, N., Pannala, A., Yang, M., y Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. (vol. 26). p. 1231-1237.

Reyes, F. (2013, abril). Factores que intervienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. [en línea]. Disponible en: <http://fulreyes3.blogspot.com/>. [2014, 10 de junio].

Rodríguez, M., Alcaráz, L., Real, S. (2012). Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. La Paz, Baja California Sur, México. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. p. 38.

Roldan, L., Díaz, G., Durringer, J. (2010). Composición y actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de siete plantas de la familia Lamiaceae contra bacterias patógenas y benéficas. Medellín. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (vol. 23).

Rubiolo, P., Sgorbini, B., Liberto, E., Cordero, C., y Bichi, C. (2010). Essential oils and volátiles: simple preparation and analysis. A review. Flavour and Fragrance Journal (vol. 25). p. 282-290.

Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. (2004). Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia. Caldas.

Stashenko, E., Jaramillo, B., Martínez, J. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Colombia. Rev. Acad. Colomb.Cienc. 27(vol. 105) p. 579-597.

Tene, V., Malagón, O., Vita, D., Vidari, G., Armijos, C., y Zaragosa, T. (2006). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. Ecuador. ELSEVIER.

The Plant list. (2010). [base de datos]. *Clinopodium*. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Lamiaceae/Clinopodium/>. [2014, 22 de enero].

Tobar, J. (2007). Composición química, actividad antibacteriana y tóxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de Lamiaceae en el estado de Hidalgo. (Tesis inédita para obtener el título de licenciado en Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Torre, L., Alarcón, D., Kvist, L., Salazar, J. (2008). Uso medicinal de las plantas. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Ecuador.

Tropicos. (2014, Julio). [base de datos]. *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts. Disponible en: <http://192.104.39.83/Name/50199434?langid=66>. [2014, 23 de enero].

Tropicos. (2014, Julio). [base de datos]. *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts. Disponible en: <http://192.104.39.83/Name/50199434?tab=synonyms&langid=66>. [2014, 22 de enero].

Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur, L., Messa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamérica de Micología* 2 (vol. 27). p. 101-103.

Zaruma, M., Illescas, J. (2014). Determinación del efecto antibacteriano de aceites esenciales obtenidos de la familia *Myracaceae* y *Lamiaceae*. (Tesis inédita previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico). Universidad de Cuenca. Cuenca – Ecuador.

ANEXOS

ANEXO 1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.

PRINCIPIO:

Se evalúa la pérdida de peso de la muestra, debido a que es sometida a altas temperaturas en una estufa durante un tiempo determinado.

MATERIAL:

- Estufa
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 2 a 10 gramos de la muestra; seguidamente colocarla durante dos horas en una estufa a 105°C (+/- 5°C).
- Enfriar la cápsula en el desecador por 10 minutos aproximadamente, hasta que la temperatura de la cápsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- Colocar la cápsula nuevamente en la estufa durante una hora, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante. Dicho peso se toma como m_2 .

CÁLCULO:

$$Hm = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m)} * 100$$

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

m₁: peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

m₂: peso de la cápsula + muestra seca (gr).

ANEXO 2. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.

Fundamento.

Para calcular el porcentaje de rendimiento (%R) de los aceites esenciales evaluados se correlacionó el volumen de aceite esencial obtenido por cada destilación, con la cantidad de material vegetal, mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{Peso (gr.)}} * 100$$

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P: Peso de la materia vegetal empleada en la destilación.

3. ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA.

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PRINCIPIO:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C. Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

- **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d_{20}^{20} : Densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 4. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

PRINCIPIO:

Según el tipo de aparato que utilice, la medida directa del ángulo de refracción o la observación del límite de refracción total. El aceite se mantendrá dentro de las condiciones de iso-tropismo y de transparencia.

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

APARATOS:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002 .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

- ▶ 1.3330 para agua destilada.
- ▶ 1.4906 para el p-cimeno.
- ▶ 1.5685 para el benzoato de bencilo.
- ▶ 1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de ±0.2°C y debe mantenerse a ±0.2°C.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

RESULTADOS:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula.

$$n_D^{t'} = n_D^t + 0.0004 (t' - t)$$

Dónde:

n_D^t = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t , o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ±0.0002.