



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**“Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia* Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja”**

*Trabajo de fin de titulación*

**AUTOR:**

Rosales Sánchez, Jandry Ximena

**DIRECTOR:**

Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ing.

**LOJA-ECUADOR**

**2012**

## **CERTIFICACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, ROSALES SÁNCHEZ JANDRY XIMENA, declaro conocer y aceptar la disposición del Artículo 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”.

Loja, noviembre del 2012

f. ....  
Autor: Rosales Sánchez Jandry Ximena  
C.I.: 1900476373

## CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR

Ingeniero

Benito Eduardo Valarezo Valdez.

**DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN**

### **CERTIFICO:**

Que el presente trabajo, denominado: “**Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia* Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja**”, realizado por el profesional en formación: Rosales Sánchez Jandry Ximena; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, noviembre del 2012

f. ....  
CI: 1103906473

## **CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA**

Las opiniones, ideas, criterios puestos a manifiesto así como los resultados obtenidos, análisis, conclusiones y recomendaciones en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de la autora.

.....  
Jandry Ximena Rosales Sánchez

## **DEDICATORIA**

A mis padres..... ejemplo de vida para mí.

A mis hermanos..... por sus consejos.

A mi sobrina.....por ser parte de mi vida.

A mi familia.....porque siempre tienen una sonrisa para mí.

## **AGRADECIMIENTO**

*Quiero expresar mi agradecimiento a Dios por lo que soy, por haberme hecho parte de este mundo con oportunidades, momentos difíciles y lecciones de vida que me han hecho crecer como ser humano.*

*A mis queridos padres, Angel y Julia, por el apoyo incondicional y el amor tan grande que me han dado desde que nací llegando a ser mis mejores amigos, aceptándome con mis errores y aciertos, enseñándome a superar las dificultades.*

*Mi agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja que a través de la Escuela de Bioquímica y Farmacia y el Departamento de Química me brindaron una formación integral en la ciencia despertando en mí un espíritu de investigación con mira al servicio de la sociedad.*

*A mi director de Tesis, Ing. Eduardo Valarezo por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a sus conocimientos y experiencia en un ambiente de confianza. Deseo hacer parte de este agradecimiento especialmente a la Ing. Diana Guaya por su gran apoyo en la realización de esta tesis.*

*A mis compañeros de Laboratorio Ing. Anita, María Luisa, María del Carmen, Diana, Claudia, Anabel y Marco por los agradables momentos que compartimos.*

*Gracias querido Dios.....Jandry X. Rosales*

## INDICE DE CONTENIDO

<b>CERTIFICACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS</b> .....	iii
<b>CERTIFICACIÓN DE REVISIÓN DEL TUTOR</b> .....	iii
<b>CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA</b> .....	iv
<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>ARTÍCULO</b> .....	xiv
<b>I.FIN, PRÓPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO</b> .....	1
1.1. Fin del proyecto .....	2
1.2. Propósito del proyecto.....	2
1.3. Componentes del proyecto .....	2
1.4. Hipótesis .....	2
1.5. Toma de muestras.....	3
1.6. Tratamiento de datos.....	3
<b>II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1. Introducción .....	5
2.2. Antecedentes.....	10
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Obtención del aceite esencial .....	20
3.1.1. Recolección de la materia vegetal.....	21
3.1.2. Selección de la materia vegetal .....	23
3.1.3. Extracción del aceite esencial.....	23
3.1.4. Recolección del aceite esencial.....	24
3.1.5. Envasado y almacenamiento del aceite esencial.....	24
3.2. Determinación de las propiedades físicas .....	25
3.2.1. Densidad .....	25
3.2.2. Índice de refracción.....	25

3.3. Determinación de la composición química .....	26
3.3.1. Cromatografía de gases .....	26
3.3.2. Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama .....	26
3.3.2.1. Preparación de las muestras .....	27
3.3.2.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplado a espectrometría de masas .....	27
3.3.2.3. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplado a espectrometría de masas .....	28
3.3.2.4. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial .....	29
3.3.2.5. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplado al detector de ionización de llama (FID) .....	31
3.3.2.6. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplado al detector de ionización de llama (FID) .....	32
3.3.2.7. Cuantificación de los compuestos identificados por CG-FID.....	32
3.4. Evaluación de la actividad biológica .....	33
3.4.1. Cepas bacterianas y fúngicas .....	33
3.4.2. Actividad antibacteriana .....	33
3.4.2.1. Método de microdilución en caldo .....	33
3.4.2.1.1. Preparación de la muestra .....	33
3.4.2.1.2. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight” ...	33
3.4.2.1.3. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.....	34
3.4.2.1.4. Procedimiento .....	34
3.4.3. Actividad antifúngica .....	36
3.4.3.1. Método de microdilución en caldo .....	36
3.4.3.1.1. Preparación de la muestra .....	36
3.4.3.1.2. Preparación de la suspensión de los inóculos fúngicos .	36
3.4.3.1.3. Procedimiento .....	36



3.4.4. Lectura de las placas de C.M.I. e interpretación de los resultados .....	37
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
4.1. Humedad .....	40
4.2. Rendimiento.....	41
4.3. Propiedades físicas del aceite esencial de <i>Baccharis obtusifolia</i> .....	41
4.3.1. Densidad del aceite esencial .....	42
4.3.2. Índice de refracción del aceite esencial.....	42
4.4. Composición química del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	43
4.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo .....	43
4.4.2. Datos espectrales de los compuestos mayoritarios .....	54
4.5. Actividad biológica del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	59
4.5.1. Actividad antibacteriana .....	59
4.5.1.1. Concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) antibacteriana .....	59
4.5.2. Actividad antifúngica .....	60
4.5.2.1. Concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) antifúngica.....	60
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de crecimiento de las bacterias utilizadas.....	34
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de humedad de la materia vegetal.....	40
<b>Tabla 3.</b> Rendimiento en %(v/p) del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	41
<b>Tabla 4.</b> Densidad media del aceite esencial a 20°C.....	42
<b>Tabla 5.</b> Promedio de los índices de refracción de los aceites esenciales.....	43
<b>Tabla 6.</b> Composición química del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	46
<b>Tabla 7.</b> Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos determinados por CG-MS y CG-FID.....	49
<b>Tabla 8.</b> Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de los aceites esenciales de <i>B.</i> <i>obtusifolia</i> frente a 7 cepas bacterianas.....	59
<b>Tabla 9.</b> Concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de los aceites esenciales de <i>B.</i> <i>obtusifolia</i> frente a 2 cepas fúngicas.....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del estudio experimental.....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema de la metodología utilizada en la investigación.....	19
<b>Figura 3.</b> Esquema de la obtención del aceite esencial.....	20
<b>Figura 4.</b> Ubicación del área de recolección de la especie <i>B. obtusifolia</i> .....	21
<b>Figura 5.</b> Envasado y etiquetado.....	24
<b>Figura 6.</b> Condiciones operacionales para CG-MS en la columna DB-5MS.....	28
<b>Figura 7.</b> Condiciones operacionales para CG-MS en la columna HP-INNOWAX.....	29
<b>Figura 8.</b> Condiciones operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS .....	31
<b>Figura 9.</b> Condiciones operacionales para CG-FID en la columna HP-INNOWAX .....	32
<b>Figura 10.</b> Modelo de la microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....	35
<b>Figura 11.</b> Modelo de la microplaca TC96 para hongos con las concentraciones del aceite ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....	37
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> obtenidos en las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX .....	44
<b>Figura 13.</b> Grupos químicos del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	51
<b>Figura 14.</b> Compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>B. obtusifolia</i> .....	52
<b>Figura 15.</b> Espectro de masas del limonene .....	55
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas del germacrene-D .....	55
<b>Figura 17.</b> Espectro de masas del $\alpha$ -pinene .....	56
<b>Figura 18.</b> Espectro de masas del $\beta$ -pinene .....	56
<b>Figura 19.</b> Espectro de masas del Bicyclogermacrene.....	57
<b>Figura 20.</b> Espectro de masas del $\delta$ -cadinene.....	57
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas del $\beta$ -caryophyllene.....	58
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas del t-cadinol.....	58

## INDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b> <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica, agente causal de diarrea, en frotis de cultivo puro con tinción de Gram. Se observan bacilos Gram negativos.....	14
<b>Fotografía 2.</b> Cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> ..	14
<b>Fotografía 3.</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
<b>Fotografía 4.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	15
<b>Fotografía 5.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> .....	16
<b>Fotografía 6.</b> <i>Salmonella typhimurium</i> .....	16
<b>Fotografía 7.</b> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	17
<b>Fotografía 8.</b> <i>Trichophyton rubrum</i> .....	17
<b>Fotografía 9.</b> <i>B. obtusifolia</i> en su hábitat (fotografía tomada en un tramo de la cordillera “Loma del Oro”).....	22
<b>Fotografía 10.</b> Muestra botánica de <i>B. obtusifolia</i> depositada en el Herbario de la Universidad Técnica de Loja .....	22
<b>Fotografía 11.</b> Destilador .....	23
<b>Fotografía 12.</b> Refractómetro ABBE. ....	25
<b>Fotografía 13.</b> Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N. ....	26

## RESUMEN

El género *Baccharis* está constituido por especies utilizadas en la medicina tradicional de los pueblos latinoamericanos, de las cuales algunas especies no registran estudios sobre su aceite. *Baccharis obtusifolia* es un arbusto nativo distribuido especialmente en la región andina ecuatoriana del cual se obtuvo el aceite esencial de sus partes aéreas por hidrodestilación y se determinó su composición química por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas CG/MS y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo.

El aceite esencial se caracterizó por sus propiedades físicas como densidad e índice de refracción para las cuales se registró respectivamente valores de 0,8742 y 1,4850. Se identificaron 43 compuestos que representan el 94,43% del aceite. Los componentes mayoritarios fueron  $\alpha$ -pinene (9,02%),  $\beta$ -pinene (8,22%), limonene (28,27%),  $\beta$ -caryophyllene (3,97%), germacrene-D (9,75%), bicyclogermacrene (6,19%),  $\delta$ -cadinene (5,73%), t-cadinol (3,34%). El principal grupo químico lo constituyen los monoterpenos hidrocarbonados (50,89%).

El aceite esencial de *B. obtusifolia* mostro buena actividad frente a *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188 especialmente ante *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 (CMI 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), además se evidenció una moderada actividad frente a *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997 y no inhibió el crecimiento de *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* LT2, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.



## Chemical composition, physical properties and biological activity of the essential oil of *Baccharis obtusifolia* Kunth from Loja, Ecuador

Jandry Rosales<sup>1\*</sup>, Vladimir Morocho<sup>2</sup>, Omar Malagón<sup>2</sup>, Silvia Gonzalez<sup>2</sup>, Eduardo Valarezo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Escuela de Bioquímica y Farmacia-Universidad Técnica Particular de Loja  
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja – Ecuador.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja  
San Cayetano Alto s/n, PO BOX 11 01 608, Loja – Ecuador.

Corresponding author: \*jxrosales@utpl.edu.ec.

### ABSTRACT

The essential oil of aerial parts of *Baccharis obtusifolia* (Asteraceae) growing wild in Ecuador was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS and GC/FID. Biological activity was evaluated with broth micro dilution method. The density of the essential oil was 0,8742 and its refraction index was 1,4850. Forty-three compounds, representing 94,43% of the oil, were identified. The majority components were  $\alpha$ -pinene (9,02%),  $\beta$ -pinene (8,22%), limonene (28,27%),  $\beta$ -caryophyllene (3,97%), germacrene-D (9,75%), bicyclogermacrene (6,19%),  $\delta$ -cadinene (5,73%), t-cadinol (3,34%). The main chemical group of essential oil was hydrocarbonated monoterpenes (50,89%). The essential oil from *B. obtusifolia* exhibited good activity against *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, especially against *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 (MIC 62,5  $\mu$ g/mL), moderate activity against *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997 and did not inhibited the growth of *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Salmonella typhimurium* LT2, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

**Key Words:** *Baccharis obtusifolia*, GC/MS, GC/FID, limonene, germacrene-D.

### Introduction

The genus *Baccharis* is mainly american and has about 400 species. [1] It extends from the south of the United States to the southernmost of Argentina and Chile. [2] Several species of *Baccharis* are widely used in traditional medicine in the treatment and prevention of anemia, inflammation, diabetes, liver, stomach, prostate.[3] The medicinal use of this genus is linked to the presence and biological activity of flavonoids and other phenol compounds, coumarins and/or essential oils which they normally have.[2] Pharmacologic studies made over part of the chemical components, or on the exudates, have mainly demonstrated anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity.[2]

The utilization of plants of the genus *Baccharis* has demonstrated great advances due to its use in the traditional medicine of Latin America. [3] *B. obtusifolia* commonly known as “Chilca redonda” is traditionally used for the

cold, rheumatism and as an antifungal.[4] Despite the recognized therapeutic potential of vegetal species in our country, the production of phytopharmaceuticals is limited due to the scarce scientific information and poor agro-pharmaceutical infrastructure.[5] Due to a limited number of studies about the composition of essential oils of *Baccharis* species, [6] la Universidad Técnica Particular de Loja through the Departamento de Química and its project called “Estudio de la flora aromática de la region Sur del Ecuador” are developing projects related to the chemical composition, physical properties and biological activity of the essential oils, generating valuable information for future publications.

In the following study the chemical composition of essential oil *B. obtusifolia* is analyzed and its biological activity is evaluated with the purpose of giving information about its oil because there are no studies about the essence of these native species.



## Materials and methods

### Plant material

*B. obtusifolia* aerial parts were collected every 30 days from March to May 2011, on a stretch of the Cordillera "Loma del Oro" located 6 Km south from Saraguro with coordinates UTM 691583(E), 9592617(N) at 3003 m.s.n.m. altitude. The botanical identification was carried out by Ing. Bolívar Merino, curator of the Herbarium of National University of Loja, a botanical sample was deposited in the Herbarium of Departamento de Química of the Universidad Técnica Particular de Loja under the code PPN-as-014.

### Essential oil isolation

The essential oil from aerial parts of vegetal material in fresh state was obtained by hydrodistillation during 4 hours using Clevenger apparatus. The essential oils collected were dried over anhydrous sodium sulphate and stored in sealed vials protected from the light at 4 °C until further analyses.

### Physical properties

The density and refraction index of the essences were determined according to AFNOR NFT 75-111 and AFNOR NFT 75-112 standards respectively.

### Gas Chromatography

The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and flame ionization detector (GC-FID).

### GC-MS y GC-FID Analysis

The analysis of volatile compounds by GC-MS was made in a gas chromatograph of the series Agilent 6890N coupled to a mass spectrometry Agilent series 5973 inert. The compounds were separated in the capillary columns DB-5MS (5% - Phenylmethylpolysiloxane) and HP-INNOWAX (Polyethylenglycol) with a dimension of 30 m\*0.25 mm\*0.25 µm. with a constant oven temperature of 50 °C during 3 minutes, raising 2,5 °C/min until 220 °C. The injector and detector temperatures

were of 250 °C; the gas carrier was helium with flow of 0,9 mL/min; the injection volume of 1 µL; Split-radio 50:1.

The GC-FID analysis developed in the gas chromatograph series Agilent 6890N equipped with a flame ionization detector (FID); the capillary columns used are described in the previous analysis. The temperature program was as follows: initial temperature 50 °C during 3 minutes, 2,5 °C/min until 210 °C; the injector and detector temperatures were in 250 °C; the gas carrier was nitrogen (0,9 mL/min); injection volume 1 µL; Split-radio 50:1.

Prior to the chromatographic runs in each column and detector, a mixture of hydrocarbons were injected (C<sub>10</sub> a C<sub>25</sub>, TPH-6RPM of CHEM SERVICE) using the previously described operational parameters.

### Identification of the components

The compounds of the samples were identified by comparison of Kovats indexes of the analyzed compounds against the reported in the literature. [7][8] The experimental retention indexes were determined in relation to the homologous series of alkanes. Comparison of mass spectra in each detected compound with the given spectra by bookstore Wiley 7n.1 of the equipment software, constituted the additional criteria for the correct identification of the components.

### Quantification of the compounds by GC-FID

The relative amount to the volatile compounds expressed as a percentage was obtained from the area in each detected peak with FID, as well as its retention time which adjusted to the one of the detected compounds in masses through the equation which results of the graph in which the retention times of the hydrocarbons using FID and in MASS are related.

### Antimicrobial activity

Antimicrobial and antifungal activity of the essential oils (EOs) of *B. obtusifolia* against two strains Gram-positive: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923); five strains



Gram-negative: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) and two fungal strains: *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185) and *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188) were evaluated by the broth micro-dilution method determining the MIC (minimum inhibitory concentration) for each microorganism.

1mg/mL Gentamicin and 8mg/mL ampicilin were used as controls in the antibacterial assay. The control test was 1mg/mL Itraconazole antifungal.

## Results and discussion

The EOs average yield in the samples was 0,24%. The oil density was 0,8742 and its refraction index was 1,4850. The chemical compounds are organized in order of elution in the column DB-5MS, those are observed in the table 1, with their corresponding Kovats indexes and their relative quantity percentage. 43 compounds were detected from which 28 were identified in both columns, with an identification percentage of 94,43% in the column DB-5MS and 94,00% in the column HP-INNOWAX.

The essential oil analyzed is mainly constituted of terpenes, most of them are hydrocarbon monoterpenes (50,89%), followed by hydrocarbon sesquiterpenes (35,18%), oxygenated monoterpenes (0,64%), oxygenated sesquiterpenes (10,55%) and other type of compounds (1,30%). Hydrocarbon monoterpenes represent the main chemical group of the oil; this group meets some major compounds as the limonene, which is the compound with highest concentration of the samples.

The main compounds are:  $\alpha$ -pinene (9,02%),  $\beta$ -pinene (8,22%), limonene (28,27%),  $\beta$ -caryophyllene (3,97%), germacrene-D (9,75%), bicyclogermacrene (6,19%),  $\delta$ -cadinene (5,73%),  $\tau$ -cadinol (3,34%).

Previous studies about the chemical composition of the essential oil of the species

*obtusifolia* are not available in the scientific literature; numerous investigations have as study object the chemical composition of the essential oil of various species of the genus.

The large proportion of limonene in the oil analyzed has also been reported for the *B. spartioides* [9] and *B. darwinii*, [10] species. Which respectively present (28,7-56,7%) and 47,1% of limonene in their essential oil. This hydrocarbon monoterpene considered as one of the major components in the *B. spartioides* oil belongs to one of the representative chemical groups of the obtained oil in this specie.

The high concentrations of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene and bicyclogermacrene detected in the analyzed samples are characteristic of the major compounds identified in the essential oil extracted of the aerial parts of *B. uncinella* [11] and male and female specimens of *B. tandilensis* ( $\beta$ -pineno 33,1% in M and 30,0% in F,  $\alpha$ -pineno 7,4% M and 4,5% in F, limoneno 3,7% in M and 12,3% in F,  $\beta$ -cariofileno 1,7% in M and 0,8% in F, spathulenol 7,0% in M and 8,4% in F, bicyclogermacrene 4,0% in M and 3,2% in F and viridiflorol 15,8% in M and 17,0% in F), [12] some compounds like the spathulenol and viridiflorol are present in minor amounts in the oil of *B. obtusifolia*.

Through chemical analysis of essential oil of dioecia *B. articulata* species from the Córdoba-Argentina province their main components were identified in female plants ( $\beta$ -pineno 14,7%, spathulenol 27,3% and (E)-nerolidol 10,1%) and male plants (spathulenol 30,3%,  $\beta$ -caryophyllene 9,5%, bicyclogermacrene 8,9% and (E)-nerolidol (8,1%) [13] the hydrocarbons mono and sesquiterpenes  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -caryophyllene and bicyclogermacrene were detected in different proportions in the analyzed oil.

The essential oil of *B. obtusifolia* is rich in hydrocarbon monoterpenos mainly represented by limonene which along with the  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -caryophyllene and spathulenol constitute the major compounds of the obtained essential oil of the aerial parts of *B. notoserghila*, [14] unlike the analyzed substance, the spathulenol is not a major compound.





Table 1. Chemical composition of the essential oil of *B. obtusifolia*.

Compound	DB-5MS									HP-INNOWAX						
	IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	% relative amount						% relative amount							
			Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.	IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.
α-thujene	866	905 <sup>a</sup>	0,54	0,68	0,43	0,55	0,13	0,23	1023	1030 <sup>y</sup>	0,59	0,72	0,40	0,57	0,16	0,28
α-pinene	873	907 <sup>b</sup>	9,49	10,61	6,97	9,02	1,86	0,21	1019	1027 <sup>w</sup>	9,66	10,81	7,44	9,30	1,71	0,18
Sabinene	924	953 <sup>c</sup>	1,04	1,14	0,99	1,06	0,08	0,07	1118	1134 <sup>g</sup>	1,06	1,17	1,04	1,09	0,07	0,06
β-pinene	936	949 <sup>d</sup>	8,05	9,26	7,36	8,22	0,96	0,12	1105	1113 <sup>w</sup>	8,58	9,96	8,22	8,92	0,92	0,10
Myrcene	973	969 <sup>e</sup>	2,15	2,46	2,01	2,21	0,23	0,10	1162	1168 <sup>g</sup>	2,46	2,79	2,28	2,51	0,26	0,10
Limonene	1029	1029 <sup>i</sup>	26,83	29,29	28,68	28,27	1,28	0,05	1198	1203 <sup>x</sup>	27,28	30,45	30,84	29,52	1,95	0,07
(E)-β-ocimene	1045	1043 <sup>g</sup>	1,25	1,39	1,15	1,26	0,12	0,10	1250	1250 <sup>y</sup>	1,30	1,50	1,11	1,30	0,20	0,15
γ-terpinene	1054	1059 <sup>i</sup>	.....	0,30	.....	.....	.....	.....	1240	1255 <sup>y</sup>	.....	0,29	.....	.....	.....	.....
Linalool	1100	1096 <sup>f</sup>	0,29	.....	.....	.....	.....	.....	1554	1554 <sup>g</sup>	0,31	0,33	.....	0,32	0,01	0,04
Terpinen-4-ol	1175	1177 <sup>f</sup>	0,31	0,38	.....	0,35	0,05	0,14	1599	1593 <sup>w</sup>	0,36	0,40	.....	0,38	0,03	0,07
α-cubebene	1366	1363 <sup>h</sup>	0,66	0,60	0,61	0,62	0,03	0,05	1478	1480 <sup>z</sup>	0,57	0,49	0,54	0,53	0,04	0,08
β-cubebene	1379	1381 <sup>i</sup>	0,43	.....	0,57	0,50	0,10	0,20	1527	1519 <sup>ab</sup>	0,33	.....	0,41	0,37	0,06	0,15
β-elemene	1382	1382 <sup>j</sup>	0,46	.....	0,41	0,44	0,04	0,08	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
β-caryophyllene	1408	1408 <sup>k</sup>	5,02	3,35	3,53	3,97	0,92	0,23	1581	1608 <sup>g</sup>	5,33	3,56	3,80	4,23	0,96	0,23
Alloaromadendrene	1426	1427 <sup>i</sup>	0,73	0,54	0,50	0,59	0,12	0,21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
α-humulene	1443	1443 <sup>i</sup>	1,20	0,92	1,01	1,04	0,14	0,14	1652	1680 <sup>g</sup>	0,98	0,71	0,94	0,88	0,15	0,17
Epizonarene	1463	1494 <sup>i</sup>	0,52	0,48	.....	0,50	0,03	0,06	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
γ-murolene	1467	1467 <sup>ii</sup>	1,45	1,21	1,14	1,27	0,16	0,13	1675	1684 <sup>g</sup>	1,85	1,46	1,42	1,58	0,24	0,15
Germacrene-D	1472	1472 <sup>j</sup>	10,95	8,05	10,26	9,75	1,51	0,16	1694	1722 <sup>g</sup>	10,19	7,53	9,64	9,12	1,40	0,15
Aromadendrene	1480	1447 <sup>m</sup>	1,41	1,08	1,02	1,17	0,21	0,18	1589	1628 <sup>x</sup>	0,51	0,37	.....	0,44	0,10	0,22
Bicyclogermacrene	1485	1488 <sup>n</sup>	6,75	5,16	6,67	6,19	0,90	0,14	1718	1755 <sup>x</sup>	5,83	4,46	5,48	5,26	0,71	0,14
α-murolene	1490	1490 <sup>n</sup>	1,54	1,56	1,75	1,62	0,12	0,07	1712	1727 <sup>ac</sup>	1,52	1,47	1,56	1,52	0,05	0,03
γ-cadinene	1502	1502 <sup>o</sup>	1,13	1,52	1,51	1,39	0,22	0,16	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
δ-cadinene	1510	1510 <sup>o</sup>	5,58	6,19	5,42	5,73	0,41	0,07	1745	1770 <sup>ad</sup>	7,01	7,20	6,69	6,97	0,26	0,04
Elemol	1540	1549 <sup>j</sup>	.....	0,54	0,46	0,50	0,06	0,11	2076	2078 <sup>ac</sup>	.....	0,51	0,41	0,46	0,07	0,15
Nerolidol	1558	1550 <sup>p</sup>	0,79	0,69	0,81	0,76	0,06	0,08	2044	2054 <sup>g</sup>	0,99	0,93	0,99	0,97	0,03	0,04
Spathulenol	1565	1565 <sup>a</sup>	.....	.....	1,74	.....	.....	.....	2114	2129 <sup>g</sup>	.....	.....	1,16	.....	.....	.....
Viridiflorol	1581	1581 <sup>q</sup>	0,64	0,47	0,47	0,53	0,10	0,19	2071	2102 <sup>g</sup>	0,69	0,45	0,53	0,56	0,12	0,22
γ-eudesmol	1620	1618 <sup>f</sup>	.....	0,82	0,82	0,82	0,00	0,00	2159	2182 <sup>ac</sup>	.....	0,57	.....	.....	.....	.....
α-cadinol	1632	1630 <sup>s</sup>	1,34	1,46	1,57	1,46	0,12	0,08	2161	2211 <sup>g</sup>	1,05	1,21	1,43	1,23	0,19	0,16
α-eudesmol	1643	1645 <sup>t</sup>	.....	.....	1,40	.....	.....	.....	2207	2237 <sup>ac</sup>	.....	0,71	0,62	0,67	0,06	0,10
τ-cadinol	1645	1642 <sup>j</sup>	2,82	4,04	3,16	3,34	0,63	0,19	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Phenethylbenzoate	1841	1841 <sup>u</sup>	0,78	0,52	0,77	0,69	0,15	0,21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Tricosane	2300	2300 <sup>f</sup>	0,58	0,41	0,85	0,61	0,22	0,36	2299	2300 <sup>ab</sup>	0,65	0,44	0,96	0,68	0,26	0,38
β-phellandrene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1204	1241 <sup>w</sup>	0,19	.....	.....	.....	.....	.....
Viridiflorene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1680	1697 <sup>ac</sup>	1,01	0,71	0,57	0,77	0,23	0,29
α-amorphene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1701	1691 <sup>ac</sup>	0,22	.....	.....	.....	.....	.....
Geranylacetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1758	1760 <sup>at</sup>	.....	0,64	.....	.....	.....	.....
Geranylbutyrate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1897	1872 <sup>ac</sup>	0,74	0,54	0,98	0,75	0,22	0,30



Compound	IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	DB-5MS % relative amount						HP-INNOWAX % relative amount										
			Bo1	Bo2	Bo3	X	$\sigma$	C.V.	IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	Bo1	Bo2	Bo3	X	$\sigma$	C.V.			
Heneicosane	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2099	2100 <sup>ae</sup>	.....	.....	0,31	.....	.....	.....			
$\beta$ -eudesmol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2215	2220 <sup>v</sup>	.....	0,78	0,85	0,82	0,05	0,06			
$\tau$ -muurolol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2221	2178 <sup>ag</sup>	2,07	2,25	2,51	2,28	0,22	0,10			
Farnesylacetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2261	2283 <sup>g</sup>	0,33	.....	.....	.....	.....	.....			
Total									94,43			Total						94,00	
<b>Grouped components:</b>									<b>Grouped components:</b>										
Monoterpene hydrocarbons (%): 50,89									Monoterpene hydrocarbons(%): 53,60										
Oxygenated monoterpene(%): 0,64									Oxygenated monoterpene(%): 2,09										
Sesquiterpene hydrocarbons(%): 35,18									Sesquiterpene hydrocarbons(%): 31,89										
Oxygenated sesquiterpene(%): 10,55									Oxygenated sesquiterpene(%): 9,05										
Others(%): 1,30									Others(%): 0,99										

Compounds listed in order of elution on DB-5MS.

IK<sup>cal</sup>: Kovats index determined experimentally. IK<sup>ref</sup>: Kovats index reported in the literature (See reference: a ref. 15; b ref. 16; c ref. 17; d ref.18; e ref. 19; f ref. 7; g ref. 20; h ref. 21; i ref 22; j ref 23; k ref 24; l ref 25; ll ref 26; m ref 27; n ref 28; ñ ref 29; o ref 30; p ref 31; q ref 32; r ref 33; s ref 34; t ref 35; u ref 36; v ref 37; w ref 38; x ref 39; y ref 40; z ref 41; ab ref 42; ac ref 43; ad ref 44; ae ref 45; af ref 46; ag ref 47).

Bo1: Oils of the first collection; Bo2: Oils of the second collection; Bo3: Oils of the third collection.

..... : not detected



Usually this sesquiterpene is identified among the main compounds of the oil of various species of the genus *Baccharis*, proof of this are the high concentrations of spathulenol (42,65% F and 50,75% M) in the essential oil extracted from the leaves of male and female specimens of *B. semiserrata*[48] collected in the state of Paraná, Brasil. With its main component were found the sesquiterpenes aromadendrene (9.61% F and 2.33% M),  $\alpha$ -muurolene (8.88% F and 2.38% M) and  $\delta$ -cadinene (9.52% F and 3.93% M); on the contrary to the study of the *B. obtusifolia* oil was determined a low content of monoterpenes.

In the species *B. dracunculifolia*, *B. latifolia*, *B. salicifolia*, *B. crispa* and *B. uncinella*; the sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene, bicyclogermacrene and germacrene-D [49] have been commonly identified. The essential oil samples analyzed show the same major compounds, which are also part of the group of hydrocarbon sesquiterpenes that represent the 35,18% of the oil.

The published works about chemical composition of the essential oil of various species of the genus differ quantitative and qualitatively in relation to the essential oil analyzed, however they are consistent with the presence of some compounds like the limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, bicyclogermacrene, spathulenol, viridiflorol,  $\beta$ -caryophyllene, aromadendrene,  $\alpha$ -muurolene,  $\delta$ -cadinene and germacrene-D present in different relative amounts and considered as the characteristic constituents of the previously mentioned oils. The differences in the composition and relative abundance of compounds present in the different species may be explained considering the changes in ecological conditions (weather, soil type, season, geographical location) in which the plant develops, as well as the extraction conditions (extraction method, time, conditions of the raw material), can produce changes in oil quality and quantity.[50]

Antibacterial and antifungal activity of essential oils evaluated against microorganisms responsible of several diseases, were reported as the MIC known as the minimum amount of

antimicrobial agent that is necessary to inhibit the growth of an organism.[51]

In table 2 is showed the MIC of the oils from first, second and third recollections against the pathogens most affected.

**Table 2.** Antibacterial MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of essential oils.

Oils <i>B. obtusifolia</i>	Bacterias	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>
Bo111	1000	1000
Bo112	1000	1000
Bo113	1000	1000
Bo121	1000	1000
Bo122	1000	1000
Bo123	1000	1000
Bo131	1000	NA
Bo132	500	NA
Bo133	500	NA
Control	Gentamicin 1mg/mL	Ampicilin 8mg/mL

NA: Not active at the highest dose tested (>1000).

Bacterial growth of *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. tiphymurium* y *S. aureus* was not inhibited by the oils; however, for *K. pneumoniae* and *E. faecalis*, the oils of the first and second recollections present a MIC of 1000  $\mu\text{g/mL}$ , the samples of the third recollection does not present activity against *E. faecalis* but show a MIC of 1000 and 500 $\mu\text{g/mL}$  for *K. pneumoniae*. According to MIC values exposed, the analyzed oils did not show a significant inhibition against *K. pneumoniae* and *E. faecalis*.

In several investigations susceptibility of bacteria to the essential oil evaluated of species of the genus *Baccharis* have been showed, nevertheless data published on the biological activity of essential oil of the specie *obtusifolia* do not have been registered in spite of the medicinal properties and therapeutically use of the plant.

It is complex to compare the results obtained with the ones published in other studies, the divergence of MIC of essential oils values among the different studies may be explained by the diversity of techniques used, the variation in the chemical composition of the oils according to the genus and species of the plants or their geographic precedence.[52] an example of this is the interesting antibacterial activity that natural products exhibit like the essential oil obtained from aerial parts of *B.*



*grisebachii* from the province of San Juan-Argentina with relation to the ones observed in the analyzed samples:[53] in the same way the susceptibility of *E. faecalis* against the essential oil extracted from the aerial parts of *B. latifolia* and *B. prunifolia* from Mérida-Venezuela.[54]

MIC of essential oils against dermatophytes *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* are exposed in table 3.

**Table 3.** Antifungal MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of essential oils.

Oils <i>B. obtusifolia</i>	Fungi	
	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Bo111	500	250
Bo112	250	500
Bo113	250	500
Bo121	500	62,5
Bo122	500	62,5
Bo123	500	62,5
Bo131	250	250
Bo132	250	500
Bo133	250	500
Control	Itraconazole 1mg/mL	

All the essential oils inhibited the fungal growth in different concentrations. Although currently there is not standard criteria to define antifungal activity of natural products, Hoeltz suggests to classify antifungal activity of natural products based on the value of MIC in the following way: MIC lower or equal to 100  $\mu\text{g/mL}$ : good, MIC between 100 and 500  $\mu\text{g/mL}$ : moderate, and MIC between 500 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ : weak. [52]

According to the classification mentioned, essential oils against *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* present a moderate activity except oils of the second collection (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) which show good activity against *T. mentagrophytes*. It is interesting to note the antifungal in vitro activity of the oils specially the ones of second collection considering that the vegetal specie is used for antifungal purposes by the Saraguro ethnic group. [4] Antifungal activity against microorganisms responsible of mycoses in humans has been reported for several species of the genus, however publications about the activity of the *B. obtusifolia* oil have not been found.

Antifungal activity of species such as *B. trinervis* have been demonstrated, also *B. grisebachii* oil antibacterial and antifungal have been reported but it is interesting the value of C.M.I. 62.5 $\mu\text{g/mL}$ [53] presented for the fungal strains also evaluated in this study. Several reports show that changes in the chemical composition of essential oils directly affect their biological activities.[55] It is hard to correlate the antimicrobial activity of essential oils with a specific compound due to complexity and variability of the oils.[54] Some authors suggest that compounds present in high concentrations are not necessarily responsible of great part of the biological activity; the minor components can also cover oil activity by synergistic effects with other active components.[56]

## Conclusions

Forty-three compounds were identified from which 28 were common in both columns.

The major constituent is the limonene (28,27%). The oil did not show good activity with the bacterium evaluated but it showed action mainly against the fungus, among which *T. mentagrophytes* was the most affected.

*Acknowledgments-* My special gratitude to Ing. Eduardo Valarezo, Diana Guaya, Vladimir Morocho and staff of the UTPL Departamento de Química, for providing me the facilities for the development of this project.

## REFERENCES

- Ulloa, C.; Jørgensen, Peter. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Base de datos: eFloras.org. Disponible en: [www.eFloras.org](http://www.eFloras.org)
- Molares, S.; González, S.; Ladio, A.; Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Botánica Brasilica. Volumen 23. N° 2, págs. 578-589.
- Gonzaga, L.; Costa, I.; Pizzolatti, G. (2005). Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Económicos e Biológicos. Revista Química Nova. Volumen 28. N° 1, págs. 85-94.
- Tene, V.; Malagón, O.; Vita Finzi, P.; Vidari, G.; Armijos, Ch.; Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology. Volumen 111. N°1, págs. 63-81.
- Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales. (1999). Taller convocado por TRAFFIC internacional, facilitado y moderado por Dra. Ruth Hidalgo del centro ecuatoriano



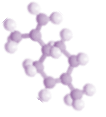
- de derecho ambiental-CEDA. Financiado por el Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo de Alemania.
- Carrizo, R; Ponzi, M; Ardanaz, C; Tonn, C.; Donadel, O. (2009). Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz&Pavon) Pers. and antibacterial activity. Journal of the Chilean Chemical Society. Volumen 54. N°4, págs.475-476.
  - Adams, R. (2009). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th edition. Allured Business Media.
  - NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director. "Retention Indices" en NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>
  - Van Baren, C., Di Leo Lira, P., Bandoni, A. (2002). Composition of essential oil of Pichana [*Baccharis spartioides* (Hook.et Arn.)Remy (Compositae)] from different populations of the Patagonia, Argentina. Journal of Essential Oil Research. Volumen 14, págs. 183-186.
  - Kurdelas, R., López, S., Lima, B., Egly Feresin, G., Zygadlo, J., Zacchino, S., López, M., Tapia, A., Freile, M. (2012). Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. Industrial Crops and Products. Volumen 40, págs. 261-267.
  - Frizzo, C., Serafini, L., Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P. (2001). Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. Journal Flavour and Fragrance. Volumen 16. N°4, págs. 286-288.
  - Prado, H., Van Baren, C., Di Leo Lira, P., Bandoni, A., Orfila, E. (2003). El aceite esencial de *Baccharis tandilensis* Speg.-Asteraceae. Revista Domingueza. Volumen 19. N° 1, págs. 20-24.
  - Zunino, M., López, M., Zygadlo, J. (2004). Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.)Pers. Journal of Essential Oil Research. Volumen 16, págs. 29-30.
  - Cobos, M., Rodríguez, J., Oliva, M., Demo, M., Faillaci, S., Zygadlo, J. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserigila*. Planta Medica. Volumen 67. N° 1, págs. 84-86.
  - De Feo, V.; Porta, G.; Urrunaga, E.; Urrunaga, R.; Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 13, págs.145-147.
  - Heravi, M.; Sereshti, H. (2007). Determination of Essential Oil Components of *Artemisia haussknechtii* Boiss using simultaneous Hydrodistillation-Static Headspace Liquid Phase Microextraction - Gas Chromatography Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. Págs. 81-89.
  - Storer, J.; Elmore, J.; van Emden, H. (1993). Airborne volatiles from the foliage of three cultivars of autumn flowering chrysanthemums. Phytochemistry. Volumen 34. N° 6, págs.1489-1492.
  - Tzakou, O.; Bazos, I.; Yannitsaros, A. (2007). Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 22, págs.358-362.
  - Marongiu, B.; Porcedda, S.; Piras, A.; Sanna, G.; Murreddu, M.; Loddo, R. (2006). Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. nana Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.148-154.
  - Choi, H. (2003). Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 51, págs.2687-2692.
  - Sagrero, L.; Bartley, J.; Espinosa, G.; Dominguez, X.; Verde, J. (1997). Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 12, págs.401-403.
  - Moon, S.; Cliff, M.; Li-Chan, E. (2006). Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and -olfactometry. Food Research International. Volumen 39, págs.294-308.
  - Pavlovic, M.; Tzakou, O.; Petrakis, P.; Couladis, M. (2006). The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.84-87.
  - Apel, M.; Sobral, M.; Zuanazzi, J.; Henriques, A. (2006). Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.565-567.
  - Silva, W.; Doria, G.; Maia, R.; Nunes, R.; Carvalho, G.; Blank, A.; Alves, P.; Marcal, R.; Cavalcanti, S. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technology. Volumen 99, págs.3251-3255.
  - Dob, T.; Dahmane, D.; Chelghoum, C. (2006). Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. Pharmaceutical Biology. Volumen 44, págs.1-6.
  - Elias, V.; Simoneit, B.; Cardoso, J. (1997). Analysis of volatile sesquiterpenoids in environmental and geological samples. Journal of High Resolution Chromatography. Volumen 20, págs.305-309.
  - Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 54, págs.4364-4370.
  - Noudogbessi, J.; Yedomonhan, P.; Sohounhloue, D.; Chalchat, J.; Figueredo, G. (2008). Chemical composition of essential oil of *syzygium guineense* (Willd.) DC. var. *guineense* (Myrtaceae) from Benin. Rec. Nat. Prod. Págs. 33-38.
  - Araújo, E.; Silveira, E.; Lima, M.; Neto, M.; de Andrade, I.; Lima, M.; Santiago, G.; Mesquita, A. (2003). Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 51, págs.3760-3762.
  - Wang, Y.; Finn, C.; Qian, M. (2005). Impact of Growing Environment on Chickasaw Blackberry (*Rubus* L.) Aroma Evaluated by Gas Chromatography Olfactometry Dilution Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 53, págs.3563-3571.
  - Senatore, F.; Urrunaga, E.; Urrunaga, R.; Porta, G.; de Feo, V. (1998). Essential oil from two peruvian *Satureja* species. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 13, págs.1-4.



33. König, W.; Joulain, D.; Hochmuth, D. (2006). GC/MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Retrieved from <http://www.massfinder.com/mfiterpenoids.htm>.
34. Moreno, P.; Lima, M.; Sobral, M.; Young, M.; Cordeiro, I.; Apel, M.; Limberger, R.; Henriques, A. (2007). Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Scientia Agricola* (Piracicaba Braz). Volumen 64. N° 4, págs.428-432.
35. Abreu, P.; Noronha, R. (1997). Volatile constituents of the rhizomes of *Aframomum alboviolaceum* (Ridley) K. Schum from Guinea-Bissau. *Flavour and Fragrance Journal*. Volumen 12, págs.79-83.
36. Acree, T.; Arn, H., Flavornet, 2004, retrieved from <http://www.flavornet.org/>.
37. Vahirua-Lechat, I.; Mitermite, Y. (2010). Aromatic Plants of French Polynesia. IV. Composition and chemical variations of the essential oils of leaves of *Etilingera cevuga* (Seeman) R.E. Smith. *The Journal of essential oil research*. Volumen 22. N° 5, págs.407-408.
38. Hognadottir, A.; Rouseff, R. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Volumen 998, págs.201-211.
39. BenTaarit, M.; Msaada, K.; Hosni, K.; Ben Amor, N.; Marzouk, B.; Kchouk, M. (2010). Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the Northeast region of Tunisia. *The journal of essential oil research*. Volumen 22. N°5, págs.449-453.
40. Wannas, W.; Mhamdi, B.; Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. italica fruit maturation. *Journal Food Chemistry*. Volumen 112. N° 3, págs.621-626.
41. Szafranek, B.; Chrapkowska, K.; Ska, M.; Szafranek, J. (2005). Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volumen 53, págs.2817-2822.
42. Umano, R.; Hagi, Y.; Shibamoto, T. (2002). Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volumen 50, págs.5355-5359.
43. Davies, N. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*. Volumen 503, págs.1-24.
44. Jaramillo, B.; Stashenko, E.; Martínez, J. (2010). Composición química volátil de *Satureja brownei* (Sw.) Briq. colombiana y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Volumen 15. N°1, págs.52-63.
45. Chung, T.; Eiserich, J.; Shibamoto, T. (1993). Volatile compounds isolated from edible *Korean chamchwi* (Aster scaber Thunb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volumen 41, págs.1693-1697.
46. Hamilton, J.; Hall, D.; Kirk, W. (2005). Identification of a male-produced aggregation pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Chemical Ecology*. Volumen 31, págs.1369-1379.
47. Gaydou, E., Randriamiharisoa, R., Bianchini, J. (1986). Composition of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson forma genuina) from Madagascar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Volumen 34, págs.481-487.
48. Mendes, S., Sávio, D., Boscacci, M., Capuano, R., Cechinel, V., Luiz, E., Wisniewski, A. (2008). Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source of spathulenol. *Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, Ponta Grossa. Volumen 14. N° 3, págs. 241-245.
49. Frizzo, C.; Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S.; Cassel, E.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. (2008). Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Journal Flavour and Fragrance*. Volumen 23. N° 2, págs. 99-106.
50. Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Revista Protección Vegetal*. Volumen 24. N°1, págs. 39-46.
51. Brooks, G.; Butel, J.; Morse, S. (2005). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Decimoctava edición. Editorial El Manual Moderno. Impreso en México.
52. Zapata, B.; Durán, C.; Stashenko, E.; Betancur, L.; Mesa, A. (2010). Actividad antimicrobica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*. Volumen 27. N°2, págs.101-103.
53. Hadad, M.; Zygadlo, J.; Lima, B.; Derita, M.; Egly, G.; Zacchino, S.; Tapia, A. (2007). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of essential oil from *Baccharis grisebachii* Hieron (ASTERACEAE). *Journal of the Chilean Chemical Society*. Volumen 52. N° 2, págs. 1186-1189.
54. Rojas, J.; Velasco, J.; Rojas, L.; Díaz, T.; Carmona, J.; Morales, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H.B.&K.(Asteraceae). *Natural product Communications (NPC)*. Volumen 2. N° 12, págs. 1245-1248.
55. Oliva, M.; Beltramino, E.; Gallucci, N.; Casero, C.; Zygadlo, J.; Demo, M.(2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L. Her.)Britton from different regions of Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. Volumen 9. N°1, págs.29-37.
56. Selim, S. (2011).Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the *Egyptian lemongrass* *Cymbopogon proximus* Stapf. *Revista Grasas y Aceites*. Volumen 62. N° 1, págs.55-61



**CAPITULO I**  
**FIN, PROPÓSITO Y**  
**COMPONENTES**  
**DEL PROYECTO**



## 1. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

### 1.1. FIN DEL PROYECTO

El presente proyecto de investigación tiene como fin contribuir al estudio de la Flora aromática de la región sur del Ecuador a través de la investigación de productos naturales como aceites esenciales.

### 1.2. PROPÓSITO DEL PROYECTO

Determinar la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia*.

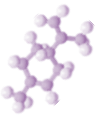
### 1.3. COMPONENTES DEL PROYECTO

- Extracción del aceite esencial de *B. obtusifolia* mediante el método de destilación por arrastre con vapor y cálculo del rendimiento.
- Caracterización del aceite esencial de *B. obtusifolia* en base a sus propiedades físicas como densidad e índice de refracción.
- Determinación de la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y al detector de ionización de llama (GC-FID).
- Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica empleando el método de microdilución en caldo, los resultados serán reportados como la CMI (concentración mínima inhibitoria).

### 1.4. HIPÓTESIS

- **H<sub>1</sub>**: Los aceites esenciales de *B. obtusifolia* evaluados presentan actividad antifúngica y antibacteriana.
- **H<sub>0</sub>**: Los aceites esenciales de *B. obtusifolia* evaluados no presentan actividad antifúngica y antibacteriana.

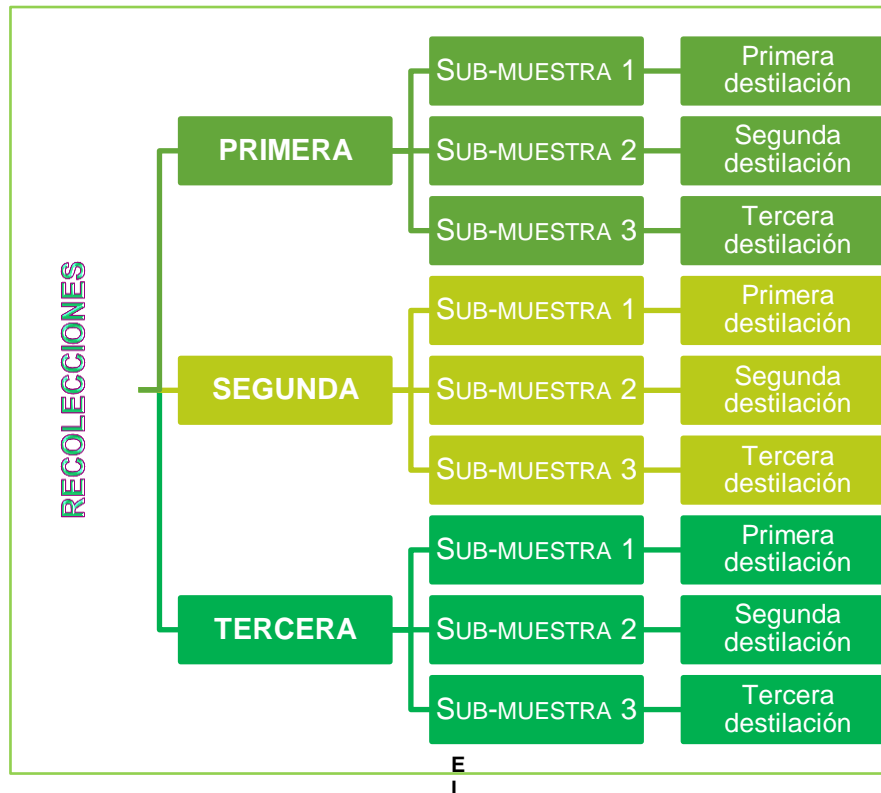




## 1.5. TOMA DE MUESTRAS

Para el desarrollo del presente estudio se llevaron a cabo tres recolecciones, de cada una se tomaron tres sub-muestras de materia vegetal que posteriormente se destilaron para obtener tres muestras de aceite esencial por recolección (Figura 1).

Figura 1. Esquema de la toma de muestras.



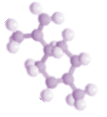
Elaboración: Jandry Rosales.

## 1.6. TRATAMIENTO DE DATOS

A los datos obtenidos de los análisis de las muestras se les aplicó estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación).



**CAPITULO II**  
**INTRODUCCIÓN Y**  
**ANTECEDENTES**



## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha evidenciado un extraordinario auge de la química de los productos naturales en el ámbito mundial,<sup>1</sup> constituyendo una alternativa para el descubrimiento de nuevos principios bioactivos y aportando de forma continua estructuras novedosas.<sup>2</sup> En realidad cada extracto de una planta medicinal es realmente un ente de quimiodiversidad, una librería molecular.<sup>2</sup>

Los aceites esenciales son los extractos naturales más complejos por su composición<sup>3</sup> ya que al no tener estructuras químicas similares, los procesos biosintéticos que los originan también son muy diversos, teniendo cada uno sus propios precursores biosintéticos, sus peculiares condiciones de desenvolvimiento, sus lugares específicos de formación y almacenamiento y hasta sus propios tiempos ontogénicos. De acuerdo a Salgueiro et al. (2000), Figueiredo et al. (2008) y Da Porto et al. (2009) citados por Bandoni (2009); existe una dependencia de la calidad de un aceite esencial con múltiples variables intrínsecas (genéticas, biosintéticas) y extrínsecas (clima, suelo, radiación solar, requerimiento hídrico, momento de cosecha del material vegetal y fundamentalmente la técnica utilizada para su obtención).<sup>4</sup>

Se define un aceite esencial o esencia como una parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y que generan en conjunto el olor de dicho vegetal.<sup>3</sup>

Por su complejidad estructural, según Bakkali et al. (2007) citado por Bandoni (2002); los aceites pueden ser útiles en distintas aplicaciones, bajo distintos perfiles analíticos, por su sabor, por su olor, por la especificidad estructural de sus ingredientes, por la sinergia de efectos entre más de dos de sus constituyentes, por la fuerte inestabilidad química o reactividad, etc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). Revista Protección Vegetal. Volumen 24. N°1, págs. 39-46.

<sup>2</sup> Muñoz, O.; Fajardo V. (2005). Flora de Chile. Biología, farmacología y química. Impreso en la Universidad de Playa Ancha. Santiago, Chile.

<sup>3</sup> Bandoni, A. (2002). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Argentina.

<sup>4</sup> Bandoni, A.; Retta, D.; Di Leo Lira, P.; Baren, C. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Volumen 8. N° 5, págs. 317-322.



Los aceites esenciales se convierten en una fuente ideal de materias primas para la industria, muchos de ellos son la base de infinidad de perfumes y sabores conocidos; si bien algunos componentes mayoritarios no son portadores de olores o sabores comercialmente buscados, estos pueden servir de materia prima para otras ramas industriales o emplearse en medicina debido a las propiedades farmacológicas atribuidas por su acción antiséptica, bactericida, antiartrítica-antirreumática y antiinflamatoria.<sup>3</sup>

Aun cuando el uso final de una esencia sea la semisíntesis de productos industriales, para su obtención se emplean métodos de destilación por agua o hidrodestilación, destilación previa maceración, destilación sometida a una degradación térmica, expresión, destilación por arrastre con vapor entre otros, siendo este último, el método más sencillo, seguro, económico en comparación a métodos de extracción que emplean disolventes orgánicos, permitiendo aislar sustancias orgánicas líquidas inmiscibles o muy poco miscibles en agua evitando la descomposición de los compuestos que resultan ser termolábiles a temperaturas cercanas a su punto de ebullición.<sup>3</sup>

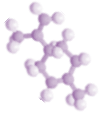
En la actualidad, la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra se realiza por cromatografía de gases; la combinación de las altas resoluciones, la sensibilidad y los tiempos de análisis cortos la han convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos, consiguiendo así la separación de mezclas muy complejas.<sup>5</sup>

En el proceso cromatográfico se suministra uno o varios gases de alta pureza, uno de ellos llamado "gas portador" el cual fluye hacia el interior del inyector, pasa por la columna y se introduce en el detector. Al introducir la muestra en el inyector esta se calentará normalmente hasta 150-250 °C, lo que da como resultado la vaporización de los solutos volátiles de la muestra, estos solutos vaporizados se introducen posteriormente en la columna mediante el gas portador manteniéndose en un horno con control de temperatura, los solutos pasan por la columna a velocidades variables, el soluto más rápido sale (se eluye) de la columna en primer lugar, seguido de los solutos restantes en el orden correspondiente, a medida que eluye cada soluto, se

---

<sup>3</sup> Bandoni, A. (2002). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. CYTED. Argentina.

<sup>5</sup> Gutiérrez, M.; Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter del Instituto de investigación textil y de cooperación industrial. Universidad Politécnica de Catalunya. Volumen 122. Págs. 49-54



introduce en el detector calentado donde se genera una señal electrónica basada en la interacción del soluto con el detector, el tamaño de la señal se registra en una base de datos y se representa gráficamente según el tiempo transcurrido para generar un cromatograma.<sup>6</sup>

A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada, también se la utiliza para establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra, usando curvas de calibración de los correspondientes patrones; a tal efecto se pueden emplear diferentes detectores basados generalmente en la medida de una determinada propiedad física de los componentes a analizar, algunos de ellos son universales, otros resultan ser más selectivos y responden únicamente a algunos de los componentes de una mezcla; en este sentido, la espectrometría de masas es una de las técnicas con una capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca ya que proporciona un espectro característico de cada molécula; al ser acoplada a la cromatografía de gases puede resultar un detector universal para la cuantificación de sustancias orgánicas si se registra el total de iones generados (modo TIC) o bien un detector más específico cuando se seleccionan unos iones de masa determinada (modo SIR). Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) dan lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.<sup>5</sup>

En los últimos años, un gran número de aceites esenciales y sus constituyentes han sido investigados por sus propiedades antimicrobianas frente a algunas bacterias y hongos.<sup>7</sup> Actualmente especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica;<sup>8</sup> la investigación en plantas, se realiza en muchas latitudes con resultados muy promisorios, pues se han encontrado, efectos antimicóticos en muchos extractos vegetales ya que la resistencia de las bacterias y hongos a los fármacos antimicrobianos, la toxicidad de ellos y muchas veces su elevado costo, ha producido una intensa búsqueda de nuevas moléculas.<sup>9</sup>

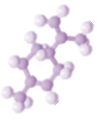
<sup>5</sup> Gutiérrez, M.; Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter del Instituto de investigación textil y de cooperación industrial. Universidad Politécnica de Catalunya. Volumen 122. Págs. 49-54.

<sup>6</sup> Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. © Agilent Technologies, Inc. 2010. Impreso en EE.UU.

<sup>7</sup> Kalemba, D; Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Revista Current Medicinal Chemistry. Volumen 10. N° 10, págs. 813-829.

<sup>8</sup> Ramirez, L.; Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. Volumen 15. N° 42, págs. 263-268.

<sup>9</sup> Álvarez, M.; Isaza, G.; Acosta, S.; Yepes, A. (2005). Actividad antimicótica de *Phenax Rugosus* (Lam) Pers y *Baccharis Trinervis* (Sw) Wedd. Revista Biosalud. Volumen 14. N° 4, págs. 38-45.



En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido a que el conocimiento médico ancestral es inmenso.<sup>10</sup> Se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en el Ecuador, las familias que tuvieron un mayor número de especies fueron Asteraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Araceae.<sup>10</sup> Entre las familias con mayor número de especies productoras de sustancias aromáticas tenemos la Asteraceae o Compositae la misma que constituida por hierbas, arbustos, árboles.<sup>11</sup>

El género *Baccharis* perteneciente a la familia Asteraceae es exclusivamente americano y consta de unas 400 especies.<sup>12</sup> Se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Argentina y Chile.<sup>13</sup> En esta vasta área se encuentra profusamente diversificado, ocupando gran variedad de ambientes y constituyendo un importante elemento en numerosas formaciones vegetales.<sup>13</sup>

El estudio de las especies del género *Baccharis* ha experimentado un gran avance por su uso en la medicina tradicional de América Latina.<sup>14</sup> Muchas de las especies de este género son comúnmente utilizadas en el tratamiento o prevención de anemias, inflamaciones, diabetes, en enfermedades del hígado, estómago, próstata.<sup>14</sup> Según Budel et al. (2003), Abad & Bermejo (2007) citados por Molares (2009); el uso medicinal de este género, se encuentra vinculado a la presencia y actividad biológica de flavonoides y otros compuestos fenólicos, cumarinas y/o aceites esenciales que normalmente suelen poseer.<sup>13</sup> Feresin et al. (2003), Abad & Bermejo (2007) citados por Molares (2009); mencionan que estudios farmacológicos realizados sobre parte de los componentes químicos, o bien sobre los exudados, han demostrado principalmente, actividad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y antifúngica, además de las digestivas, hepáticas y renales más conocidas.<sup>13</sup>

En nuestro país *Baccharis* incluye alrededor de un tercio de todas las especies.<sup>15</sup> En el Ecuador se encuentran unas 35 especies, pocas se encuentran bajo los 1000 m de

---

<sup>10</sup> De la Torre, L.; Navarrete, H.; Muriel, P.; Macía, M.; Balsle, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. Págs. 105-114.

<sup>11</sup> Freire, A. (2004). Botánica sistemática ecuatoriana. Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA. St. Louis, págs.122-123.

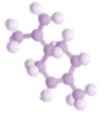
<sup>12</sup> Ulloa, C.; Jørgensen, Peter. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Base de datos: eFloras.org. Disponible en: www.eFloras.org

<sup>13</sup> Molares, S.; González, S.; Ladio, A.; Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Botánica Brasilica. Volumen 23. N° 2, págs. 578-589.

<sup>14</sup> Gonzaga, L.; Costa, I.; Pizzolatti, G. (2005). Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos. Revista Química Nova. Volumen 28. N° 1, págs. 85-94.

<sup>13</sup> Molares, S.; González, S.; Ladio, A.; Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Botánica Brasilica. Volumen 23. N° 2, págs. 578-589.

<sup>15</sup> Müller, J. (2007). A new small-leaved species of *Baccharis* (Compositae-Astereae) from Ecuador. Anales del Jardín Botánico de Madrid. Volumen 64. N°2, págs. 191-194.



altitud, sobre los 2400 m se ha registrado 32 especies muchas de ellas ampliamente distribuidas en la zona andina,<sup>12</sup> y utilizadas en la medicina tradicional de varias comunidades por sus propiedades terapéuticas, las mismas que han sido reportadas en estudios etnobotánicos como el publicado por Tene et al. (2006); en el cual se mencionan las aplicaciones terapéuticas, las partes utilizadas y el modo de uso de *B. latifolia*, *B. genistelloides* y *B. obtusifolia*.<sup>16</sup> El estudio de las especies aromáticas como *B. obovata* confirma el uso cosmético y farmacológico por parte de los habitantes de las comunidades Mapuches de Lago Rosario y Nahuelpan de Argentina destacándose como un recurso etnobotánico utilizada en el tratamiento de las cefalalgias y alopecia.<sup>13</sup>

*Baccharis obtusifolia* es un arbusto nativo que se encuentra entre los 1500-3500 m.s.n.m., está distribuido en la región andina especialmente en las provincias de Azuay, Cañar, Loja y Napo.<sup>17</sup> En la medicina ancestral de los grupos étnicos de la región sur del país, la especie es utilizada para el resfrío en el momento del parto,<sup>18</sup> como leña, medicina para el “mal del aire” y reumatismo por lo cual las hojas son calentadas hasta que adquieran un aspecto pegajoso para ser colocadas en el sitio del dolor.<sup>19</sup>

Pese al reconocido potencial terapéutico de las especies vegetales en nuestro país, la producción de fitofármacos es limitada debido a la escasa información científica e infraestructura agro-farmacéutica deficiente.<sup>20</sup>

El presente estudio pretende determinar la composición química, las propiedades físicas y la actividad biológica del aceite esencial de *B. obtusifolia* que forma parte del estudio de la flora aromática de la región sur del Ecuador llevado a cabo en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

<sup>12</sup> Ulloa, C.; Jørgensen, Peter. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Base de datos: eFloras.org. Disponible en: [www.eFloras.org](http://www.eFloras.org)

<sup>13</sup> Molares, S.; González, S.; Ladio, A.; Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Botánica Brasílica. Volumen 23. N° 2, págs. 578-589.

<sup>16</sup> Tene, V.; Malagón, O.; Vita Finzi, P.; Vidari, G.; Armijos, Ch.; Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology. Volumen 111. N°1, págs. 63-81.

<sup>17</sup> Jørgensen P. M.; León-Yáñez S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press. Volumen 75.págs. 269.

<sup>18</sup> Andrade, M.; Armijos, Ch.; Malagón, O.; Lucero, H. (2009). Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la parroquia San Lucas, provincia de Loja-Ecuador. Ediciones U.T.P.L. Loja-Ecuador. Págs. 22.

<sup>19</sup> Base de datos Tropicos. Missouri Botanical Garden. Specimen N° 66603- L. Ellemann.

<sup>20</sup> Ecuador: Uso y Comercio de Plantas Medicinales. (1999). Taller convocado por TRAFFIC internacional, facilitado y moderado por Dra. Ruth Hidalgo del centro ecuatoriano de derecho ambiental-CEDA. Financiado por el Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo de Alemania.



## 2.2. ANTECEDENTES

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones que relacionan los productos naturales y la actividad antimicrobiana, de tal forma que las investigaciones se han encaminado hacia los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas.<sup>8</sup>

Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Baccharis* (Asteraceae) poseen una bioactividad significativa, sin embargo son muy pocos los reportes que han sido publicados sobre el aceite esencial de plantas pertenecientes al género.<sup>21</sup>

Algunos estudios sobre la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de varias especies del género *Baccharis* se detallan a continuación:

Carrizo et al. (2009); reportó la composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis salicifolia*, identificando como componentes mayoritarios:  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -caryophyllene, 6,9-guaiadiene, germacrene D y germacrone. El aceite esencial fue evaluado frente a ocho bacterias Gram positivas y Gram negativas, mostrando una moderada actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas evaluadas con una CMI de 0,47 a 0,94 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mientras que todas las bacterias Gram negativas fueron resistentes.<sup>21</sup>

En ensayos antimicrobianos se ha demostrado que el aceite esencial de *B. dracunculifolia* a una dosis de 10  $\mu\text{L}$  evita el crecimiento microbiano de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.<sup>22</sup>

En el estudio "Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Baccharis spartioides*" presentando ante la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica se informa de la variabilidad tanto en la calidad como en la cantidad de los diferentes componentes de los aceites esenciales extraídos de las hojas y tallos provenientes de

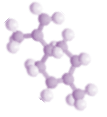
---

<sup>8</sup> Ramirez, L.; Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. Volumen 15. N° 42, págs. 263-268.

<sup>21</sup> Carrizo, R; Ponzi, M; Ardanaz, C; Tonn, C.; Donadel, O. (2009). Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz&Pavon) Pers. and antibacterial activity. Journal of the Chilean Chemical Society. Volumen 54. N°4, págs.475-476.

<sup>22</sup> Silva, NCC; Fernandes, J. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. Volumen 16. N°3, págs. 402-413.





la Rioja, Río Negro y de Córdoba. El aceite esencial de La Rioja presento una elevada concentración de limoneno y de sesquiterpenos; la población de Córdoba presento una concentración de monoterpenos superior al 70%, mientras que la población de Río Negro se caracterizó por un elevado contenido de canfeno y de hidrocarburos sesquiterpenicos. La bioactividad de los aceites esenciales provenientes de cada población fue determinada frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *C. albicans*. Los resultados de los bioensayos mostraron que los aceites esenciales de la población de Córdoba tienen una mayor bioactividad.<sup>23</sup>

El estudio “Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* and *B. prunifolia*” publicado en la revista “Natural Product Communications (NPC)” reporta 16 y 29 compuestos para *B. latifolia* y *B. prunifolia* respectivamente. Los compuestos identificados fueron clasificados en cuatro grupos: monoterpenos (9,0% *B. latifolia*; 43,9% *B. prunifolia*), monoterpenos oxigenados (0,8% *B. latifolia*; 5,4% *B. prunifolia*), sesquiterpenos (20,4% *B. latifolia*; 45,9% *B. prunifolia*) y sesquiterpenos oxigenados (69,8% *B. latifolia*; 1,9% *B. prunifolia*). Los aceites esenciales extraídos presentan actividad únicamente frente a bacterias Gram positivas.<sup>24</sup>

La composición química y actividad biológica de los extractos de especies del género *Baccharis* ha sido objeto de estudio en algunas investigaciones.

Davicino et al. (2007); publica en la Revista Peruana de Biología la actividad antifúngica de extractos obtenidos de las especies *Larrea divaricata*, *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Baccharis trimera*, *Schinus terebenthifolius* utilizadas en la medicina popular de Argentina.<sup>25</sup>

Los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos como *Phytophthora palmivora* y

<sup>23</sup> Oliva, M.; Demo, M.; Biurrun, F.; Juliani, R.; López, M.; Zygadlo, J. (2002). Composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Baccharis spartioides*. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, I Congreso Latinoamericano de Fitoquímica, Buenos Aires-Argentina del 8-10 de Mayo.

<sup>24</sup> Rojas, J.; Velasco, J.; Rojas, L.; Díaz, T.; Carmona, J.; Morales, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H.B.&K. (Asteraceae). Revista Natural Product Communications. Volumen 2. N°12, págs. 1245-1248.

<sup>25</sup> Davicino, R.; Mattar, M.; Casali, Y.; Correa, S.; Pettenati, E.; Micalizzi, B. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Revista Peruana de Biología. Volumen 14. N°2, págs. 247-251.



*Aspergillus niger* mostraron una reducción en el crecimiento de los hongos patógenos por efecto de los extractos de *B. latifolia*.<sup>26</sup>

El estudio de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar modificado de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de las partes aéreas de *Baccharis nitida* frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* señala la actividad antibacteriana de todos los extractos únicamente frente a *S. aureus*.<sup>27</sup>

Los extractos etanólicos de *Phenax rugosus* y *Baccharis trinervis* frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* presentaron actividad antimicótica a dosis de 150 mg/mL mientras que *Candida albicans* no fue sensible a ninguno de los extractos evaluados.<sup>9</sup>

Cabe mencionar que se han reportado estudios de tipo etnobotánico y de extractos de la especie *B. obtusifolia* sin embargo no existen publicaciones científicas del aceite esencial de la especie.

Los extractos acuosos de ocho especies del género *Baccharis* del Departamento de la Paz y Santa Cruz, Bolivia fueron ensayados in vivo con la finalidad de evaluar su actividad antiinflamatoria aguda por el modelo biológico de edema de pata inducido por carragenina. Los resultados indican que *B. salicifolia*, *B. subalata* presentan buena actividad; *B. dracunculifolia*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia* una moderada actividad; *B. articulata*, *B. ulcina* una baja actividad antiinflamatoria.<sup>28</sup>

Tene et al. (2006); en su estudio etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe de Ecuador, expone el uso de la especie *obtusifolia* como antimicótico y en el tratamiento del reumatismo por la etnia Saraguro.<sup>16</sup>

---

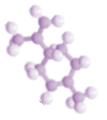
<sup>9</sup> Álvarez, M.; Isaza, G.; Acosta, S.; Yepes, A. (2005). Actividad antimicótica de *Phenax Rugosus* (Lam) Pers y *Baccharis Trinervis* (Sw)Wedd. Revista Biosalud. Volumen 14. N°4, págs. 38-45.

<sup>16</sup> Tene, V.; Malagón, O.; Vita Finzi, P.; Vidari, G.; Armijos, Ch.; Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology. Volumen 111. N°1, págs. 63-81.

<sup>26</sup> Martínez, S.; Terrazas, E.; Alvarez, T.; Mamani, O.; Vila, J.; Mollinedo, P. (2010). Actividad antifúngica in vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Revista Boliviana de Química. Volumen 27. N°1, págs. 13-18.

<sup>27</sup> Rangel, D.; García, I.; Velasco, J.; Buitrago, D.; Velasco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. Revista de la Facultad de Farmacia. Volumen 42. N°2, págs. 43-46.

<sup>28</sup> Gonzalez, E.; Villca, T.; Loza, R. (2007). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulcina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. Revista Boliviana de Química. Volumen 24. N° 1, págs. 41-43.



A nivel local se han realizado estudios acerca de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotoxicidad de extractos metanólicos de varias especies usadas en la medicina tradicional de la provincia de Loja entre ellas *B. obtusifolia*, los extractos fueron evaluados frente a diversos microorganismos, algunos de ellos responsables de patologías comunes: *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* con la finalidad de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante ensayos de difusión en caja petri y dilución TC24 y TC96. El estudio mostró que todos los extractos tienen actividad antimicrobiana notoria frente a *P. vulgaris* y *S. aureus*; *Piper barbatum* y *B. obtusifolia* son activos frente a *K. pneumoniae*; *Piper barbatum*, *B. obtusifolia* y *B. genistelloides* presentan actividad notoria frente a *P. aeruginosa*; *Piper barbatum* es activa frente a *A. niger*; *B. obtusifolia* y *B. genistelloides* son activos frente a *N. crassa*; *B. genistelloides* resultó activo frente a *S. cerevisiae*; mientras que ningún extracto fue activo frente a *E. coli* y *C. albicans*.<sup>29</sup>

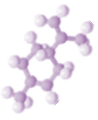
La aparición de la resistencia de cepas microbianas responsables de varias infecciones en humanos frente a los antimicrobianos, ha dado lugar a un grave problema de salud pública de interés mundial; siendo preocupante la resistencia de las especies de *E. coli*, *M. tuberculosis*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Campylobacter* spp., *C. albicans*, *Plasmodium* spp., virus del herpes simple entre otras;<sup>30</sup> razón por la cual algunos de los microorganismos mencionados anteriormente son de interés en la presente investigación y han sido evaluados frente a sustancias naturales que han demostrado actividad antibacteriana, antifúngica e incluso antiparasitaria.

*E. coli* es uno de los microorganismos móviles, Gram-negativos, anaerobios facultativos de importancia médica que registra antecedentes epidemiológicos. En Ecuador gracias a la red nacional de vigilancia de resistencia bacteriana (REDNARBEC) durante los años 2003-2004 se conoce que es el patógeno aislado con mayor frecuencia en la comunidad proveniente de infecciones de vías urinarias.<sup>31</sup>

<sup>29</sup> Jaramillo, X.; Zaragoza, T.; Malagón, O. (2004). Descripción etnobotánica y estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotoxicidad de los extractos totales de cinco especies vegetales nativas de la provincia de Loja: *Baccharis genistelloides* (monte tres filos), *Baccharis obtusifolia* (chilca redonda), *Baccharis latifolia* (chilca larga), *Piper barbatum* (cordoncillo) y *Bidens andicola* (nachi). Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina. XIII Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Paolo Ceccherelli". Roma 21 de Septiembre y Salerno 22-25 de septiembre.

<sup>30</sup> Organización mundial de la salud. Disponible en: <http://www.who.int> Consultado el 4 de septiembre del 2012.

<sup>31</sup> Zurita, J. (2010). Epidemiología de la resistencia bacteriana en Ecuador. Disponible en: <http://www.ura-merck.com>



Se han identificado varios factores de virulencia sobre todo en cepas asociadas con enfermedades diarreicas<sup>32</sup> como la verotoxina producida por *E. coli* enterohemorrágico “EHEC” (ver fotografía 1) la misma que puede causar graves enfermedades a través de los alimentos y que puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal como el síndrome hemolítico urémico.<sup>34</sup>

Según la Organización mundial de la salud (O.M.S.) *E. coli* O157: H7 es el serotipo de EHEC más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos.<sup>34</sup>

*S. aureus* es un coco Gram-positivo, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulante que generalmente se dispone en racimos irregulares (ver fotografía 2) formando parte de la flora microbiana normal de la piel humana llegando a producir enfermedades mediante la capacidad de proliferar y propagarse ampliamente por los tejidos y la capacidad de producir toxinas y enzimas extracelulares.<sup>36</sup>

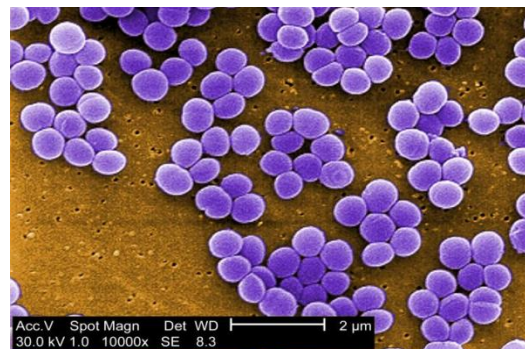
En nuestro país es aislada con mayor frecuencia tanto en las infecciones de la comunidad como en las adquiridas en el hospital y afecta en igual forma a individuos sanos como a inmunocomprometidos.<sup>31</sup> De acuerdo a la O.M.S., un alto porcentaje de infecciones hospitalarias se debe a las bacterias resistentes, como *S. aureus* resistente a la meticilina.<sup>37</sup>

**Fotografía 1.** *Escherichia coli* enterotoxigénica, agente causal de diarrea, en frotis de cultivo puro con tinción de Gram. Se observan bacilos Gram negativos.



**Fuente:** Revista peruana de medicina experimental y salud pública.<sup>33</sup>

**Fotografía 2.** Cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*.



**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention.<sup>35</sup>

<sup>32</sup> Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. (2000). Microbiología médica. Segunda edición. Ediciones Harcourt, S.A. Impreso en España por Grafos, S.A. Págs. 523-524.

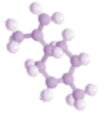
<sup>33</sup> Zerpa, R. (2011). Agentes etiológicos de diarrea: bacterias y parásitos importantes en niños y adultos (Galería fotográfica). Revista peruana de medicina experimental y salud pública. Volumen 28. N°1, págs. 152-155.

<sup>34</sup> Organización Mundial de la Salud. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Centro de prensa. Nota descriptiva N°125, diciembre de 2011.

<sup>35</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/> Consultado el 4 de septiembre del 2012.

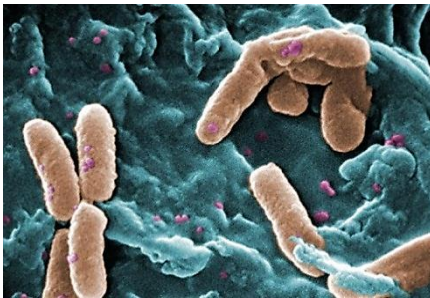
<sup>36</sup> Organización Mundial de la Salud. Epidemiología de *Staphylococcus aureus* Hojas de información microbiológica. Disponible en: <http://www.who.int> Consultado el 4 de septiembre del 2012

<sup>37</sup> Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. Centro de prensa. Nota descriptiva N° 194, marzo del 2012.



*P. aeruginosa* forma parte del grupo de bacilos Gram-negativos (ver fotografía 3) no

**Fotografía 3.** *Pseudomonas aeruginosa*.



**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention.<sup>35</sup>

fermentadores, móviles y aerobios que puede desarrollarse en forma anaerobia utilizando nitrato o arginina. Este microorganismo oportunista de amplia distribución ambiental, presente en la tierra, materia orgánica en descomposición, vegetales y agua,<sup>38</sup> reúne los mecanismos de resistencia y panresistencia más graves ocasionando infecciones con mayor problema en el medio hospitalario de Latinoamérica.<sup>39</sup> El problema que presentan actualmente los aislados de *P. aeruginosa* es la elevada resistencia a los aminoglucósidos, a las fluoroquinolonas y a los carbapenemes.<sup>39</sup>

Las infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenémicos o enterobacterias productoras de carbapenemasas son agentes emergentes en el ámbito nosocomial mundial.<sup>40</sup> Entre los microorganismos comúnmente involucrados en la sepsis nosocomial se encuentran los bacilos Gram-negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente especies del género *Klebsiella*.<sup>41</sup>

*Klebsiella pneumoniae* (ver fotografía 4) es un patógeno encapsulado de importancia en el ámbito hospitalario, frecuentemente relacionado con infecciones nosocomiales en unidades de cuidado intensivo y salas de pediatría desde donde se aíslan cada vez con más frecuencia cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación con resistencia combinada (corresistencia) a múltiples antibióticos.<sup>42</sup> Con la proliferación de cepas multirresistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por este microorganismo es aún mayor, ya que al ser más difíciles de tratar dan lugar a incrementos en las tasas de mortalidad.<sup>42</sup> Actualmente con la finalidad de contribuir al

**Fotografía 4.** *Klebsiella pneumoniae*.



**Fuente:** Centers for Disease Control and Prevention.<sup>35</sup>

<sup>35</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/>. Consultado el 4 de septiembre del 2012.

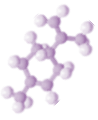
<sup>38</sup> Sandoval, C.; Moreno, C.; Abarca, K. (2011). Sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* en un lactante previamente sano. Revista chilena de infectología. Volumen 28. N°6, págs. 592-596.

<sup>39</sup> Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Revista Panamericana de Salud Pública. Volumen 30. N°6, págs. 519-28.

<sup>40</sup> Cifuentes, M.; García, P.; San Martín, P.; Silva, F.; Zuñiga, J.; Reyes, S.; Rojas, R.; Ponce, R.; Quintanilla, R.; Delpiano, L.; Wolff, M. (2012). Primer caso de detección de *bla*<sub>KPC</sub> en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. Revista chilena de infectología. Volumen 29. N° 2, págs. 224-228.

<sup>41</sup> González, C.; Gil, F.; Solórzano, M.; Cruz, J.; Puig, J.; Suárez, M.; Nieves, B. (2011). Brote por *Klebsiella pneumoniae* multiresistente y productora de β-lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. Revista chilena de infectología. Volumen 28. N° 1, págs. 28-34.

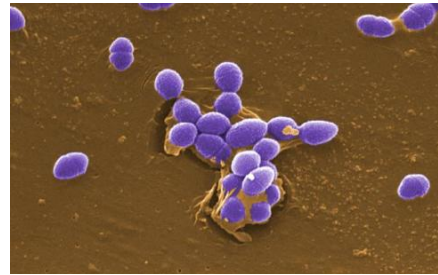
<sup>42</sup> Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C.; Leal, L.; Alpuche, C.; Valenzuela, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. Revista Biomédica. Volumen 24. N°3, págs. 252-261.



conocimiento de los factores que han favorecido el desarrollo de la infección nosocomial se ha combinado procedimientos microbiológicos, bioquímicos y de biología molecular.<sup>42</sup>

En la última década las bacterias del género *Enterococcus* han adquirido cada vez más importancia como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia han sido identificados como oportunistas para los humanos llegando a causar enfermedades; debido a la resistencia que presentan a las penicilinas y cefalosporinas de varias generaciones y a la adquisición de altos niveles de resistencia a los amino glucósidos las opciones terapéuticas son más limitadas. Varios estudios indican que *E. faecalis* (ver fotografía 5) es más abundante en el tracto gastrointestinal de los humanos lo cual podría explicar su prevalencia en los aislamientos clínicos además de su virulencia incrementada.<sup>43</sup>

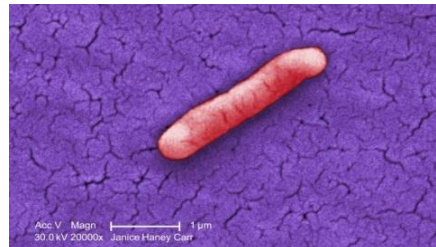
Fotografía 5. *Enterococcus faecalis*.



Fuente: Centers for Disease Control and Prevention.<sup>35</sup>

*Salmonella typhimurium* (ver fotografía 6) es un bacilo Gram-negativo que causa frecuentemente gastroenteritis, además de producir otras infecciones, como por ejemplo bacteriemias en pacientes inmunodeprimidos por el VIH.<sup>44</sup> La microflora multiresistente mayormente compuesta de colonizadores comunes humanos, aparece en los hospitales. Como un género patógeno en humanos, *Salmonella* no es un miembro típico de la microflora hospitalaria, por consiguiente la resistencia múltiple a los antibióticos esta raramente asociada a este género, así también la detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Salmonella* es un fenómeno raro que se ha incrementado en los años recientes.<sup>45</sup> Si *Salmonella typhimurium* puede existir el tiempo suficiente en la microflora hospitalaria, adquirirá e intercambiará plásmidos de resistencia múltiple con otros géneros bacterianos.<sup>45</sup>

Fotografía 6. *Salmonella typhimurium*.



Fuente: Centers for Disease Control and Prevention.<sup>35</sup>

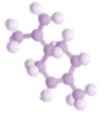
<sup>35</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/>. Consultado el 4 de septiembre del 2012.

<sup>42</sup> Espinal, P.; Mantilla, J.; Saavedra, C.; Leal, L.; Alpuche, C.; Valenzuela, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. Revista Biomédica. Volumen 24. N°3, págs. 252-261.

<sup>43</sup> Díaz, M.; Rodríguez, C.; Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista cubana de higiene y epidemiología. Volumen 48. N° 2, págs. 147-161.

<sup>44</sup> Gallardo, F.; Ruiz, J.; Soto, S.; Jimenez de Anta, M.; Vila, J. (2003). Distintos mecanismos de resistencia asociados a integrones en aislamientos clínicos de *Salmonella typhimurium*. Revista española de quimioterapia. Volumen 16. N° 4, págs. 398-402.

<sup>45</sup> Del Pozo, L.; Silva, N.; Valencia, A.; Soto, J.; Riveros, J.; Sacsquispe, R.; Calderón, R.; Suarez, V. (2006). Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. Anales de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Volumen 67. N° 4, págs. 318-326.



*Proteus vulgaris* es una de las especies con importancia médica dentro de su género, es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo. Generalmente su hábitat natural es el intestino humano, el suelo y el agua; la transmisión se realiza por contacto y la infección a menudo es endógena. La especie *vulgaris* suele ser la más resistente a los antimicrobianos.<sup>32</sup>

Los estudios epidemiológicos relativos a infecciones por dermatofitos se han realizado en muchos países y las diferencias en la incidencia y los agentes etiológicos han sido reportados en diferentes lugares geográficos. En los últimos años se ha visto a nivel mundial un incremento en la frecuencia de casos de dermatofitosis conocidas como “tineas” o “tiñas”, de todas las especies de dermatofitos, las cosmopolitas *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans* y en especial, *Trichophyton rubrum* son las responsables de la mayoría de las dermatofitosis. *T. rubrum* (ver fotografía 7) es un hongo aislado con frecuencia como agente causal de dermatofitosis, así mismo es importante mencionar que otro agente etiológico causante de micosis superficial, *T. mentagrophytes*<sup>47</sup> (ver fotografía 8).

**Fotografía 7.** *Trichophyton rubrum*.



Fuente: Base de datos doctor fungus.<sup>46</sup>

**Fotografía 8.** *Trichophyton mentagrophytes*.



Fuente: Base de datos doctor fungus.<sup>46</sup>

<sup>32</sup> Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D.; Williams, R. (2000). Microbiología médica. Segunda edición. Ediciones Harcourt, S.A. Impreso en España por Grafo, S.A. Págs. 523-524.

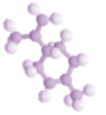
<sup>46</sup> Base de datos doctor fungus. Disponible en: <http://www.doctorfungus.org/>. Consultado el 4 de septiembre del 2012.

<sup>47</sup> Angulo, A.; Bravo, N.; Falco, A.; Pulido, A.; Rivera, Z.; Cavallera, E. (2008). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Revista de dermatología venezolana. Volumen 46. N° 4, págs. 12-17.



**CAPITULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

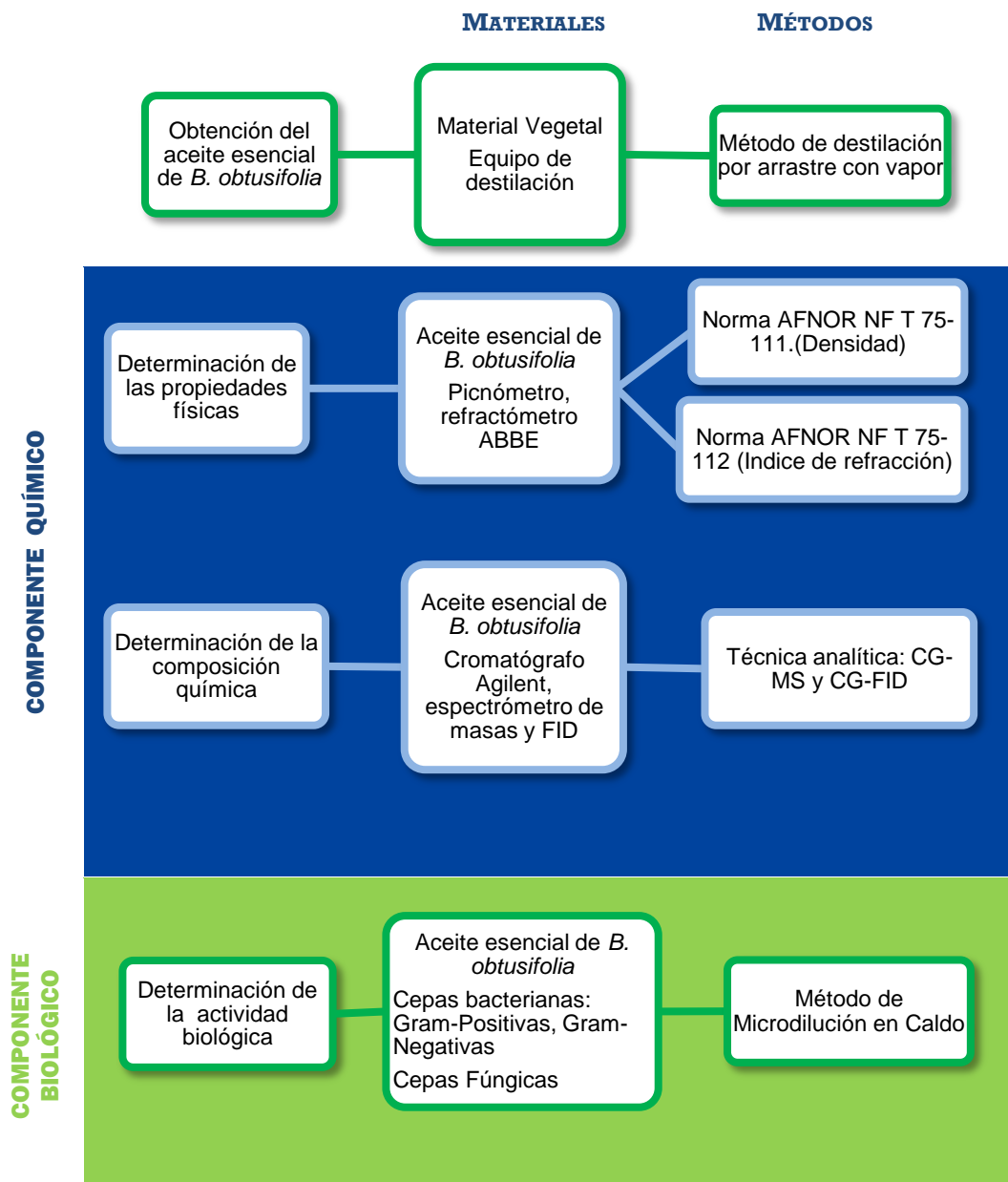




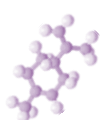
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación tiene un componente químico y biológico, la metodología llevada a cabo en este estudio es expuesta en la figura 2 y se desarrolló en el Departamento de Química de la U.T.P. L.

Figura 2. Esquema de la metodología utilizada en la investigación.



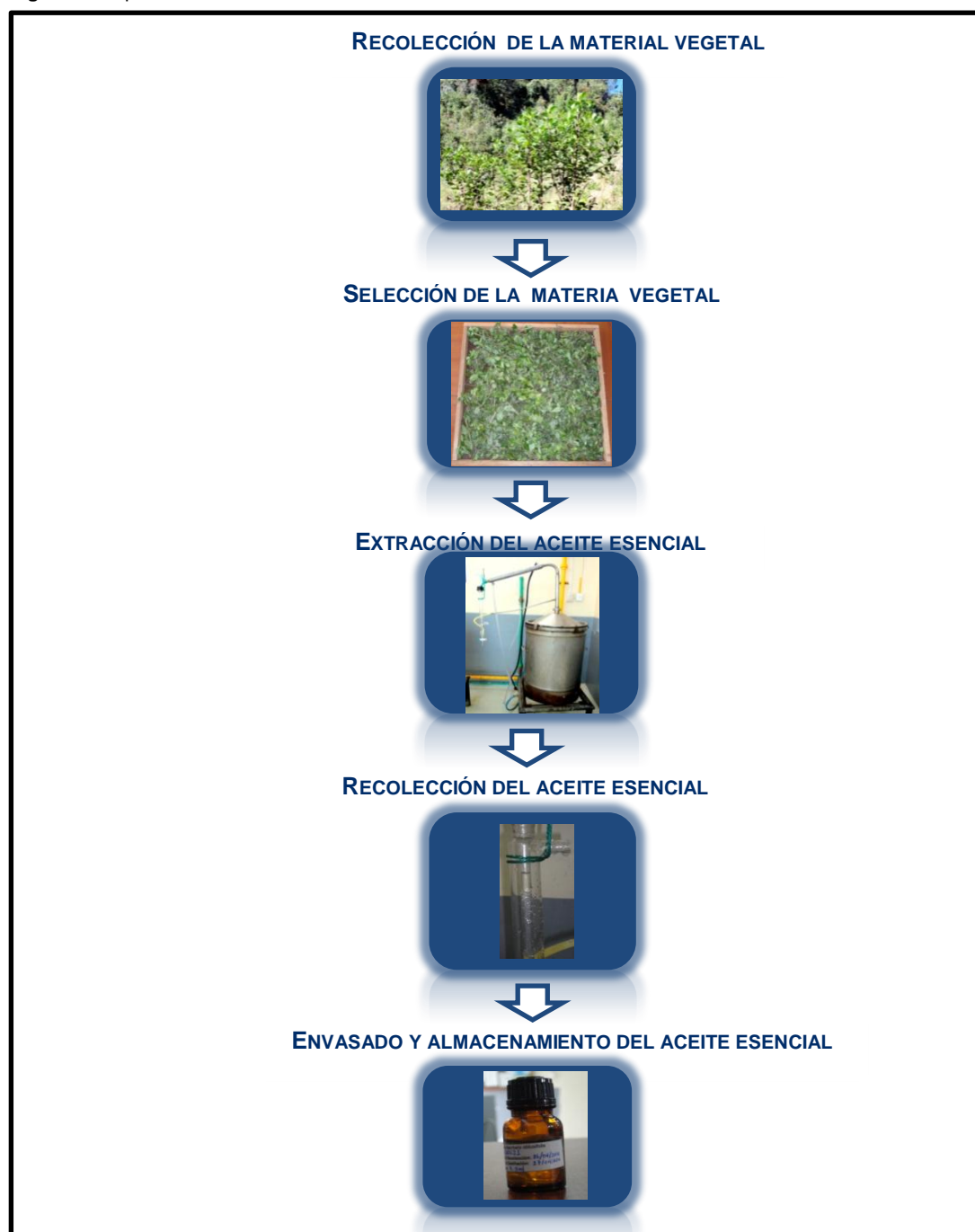
Elaboración: Jandry Rosales.



### 3.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

El proceso de obtención del aceite esencial de *B. obtusifolia* se esquematiza a continuación (Figura 3).

Figura 3. Esquema de la obtención del aceite esencial.



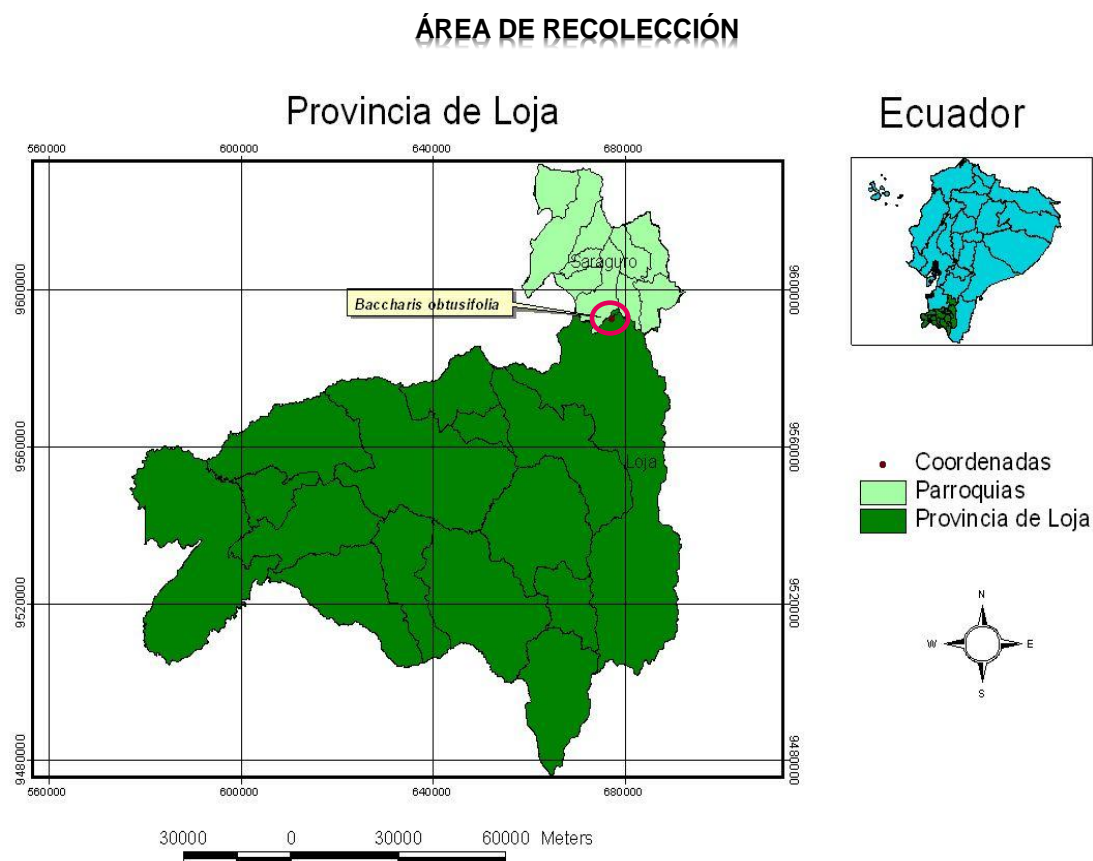
Elaboración: Jandry Rosales.



### 3.1.1. RECOLECCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL.

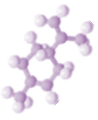
La especie vegetal fue colectada en un tramo de la cordillera “Loma del Oro” ubicada a 6 km al sur de Saraguro con coordenadas UTM: 691583(E), 9592617(N) a una altitud de 3003 m.s.n.m (Figura 4.); se puede acceder a la cadena montañosa desde el sitio donde se une la vía actual panamericana sur y la vía antigua Loja-Saraguro, a partir de la zona de acceso a la formación montañosa se realizó la recolección en un trayecto de 3 Km aproximadamente.

**Figura 4.** Ubicación del área de recolección de la especie *B. obtusifolia*.



**Elaboración:** Ing. Vladimir Morocho.

Previo a la recolección; se llevó a cabo la identificación botánica por el Ing. Bolívar Merino, curador del Herbario de la Universidad Nacional de Loja y una muestra botánica fue depositada en el Herbario del Departamento de Química de Universidad Técnica Particular de Loja, bajo el código PPN-as-014.



La especie recolectada alcanza hasta 1,2 m de altura, es muy ramificado y lignificado desde la base, apretado de follaje en las partes terminales y distinguibles por sus hojas pequeñas, coriáceas y muchas veces con tres dientes. Las flores están en cabezuelas blanquecinas y pequeñas. Hojas alternas, oblanceolado o espatulada de 0,6-1,2 cm de largo por 0,2-0,5 cm de ancho, enteras o frecuentemente con 1 a 2 dientes de cada lado En la fotografía 9 y 10 se presenta respectivamente la especie *B. obtusifolia* en su hábitat y una muestra botánica de la misma.

**Fotografía 9.** *B. obtusifolia* en su hábitat (fotografía tomada en un tramo de la cordillera "Loma del Oro").



**Fuente:** Jandry Rosales.

**Fotografía 10.** Muestra botánica de *B. obtusifolia* depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja.



**Fuente:** Herbario de la U.T.P.L.

**Sinónimo:** *Baccharis loxensis* (Benth)

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Asterales

**Familia:** Asteraceae

**Género:** *Baccharis*

**Especie:** *Baccharis obtusifolia* Kunth

El material fue recolectado en estado de foliación dentro de su hábitat natural, transportado en sacos, en condiciones limpias para su posterior procesamiento. Se realizaron tres recolecciones de marzo a mayo del 2011 cada 30 días; en cada recolección se dividió la materia vegetal en tres partes con pesos iguales, obteniéndose así un total de 9 muestras.



### 3.1.2. SELECCIÓN DE LA MATERIA VEGETAL.

Durante el tratamiento pos-cosecha se seleccionó las partes que se encontraron en buenas condiciones; eliminando materia extraña, impurezas, hojas secas y en estado de descomposición para evitar una posible contaminación.

Se cortó el material en partes pequeñas con la finalidad de lograr una mejor superficie de contacto de forma que el vapor atraviese con mayor facilidad la material vegetal.

### 3.1.3. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

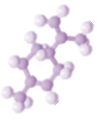
El aceite esencial de *B. obtusifolia* fue extraído de las partes aéreas de la materia vegetal en estado fresco por el método de destilación por arrastre con vapor durante 4 horas. El tiempo de destilación y el estado en el que se destiló el material se determinó en base a ensayos preliminares.

La extracción del aceite se efectuó en un destilador (Fotografía 11) que consta de un tanque de acero inoxidable en el que se colocó aproximadamente 18 litros de agua con el material vegetal troceado sobre una placa perforada. Al tapar el tanque de extracción se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante así como el sello de agua en los bordes del destilador; el recipiente se expuso a una fuente de calor ubicada en la parte inferior de tal forma que el vapor de agua generado, circule a través de la material vegetal y al salir del cuello del cisne se enfríe en el condensador en donde pasa al estado líquido, este líquido es recibido en un florentino en el cual se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades.

Fotografía 11. Destilador.



Fuente: Laboratorio de Ingeniería de Procesos.



Se destilaron nueve muestras, cada muestra previamente se pesó y se separó aproximadamente 5 gramos de la materia vegetal para la determinación de la humedad (ver anexo 1); el porcentaje de humedad relativa de cada recolección se obtuvo del promedio del porcentaje de humedad del material vegetal utilizado en cada destilación. El rendimiento (ver anexo 2) se determinó para cada destilación de modo que se reportó el promedio del porcentaje de rendimiento por cada recolección.

### 3.1.4. RECOLECCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

Una vez obtenido el aceite, se midió, se registró el volumen y se procedió a su respectivo envasado.

### 3.1.5. ENVASADO Y ALMACENAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL.

El aceite esencial extraído, se trasvaso a frascos de vidrio color ámbar con la finalidad de protegerlo de la luz; una vez envasado el aceite se cerraron herméticamente y se etiquetaron (Figura 5) para posteriormente ser almacenados en refrigeración a 4 °C para su conservación.

Figura 5. Envasado y etiquetado



Elaboración: Jandry Rosales.

En el código asignado a cada aceite se hizo constar las iniciales de la especie vegetal, el número de zona en la cual se recolectó el material, el número de recolección y el número de destilación.



## 3.2. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS.

### 3.2.1. DENSIDAD.

La determinación de la densidad relativa de los aceites esenciales se realizó a la temperatura de 20 °C aplicando la norma AFNOR NF T 75-111 (ver anexo 3), para ello se empleó como principales materiales: un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un baño termostático.

La densidad se obtuvo de la mezcla de los aceites de las tres destilaciones realizadas por cada recolección, para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

### 3.2.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

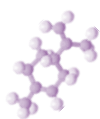
El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del aceite esencial, manteniendo la temperatura constante. La temperatura de referencia es de 20 °C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura<sup>48</sup>. El índice de refracción de los aceites esenciales se determinó según la norma AFNOR NF T 75-112 (ver anexo 4), empleando un refractómetro ABBE (Fotografía 12).

**Fotografía 12.** Refractómetro ABBE.



**Fuente:** Laboratorio del Departamento de Química.

<sup>48</sup> Norma AFNOR NF T 75-112



Los valores del índice de refracción que se reportan por cada recolección son resultado del promedio de los valores calculados de los aceites de las tres destilaciones realizadas en cada recolección, calculando finalmente el promedio general, la desviación estándar y coeficiente de variación.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL.**

#### **3.3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

La cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas cromatográficas, disponibles para analizar compuestos que tienen un nivel suficiente de volatilidad.

La composición química del aceite esencial de *B. obtusifolia* se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y al detector de ionización de llama (FID) con la fin de llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente.

#### **3.3.2. ANÁLISIS DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y AL DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA.**

Los análisis químicos se realizaron en el cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert; el equipo dispone de un sistema de datos “software MSD-Chemstation D.01.00 SP1” y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrógeno “Gas Generator 9150 Packard” (Fotografía 13).

**Fotografía 13.** Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N.



**Fuente:** Laboratorio del Departamento de Química.





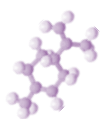
Para los análisis cromatográficos se emplearon dos columnas capilares: una no polar DB-5MS y una polar HP-INNOWAX de 30 m\*0.25 mm\*0.25  $\mu\text{m}$ , recubiertas internamente, la columna no polar de 5% - Fenilmetilpolisiloxano y la columna polar de Polietilenglicol. La temperatura límite para la columna DB-5MS fue de 325  $^{\circ}\text{C}$  y para HP-INNOWAX fue 260 $^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

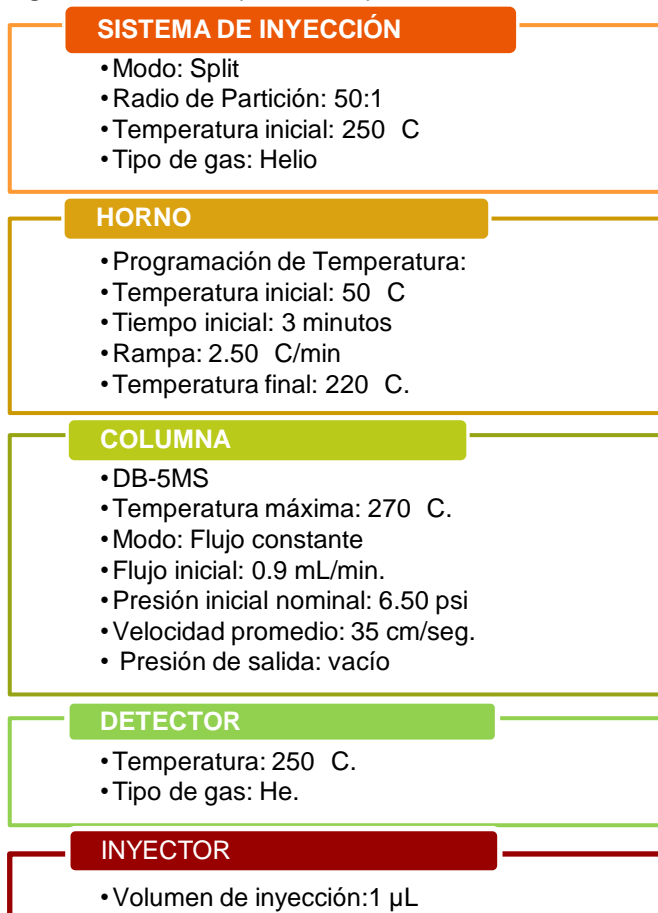
Cada muestra de análisis se preparó en un vial de cromatografía en el cual se colocó 990  $\mu\text{L}$  de diclorometano y 10  $\mu\text{L}$  del aceite, obteniéndose una disolución al 1% de aceite esencial. Antes de inyectar las muestras se lavó la jeringa con diclorometano con la finalidad de lavar las trazas de la muestra anterior.

### **3.3.2.2. CORRIDA CROMATOGRÁFICA EN LA COLUMNA DB-5MS ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Se cromatografiaron una mezcla de hidrocarburos de  $\text{C}_{10}$  (decano) a  $\text{C}_{25}$  (pentacosano), conocidos en el mercado como TPH-6RPM de CHEM SERVICE empleando las condiciones operacionales descritas en la figura 6.



**Figura 6.** Condiciones operacionales para CG-MS en la columna DB-5MS.



Elaboración: Jandry Rosales.

Se inyectó las nueve muestras de aceite esencial bajo los mismos parámetros operacionales que se inyectaron los hidrocarburos.

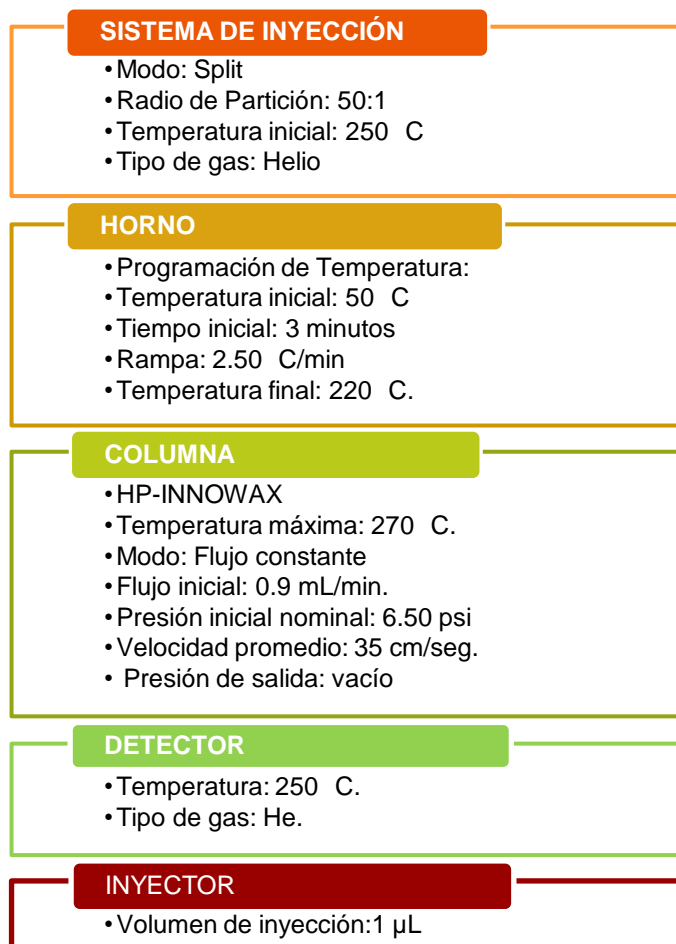
### 3.3.2.3. CORRIDA CROMATOGRÁFICA EN LA COLUMNA HP-INNOWAX ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Las condiciones operacionales bajo las cuales se inyectó la mezcla de hidrocarburos en esta corrida se exponen en la figura 7.

Junto con los hidrocarburos se cromatografió las nueve muestras de aceite esencial, empleando los parámetros descritos en la siguiente figura.



**Figura 7.** Condiciones operacionales para CG-MS en la columna HP-INNOWAX.



Elaboración: Jandry Rosales.

### 3.3.2.4. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL.

El análisis de un aceite esencial usualmente comprende la separación, la identificación y cuantificación de sus componentes<sup>49</sup>.

Como resultado de la corrida cromatográfica, los compuestos se visualizaron en un cromatograma el cual se define como una representación gráfica de la señal producida por el detector en función del tiempo o del volumen de elución. La identificación de los componentes de la muestra se lleva a cabo a partir de la posición de los distintos picos respecto al eje del tiempo mientras que el área de cada uno, proporcional a la concentración del compuesto, permite el análisis cuantitativo<sup>50</sup>.

<sup>49</sup> Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bichi, C. (2010). Essential oils and volátiles: simple preparation and analysis. A review. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 25, págs.282-290.

<sup>50</sup> Guiteras, J.; Rubio, R.; Fonrodona, G. (2007). Curso Experimental en Química Analítica. Editorial Síntesis, S.A. Impreso en España. Págs.72-73.



Para una identificación mucho más confiable se integraron los compuestos, esta integración se realizó a través del sistema de integración (Chemstation Integrator-autoint1.e) propio del software del equipo para luego trabajar con los picos integrados.

Ya obtenidos los cromatogramas se determinaron los índices de Kovats de los picos detectados. A partir del tiempo de retención de cada compuesto se calculó el índice de retención o índice de Kovats (IK) el cual se define como la medición de la retención de un soluto en relación con la retención de los alcanos normales (hidrocarburos de cadena lineal) a una temperatura determinada<sup>6</sup>.

Los índices de Kovats experimentales se calcularon por comparación de los tiempos de retención de los hidrocarburos (C<sub>10</sub>-C<sub>25</sub>) con relación al tiempo de retención de los compuestos aplicando la siguiente fórmula:

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

Donde:

**IK:** Índice de retención de Kovats;

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

**t<sub>RX</sub>:** Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n- alcanos;

**t<sub>Rn</sub>:** Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado;

**t<sub>RN</sub>:** Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo en base a los IK determinados experimentalmente para la corrida cromatográfica en la columna polar y en la apolar, valores que se compararon con los reportados por Adams<sup>51</sup> o en bases de datos electrónicas como Pherobase, Nist (*National Institute of Standards and Technology*)<sup>52</sup>; de modo que la diferencia entre el IK calculado y el leído debe ser menor a 50 unidades.

Cada compuesto presenta un espectro de masas característico el cual proporciona información estructural sobre la molécula analizada. Los espectros de masas de cada componente son analizados por la base de datos del equipo para compararse con la

---

<sup>6</sup> Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. © Agilent Technologies, Inc. 2010. Impreso en EE.UU.

<sup>51</sup> Adams, R. (2009). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> edition. Allured Business Media.

<sup>52</sup> NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director. "Retention Indices" en NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>

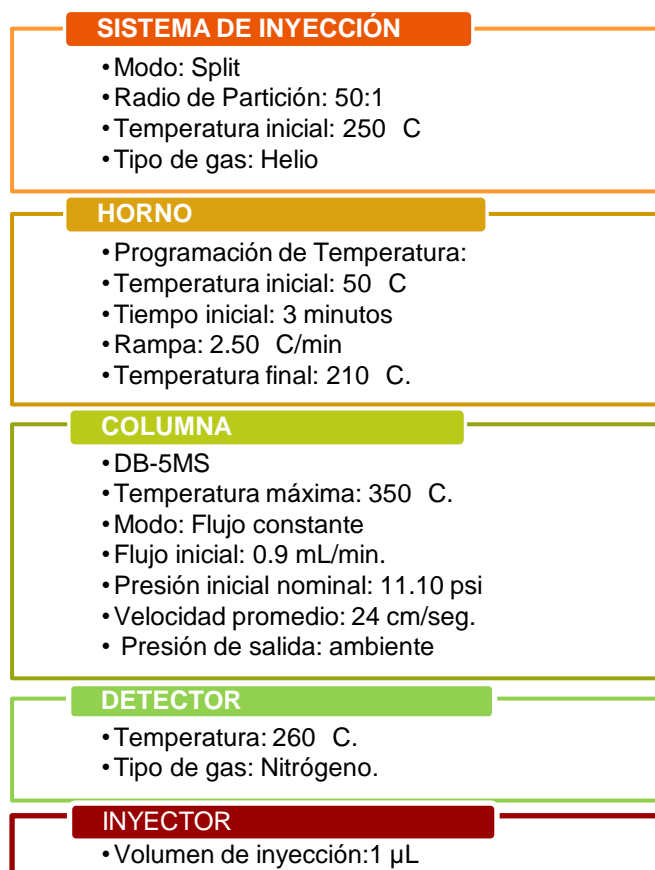


colección de espectros de la librería Wiley 7n.1.; de la serie de opciones que ofrece el sistema se seleccionó los que tuvieron un grado de correspondencia mayor al 90% cada componente presenta su número de CAS, de tal forma que se facilita y es posible la búsqueda e identificación en bases de datos disponibles para obtener los IK de los compuestos.

### 3.3.2.5. CORRIDA CROMATOGRÁFICA EN LA COLUMNA DB-5MS ACOPLADO AL DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID).

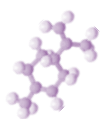
En esta corrida cromatográfica se inyectó hidrocarburos y tres muestras del aceite de *B. obtusifolia*, cada una de las muestras correspondió a la mezcla de los aceites obtenidos por cada recolección. Las condiciones operacionales bajo las cuales se inyectaron los hidrocarburos y las muestras son expuestas en la figura 8.

**Figura 8.** Condiciones operacionales para CG-FID en la columna DB-5MS.



E  
E

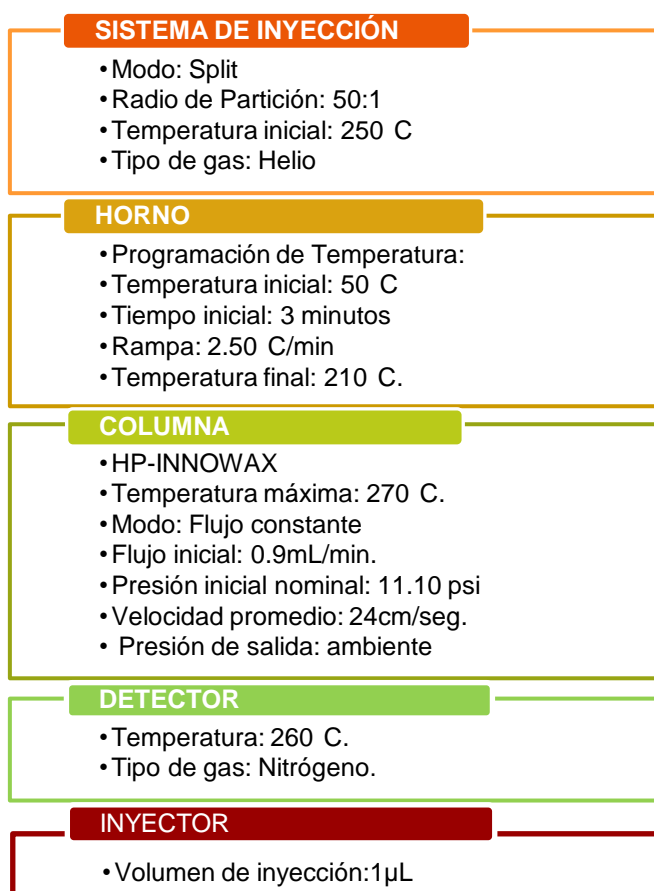
Elaboración: Jandry Rosales.



### 3.3.2.6. CORRIDA CROMATOGRÁFICA EN LA COLUMNA HP-INNOWAX ACOPLADO AL DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID).

En la corrida cromatográfica se inyectaron los hidrocarburos y las nueve muestras de aceite esencial de *B. obtusifolia*. En la figura 9., se indican los parámetros operacionales.

Figura 9. Condiciones operacionales para CG-FID en la columna HP-INNOWAX.



Elaboración: Jandry Rosales.

### 3.3.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS POR GC-FID.

La cantidad relativa de los compuestos volátiles expresada como porcentaje corresponde al área de cada pico detectado en FID así como el tiempo de retención de cada compuesto el cual se ajustó al tiempo de retención de los compuestos detectados en masas a través de la ecuación que resulta de la gráfica que relaciona los tiempos de retención de los hidrocarburos en FID y en masas.



### **3.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

#### **3.4.1. CEPAS BACTERIANAS Y FÚNGICAS**

En la prueba antibacteriana se emplearon 7 cepas bacterianas ATCC (American Type Culture Collection): 2 Gram Positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y 5 Gram Negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2.

En la prueba antifúngica se emplearon 2 cepas de hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

#### **3.4.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *B. obtusifolia* se determinó la C.M.I. (Concentración Mínima Inhibitoria) empleando el método de microdilución en caldo.

##### **3.4.2.1. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO**

###### **3.4.2.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

Se preparó una solución de aceite, para lo cual se tomó 980  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetil sulfóxido) y 20  $\mu\text{L}$  del aceite esencial.

###### **3.4.2.1.2. PREPARACIÓN DEL CULTIVO MICROBIANO “CULTIVO OVERNIGHT”.**

Para la siembra se transfirió 30  $\mu\text{L}$  de cada cepa bacteriana, almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una reserva criogénica, a caldos de cultivo específicos para el crecimiento de cada bacteria de acuerdo a las condiciones detalladas en la tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones de crecimiento de las bacterias utilizadas.

BACTERIAS	MEDIO DE CRECIMIENTO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37 °C por 14-16 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Trypticasa Soya	37 °C por 14-16 h
<i>Proteus vulgaris</i>	Caldo Mueller Hinton	37 °C por 14-16 h
<i>Salmonella tiphymurium</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 h

Fuente: American Type Culture

Collection.

### 3.4.2.1.3. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO.

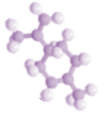
Del cultivo microbiano (overnight) incubado durante la noche, se transfirió 150-300  $\mu\text{L}$  a un tubo que contenía 7 mL de suero fisiológico estéril ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland; para llevar a cabo adecuadamente este paso, se comparó visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0,5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste.

De la suspensión en solución salina se tomó 140  $\mu\text{L}$  y se inoculó en 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  UFC/mL. De la suspensión resultante se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , de forma que en cada pocillo la concentración final fue de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### 3.4.2.1.4. PROCEDIMIENTO

La prueba se realizó en microplacas que contienen 96 pocillos (Figura 9.) empleando el procedimiento de dilución doble seriada: se transfirió 180  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton a cada pocillo de la primera fila, seguido se colocó 100  $\mu\text{L}$  a los pocillos restantes, posteriormente se transfirió 20  $\mu\text{L}$  de la solución de aceite diluido a cada pocillo de la primera fila excepto los últimos pocillos, los cuales se utilizaron como control positivo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  de Gentamicina de 1 mg/mL para todas las bacterias utilizadas a excepción de *Enterococcus faecalis* para la cual se empleó Ampicilina de 8 mg/mL) y negativo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  DMSO), de manera que para cada aceite evaluado se



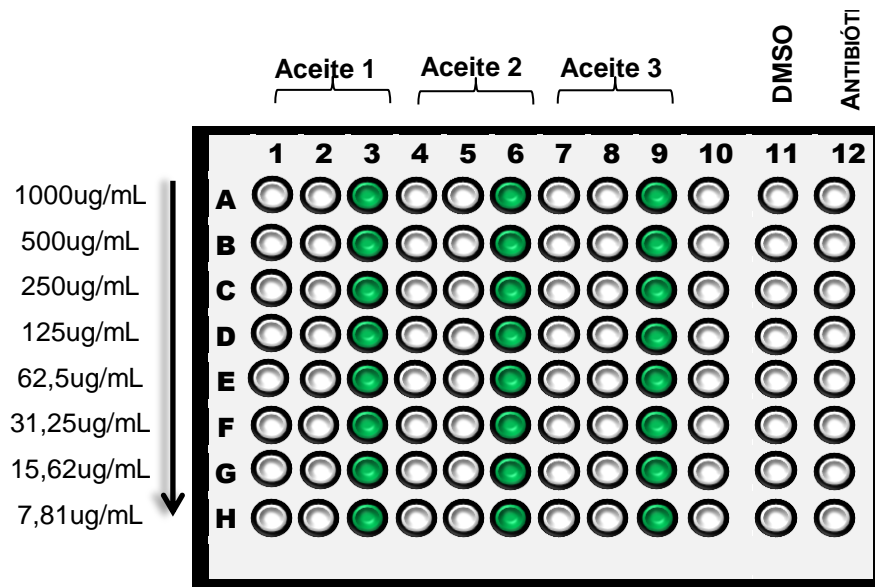


sembró por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180  $\mu$ L caldo + 20  $\mu$ L aceite diluido).

Se mezcló el medio con el aceite y se procedió a realizar diluciones seriadas; se pipeteó de 15 a 20 veces la solución del primer pocillo del cual luego se tomó 100  $\mu$ L y se diluyó con 100  $\mu$ L del pocillo siguiente, se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas (Figura 10), así la concentración final de la solución de aceite fue de 1000 a 7,81  $\mu$ L. El mismo procedimiento fue aplicado para los controles: positivo, negativo y de esterilidad.

Finalmente ya preparada la placa de microdilución se inoculó con 100  $\mu$ L de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos excepto en los controles de esterilidad; completando así un volumen final de 200  $\mu$ L, ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a 37 °C de 18-24 h.

**Figura 10.** Modelo de Microplaca TC96 para bacterias con las concentraciones del aceite ( $\mu$ g/mL)



Elaboración: Jandry Rosales.



### **3.4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

#### **3.4.3.1. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO**

##### **3.4.3.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

Al igual que lo descrito para las pruebas bacterianas en el numeral 3.4.2.1.1, se preparó una solución de aceite diluido, tomando 980  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetil sulfóxido) y 20  $\mu\text{L}$  del aceite esencial.

##### **3.4.3.1.2. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE LOS INÓCULOS FÚNGICOS.**

De los hongos esporulados utilizados en la prueba: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, almacenados en una reserva criogénica a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se tomó 49  $\mu\text{L}$  y 68  $\mu\text{L}$  respectivamente, cada volumen se transfirió a tubos que contenían 7 mL de caldo de Sabouraud.

##### **3.4.3.1.3. PROCEDIMIENTO.**

Se empleó el mismo procedimiento de dilución seriada utilizado para las bacterias, diferenciándose en la concentración final del inóculo, en hongos esporulados es  $5 \times 10^4$  esporas/mL; la concentración final de aceite va de 1000 a 0,48  $\mu\text{g/mL}$ , las diluciones se realizan hasta obtener 12 diluciones consecutivas (Figura 11), y al final se colocaron los 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del inóculo fúngico.

Cada aceite evaluado se siembra por duplicado con su respectivo control de esterilidad (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  aceite diluido), existe un control positivo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  de Itraconazol de 1 mg/mL), un control negativo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  DMSO). Se incuban las placas a  $28^{\circ}\text{C}$  y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

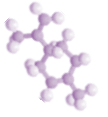
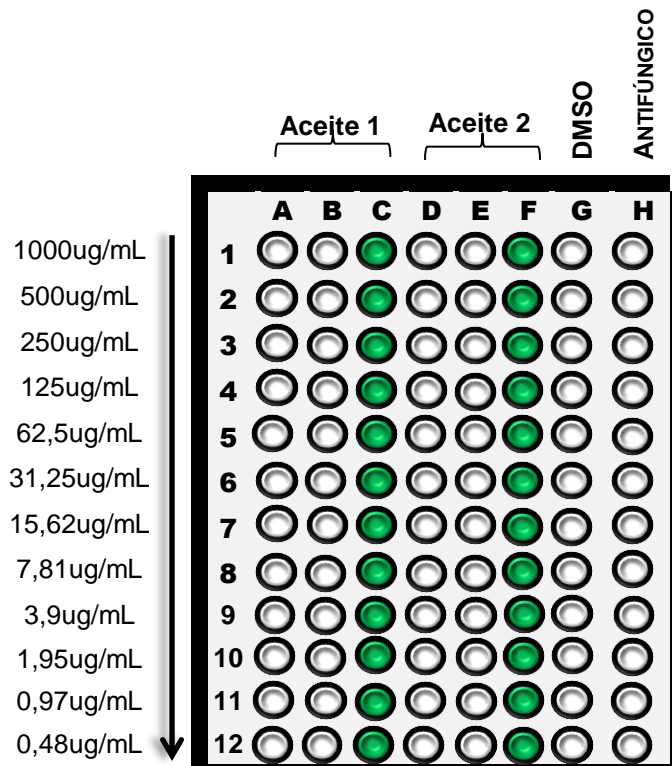


Figura 11. Modelo de Microplaca TC96 para hongos con las concentraciones del aceite ( $\mu\text{g/mL}$ ).



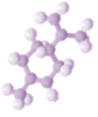
Elaboración: Jandry Rosales.

● Control de Esterilidad

#### 3.4.4. LECTURA DE LAS PLACAS DE C.M.I. E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Una vez retiradas las placas de C.M.I., de la incubadora, se examinó el control de esterilidad utilizando luz reflejada y luz transmitida ya que a veces la contaminación suele ser casi imperceptible, en caso de que la placa de control de pureza se muestre contaminada, la prueba de C.M.I. no puede ser interpretada y debe ser repetida.

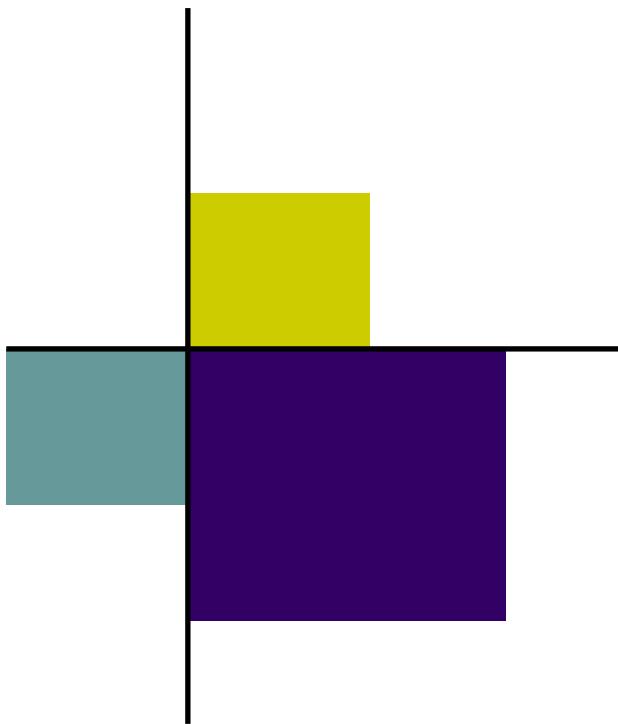
Se debe revisar el crecimiento en la celdilla de control positivo el cual se presentara como turbidez o un punto de crecimiento  $> 2 \text{ mm}$  lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de C.M.I. Luego se debe revisar el pozo de control negativo el mismo que debe estar claro y sin turbidez.



Se lee el punto final C.M.I. como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.<sup>53</sup>

---

<sup>53</sup> Cavalieri, S.; Harbeck, R.; McCarter, Y.; Ortez, J.; Rankin, I.; Sautter, R.; Sharp, S.; Spiegel, C. Manual de Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology, Organización Panamericana de la salud. Págs. 57. Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/05.pdf>



# **CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 HUMEDAD.

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se expone en la tabla 2. En dicha tabla se presenta el valor de la media de cada uno de los porcentajes de humedad del material vegetal por recolección con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 2.** Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

Recolecciones	Bo1	Bo2	Bo3
<b>Humedad relativa (%)</b>	46,25±2,43	60,24±0,34	64,19±3,21
<i>X</i>	56,89		
$\sigma$	9,43		
<b>C.V.</b>	0,17		

**Fuente:** Investigación Experimental.

**Elaboración:** Jandry Rosales.

Bo1: Primera recolección. Bo2: Segunda recolección. Bo3: Tercera recolección.

*X* : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones.

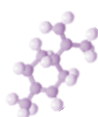
$\sigma$  :Desviación estándar

C.V.: Coeficiente de variación

Los porcentajes de humedad de la materia vegetal varían en las diferentes recolecciones. Es importante destacar que factores ambientales como la humedad atmosférica alteran la capacidad de las plantas para controlar la pérdida de agua<sup>54</sup> muestra de ello es la disminución de la transpiración al existir un aumento de la humedad atmosférica,<sup>55</sup> es decir cuando la atmosfera contiene más humedad se reduce la fuerza motriz para la transpiración; no obstante cuando existe una mayor humedad en la atmosfera se da una mayor fuerza motriz para la transpiración.<sup>54</sup> Como se mencionó los cambios en el ambiente influyen en la humedad de las plantas considerando que los vientos fuertes, clima frío y lluvias esporádicas son características de zonas altas como Loma del Oro.

<sup>54</sup> Plant & Soil Sciences eLibrary<sup>PRO</sup>. La Transpiración-movimiento del agua a través de las plantas Disponible en: <http://passel.unl.edu> Consultado el 12 de noviembre del 2012.

<sup>55</sup> Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B.; Sánchez, R. (2007). Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide. Impreso en España.



## 4.2. RENDIMIENTO.

El rendimiento del proceso de extracción del aceite esencial de *B. obtusifolia* se detalla en la tabla 3, el porcentaje de rendimiento medio para cada recolección resulta de la media de las tres repeticiones. Se expone un promedio general junto la desviación estándar y coeficiente de variación.

**Tabla 3.** Rendimiento en % (v/p) de la materia vegetal.

Recolecciones	Bo1	Bo2	Bo3
Rendimiento (%)	0,24±0,03	0,20±0,02	0,16±0,04
$\bar{X}$	0,20		
$\sigma$	0,04		
C.V.	0,2		

Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

De los porcentajes de rendimiento expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto 0,24% se obtuvo a partir de 3 kg de materia vegetal con un volumen de 7,3 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,16% a partir de 1,5 Kg con 2,4 mL de aceite.

Según la categorización propuesta por el organismo de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED Argentina), los valores de rendimiento menores a 5 mL/kg los considera bajos, valores entre 5 mL/kg y 10 mL/kg intermedios, y valores superiores a 10 mL/kg altos,<sup>13</sup> de acuerdo a esta clasificación el porcentaje de rendimiento de *B. obtusifolia* es bajo. La determinación del rendimiento es particularmente utilizada como un criterio más para la selección de especies aromáticas potencialmente comercializables, sin embargo la misma debe analizarse en conjunto con otras características del aceite esencial, como la originalidad del aroma, composición química y efectos farmacológicos.<sup>13</sup>

## 4.3. PROPIEDADES FÍSICAS.

Entre las características físicas determinadas para el aceite esencial de *B. obtusifolia* tenemos su densidad e índice de refracción.

<sup>13</sup> Molares, S.; González, S.; Ladio, A.; Castro, M. (2009). Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. Et Arn. (Asteraceae: Astereae). Acta Botánica Brasílica. Volumen 23. N° 2. págs. 578-589.



#### 4.3.1. DENSIDAD DEL ACEITE ESENCIAL.

La densidad reportada en la tabla 4 para los aceites de la primera, segunda y tercera recolección corresponde a la mezcla de los aceites obtenidos en las tres destilaciones por recolección.

**Tabla 4.** Densidad media del aceite esencial a 20°C.

Recolecciones	Bo1	Bo2	Bo3
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	0,8752	0,8686	0,8787
$\bar{X}$	0,8742		
$\sigma$	0,0051		
C.V.	0,0059		

Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

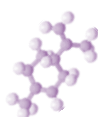
La densidad promedio del aceite esencial de *B. obtusifolia* fue de 0,8742. La mayoría de los aceites esenciales al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos tienen una densidad menor que la del agua (densidad menor que 1g/cm<sup>3</sup>), situación que se aplica al aceite analizado. La densidad es un parámetro fácil de obtener y permite distinguir un aceite esencial auténtico de esencias sintéticas comunes<sup>56</sup>.

#### 4.3.2. INDICE DE REFRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

En la tabla 5., se expone el promedio general del índice de refracción que fue calculado a partir del índice de refracción de las tres muestras de aceite obtenidas por cada recolección.

<sup>56</sup> Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. Aiyana ediciones. Impreso en España. Págs. 99.



**Tabla 5.** Promedio de los Índices de Refracción de los aceite esenciales.

Recolecciones	Bo1	Bo2	Bo3
Índice de refracción	1,4852±0,00	1,4831±0,00	1,4877±0,00
$X$	1,4853		
$\sigma$	0,002		
C.V.	0,001		

Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

El promedio general de los índices de refracción de las muestras de aceite esencial fue 1,4853. Este parámetro es característico de cada aceite y que cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias<sup>56</sup>.

#### 4.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *B. obtusifolia*.

##### 4.4.1. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO.

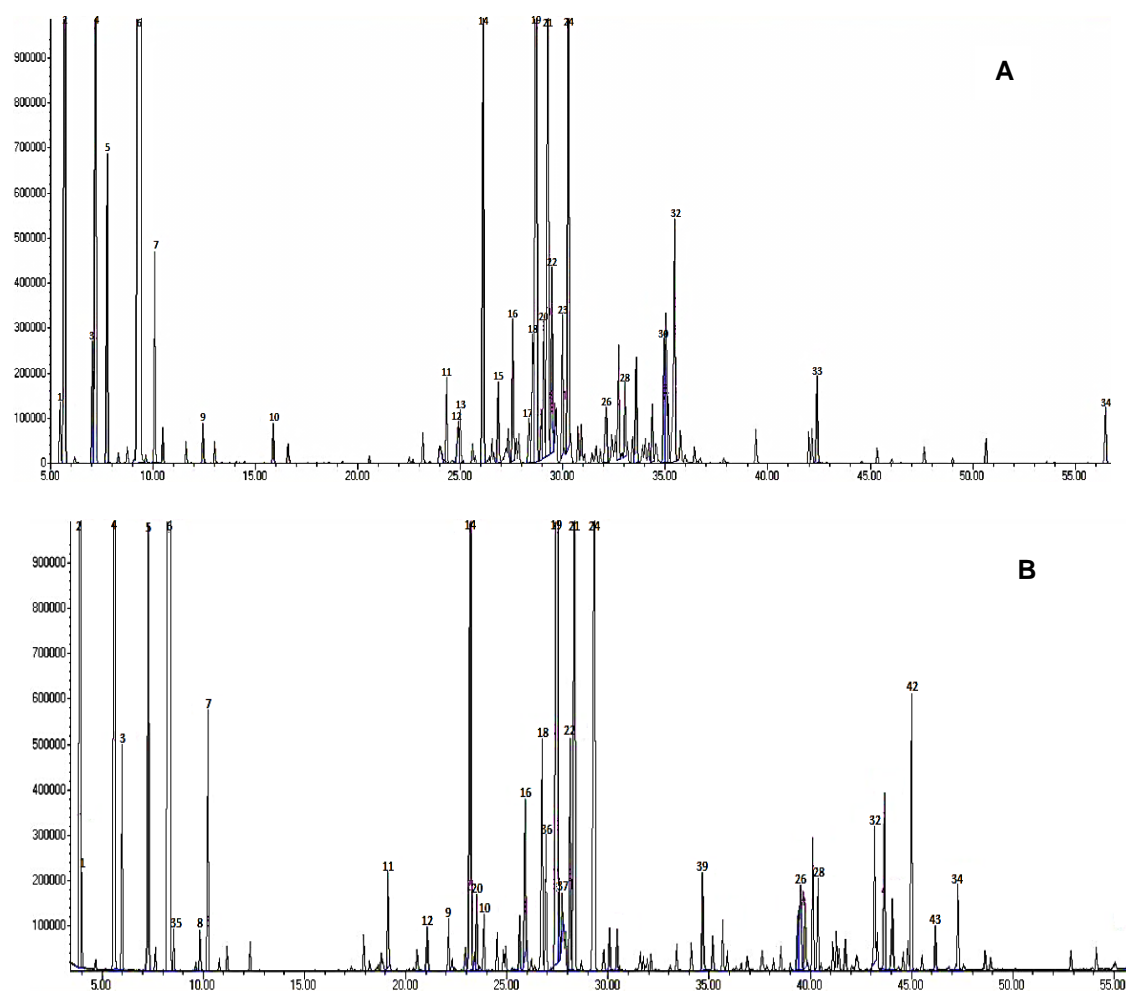
La composición química del aceite esencial de *B. obtusifolia* extraído por destilación por arrastre con vapor fue analizada por CG-MS y CG-FID, obteniéndose los respectivos cromatogramas para posteriormente ser identificados y cuantificados los componentes químicos presentes en el aceite esencial estudiado.

En la figura 12., se observan los perfiles cromatográficos del aceite esencial de *B. obtusifolia* obtenidos en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX mediante la técnica de CG-MS acorde a los parámetros operacionales descritos en la metodología.

<sup>56</sup> Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. Aiyana ediciones. Impreso en España. Págs. 99.



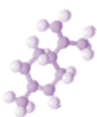
**Figura 12.** Cromatogramas del aceite esencial de *B. obtusifolia* obtenidos en las columnas DB-5MS (A) y HP-INNOWAX (B).



**Fuente:** Investigación Experimental.  
**Elaboración:** Jandry Rosales.

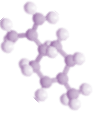
Cada pico cromatográfico representa un compuesto de área proporcional a su concentración. Los cromatogramas obtenidos presentan un sinnúmero de picos muy próximos resultando en cierta forma compleja la identificación en su totalidad, de modo que para una identificación mucho más fiable de los compuestos presentes en las muestras se integraron los picos cromatográficos. En los cromatogramas (ver figura 12.), se observan los picos integrados considerados para su identificación.

En el análisis cualitativo, la identificación de los componentes volátiles se la realizó comparando los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en las dos columnas (apolar y polar) para los compuestos analizados frente a los IK reportados en la literatura. Los índices de retención experimentales se determinaron en relación a



la serie homóloga de alcanos ( $C_{10}$  a  $C_{25}$ ). A su vez cada compuesto detectado posee su respectivo espectro de masas el cual fue comparado con los espectros que proporciona la base de datos del equipo (biblioteca Wiley 7n.1; (2003)), con un porcentaje de coincidencia mayor al 90%. Los criterios para la identificación de los componentes químicos expuestos brevemente se explican en el capítulo de materiales y métodos, sección 3.3.2.4.

En la tabla 6, se detallan los compuestos químicos identificados del aceite esencial de *B. obtusifolia*; los mismos que están organizados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS, resaltando los compuestos que presentan mayores áreas. Cada compuesto presenta su respectivo índice de Kovats calculado y el índice reportado en la literatura; junto a la cantidad relativa que corresponde al porcentaje de participación de cada compuesto para la primera (Bo1), segunda (Bo2) y tercera recolección (Bo3) se reporta el área promedio por compuesto, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El porcentaje de cantidad relativa de los compuestos, reportada por cada recolección es el resultado del promedio de las áreas de cada compuesto identificado en los aceites obtenidos de las tres destilaciones realizadas por recolección. Los compuestos químicos identificados se han agrupado en monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos oxigenados y en otros compuestos.

Tabla 6. Composición química del aceite esencial de *B. obtusifolia*.

PICO	COMPUESTOS	DB-5MS								HP-INNOWAX							
		IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	% DE CANTIDAD RELATIVA						IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	% DE CANTIDAD RELATIVA					
				Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.			Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.
1	α-thujene	866	905 <sup>a</sup>	0,54	0,68	0,43	0,55	0,13	0,23	1023	1029 <sup>v</sup>	0,59	0,72	0,40	0,57	0,16	0,28
2	α-pinene	873	907 <sup>b</sup>	9,49	10,61	6,97	9,02	1,86	0,21	1019	1027 <sup>w</sup>	9,66	10,81	7,44	9,30	1,71	0,18
3	Sabinene	924	953 <sup>c</sup>	1,04	1,14	0,99	1,06	0,08	0,07	1118	1134 <sup>g</sup>	1,06	1,17	1,04	1,09	0,07	0,06
4	β-pinene	936	949 <sup>d</sup>	8,05	9,26	7,36	8,22	0,96	0,12	1105	1113 <sup>w</sup>	8,58	9,96	8,22	8,92	0,92	0,10
5	Myrcene	973	969 <sup>e</sup>	2,15	2,46	2,01	2,21	0,23	0,10	1162	1168 <sup>g</sup>	2,46	2,79	2,28	2,51	0,26	0,10
6	Limonene	1029	1029 <sup>f</sup>	26,83	29,29	28,68	28,27	1,28	0,05	1198	1203 <sup>x</sup>	27,28	30,45	30,84	29,52	1,95	0,07
7	(E)-β-ocimene	1045	1043 <sup>g</sup>	1,25	1,39	1,15	1,26	0,12	0,10	1250	1250 <sup>v</sup>	1,30	1,50	1,11	1,30	0,20	0,15
8	γ-terpinene	1054	1059 <sup>f</sup>	.....	0,30	.....	.....	.....	.....	1240	1255 <sup>v</sup>	.....	0,29	.....	.....	.....	.....
9	Linalool	1100	1096 <sup>f</sup>	0,29	.....	.....	.....	.....	.....	1554	1554 <sup>g</sup>	0,31	0,33	.....	0,32	0,01	0,04
10	Terpinen-4-ol	1175	1177 <sup>f</sup>	0,31	0,38	.....	0,35	0,05	0,14	1599	1593 <sup>w</sup>	0,36	0,40	.....	0,38	0,03	0,07
11	α-cubebene	1366	1363 <sup>h</sup>	0,66	0,60	0,61	0,62	0,03	0,05	1478	1480 <sup>z</sup>	0,57	0,49	0,54	0,53	0,04	0,08
12	β-cubebene	1379	1381 <sup>i</sup>	0,43	.....	0,57	0,50	0,10	0,20	1527	1519 <sup>ab</sup>	0,33	.....	0,41	0,37	0,06	0,15
13	β-elemene	1382	1382 <sup>j</sup>	0,46	.....	0,41	0,44	0,04	0,08	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
14	β-caryophyllene	1408	1408 <sup>k</sup>	5,02	3,35	3,53	3,97	0,92	0,23	1581	1608 <sup>g</sup>	5,33	3,56	3,80	4,23	0,96	0,23
15	Alloaromadendrene	1426	1427 <sup>l</sup>	0,73	0,54	0,50	0,59	0,12	0,21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
16	α-humulene	1443	1443 <sup>l</sup>	1,20	0,92	1,01	1,04	0,14	0,14	1652	1680 <sup>g</sup>	0,98	0,71	0,94	0,88	0,15	0,17
17	Epizonarene	1463	1495 <sup>l</sup>	0,52	0,48	.....	0,50	0,03	0,06	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
18	γ-murolene	1467	1467 <sup>ll</sup>	1,45	1,21	1,14	1,27	0,16	0,13	1675	1684 <sup>g</sup>	1,85	1,46	1,42	1,58	0,24	0,15
19	Germacrene-D	1472	1472 <sup>l</sup>	10,95	8,05	10,26	9,75	1,51	0,16	1694	1722 <sup>g</sup>	10,19	7,53	9,64	9,12	1,40	0,15
20	Aromadendrene	1480	1447 <sup>m</sup>	1,41	1,08	1,02	1,17	0,21	0,18	1589	1628 <sup>x</sup>	0,51	0,37	.....	0,44	0,10	0,22
21	Bicyclogermacrene	1485	1488 <sup>n</sup>	6,75	5,16	6,67	6,19	0,90	0,14	1718	1755 <sup>x</sup>	5,83	4,46	5,48	5,26	0,71	0,14
22	α-murolene	1490	1490 <sup>n</sup>	1,54	1,56	1,75	1,62	0,12	0,07	1712	1727 <sup>ac</sup>	1,52	1,47	1,56	1,52	0,05	0,03
23	γ-cadinene	1502	1502 <sup>o</sup>	1,13	1,52	1,51	1,39	0,22	0,16	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
24	δ-cadinene	1510	1510 <sup>o</sup>	5,58	6,19	5,42	5,73	0,41	0,07	1745	1770 <sup>ad</sup>	7,01	7,20	6,69	6,97	0,26	0,04
25	Elemol	1540	1549 <sup>t</sup>	.....	0,54	0,46	0,50	0,06	0,11	2076	2078 <sup>ac</sup>	.....	0,51	0,41	0,46	0,07	0,15
26	Nerolidol	1558	1550 <sup>p</sup>	0,79	0,69	0,81	0,76	0,06	0,08	2044	2054 <sup>g</sup>	0,99	0,93	0,99	0,97	0,03	0,04
27	Spathulenol	1565	1565 <sup>a</sup>	.....	.....	1,74	.....	.....	.....	2114	2129 <sup>g</sup>	.....	.....	1,16	.....	.....	.....

Continúa en la siguiente página



PICO	COMPUESTOS	DB-5MS								HP-INNOWAX							
		IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	% DE CANTIDAD RELATIVA						IK <sup>cal</sup>	IK <sup>ref</sup>	% DE CANTIDAD RELATIVA					
				Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.			Bo1	Bo2	Bo3	X	σ	C.V.
28	Viridiflorol	1581	1581 <sup>d</sup>	0,64	0,47	0,47	0,53	0,10	0,19	2071	2102 <sup>g</sup>	0,69	0,45	0,53	0,56	0,12	0,22
29	γ-eudesmol	1620	1618 <sup>f</sup>	.....	0,82	0,82	0,82	0,00	0,00	2159	2182 <sup>ac</sup>	.....	0,57	.....	.....	.....	.....
30	α-cadinol	1632	1630 <sup>s</sup>	1,34	1,46	1,57	1,46	0,12	0,08	2161	2211 <sup>g</sup>	1,05	1,21	1,43	1,23	0,19	0,16
31	α-eudesmol	1643	1645 <sup>t</sup>	.....	.....	1,40	.....	.....	.....	2207	2237 <sup>ac</sup>	.....	0,71	0,62	0,67	0,06	0,10
32	τ-cadinol	1645	1640 <sup>i</sup>	2,82	4,04	3,16	3,34	0,63	0,19	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
33	Phenethylbenzoate	1841	1841 <sup>u</sup>	0,78	0,52	0,77	0,69	0,15	0,21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
34	Tricosane	2300	2300 <sup>i</sup>	0,58	0,41	0,85	0,61	0,22	0,36	2299	2300 <sup>ae</sup>	0,65	0,44	0,96	0,68	0,26	0,38
35	β-phellandrene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1204	1241 <sup>w</sup>	0,19	.....	.....	.....	.....	.....
36	Viridiflorene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1680	1697 <sup>ac</sup>	1,01	0,71	0,57	0,77	0,23	0,29
37	α-amorphene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1701	1691 <sup>ac</sup>	0,22	.....	.....	.....	.....	.....
38	Geranyl acetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1758	1760 <sup>af</sup>	.....	0,64	.....	.....	.....	.....
39	Geranyl butyrate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1897	1872 <sup>ac</sup>	0,74	0,54	0,98	0,75	0,22	0,30
40	Heneicosane	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2099	2100 <sup>ae</sup>	.....	.....	0,31	.....	.....	.....
41	β-eudesmol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2215	2220 <sup>v</sup>	.....	0,78	0,85	0,82	0,05	0,06
42	τ-muurolol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2221	2178 <sup>ag</sup>	2,07	2,25	2,51	2,28	0,22	0,10
43	Farnesyl acetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2261	2283 <sup>g</sup>	0,33	.....	.....	.....	.....	.....
<b>*Total identificado: 94,43</b>										<b>*Total identificado: 94,00</b>							
<b>GRUPOS QUÍMICOS:</b>										<b>GRUPOS QUÍMICOS:</b>							
Monoterpenos Hidrocarbonados (%):50,89 Sesquiterpenos Hidrocarbonados (%):35,18 Monoterpenos Oxigenados (%): 0,64 Sesquiterpenos Oxigenados (%):10,55 Otros Compuestos (%): 1,30										Monoterpenos Hidrocarburos (%):53,69 Sesquiterpenos Hidrocarbonados (%):31,89 Monoterpenos Oxigenados (%):2,09 Sesquiterpenos Oxigenados (%):9,05 Otros Compuestos (%):0,99							

Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5MS.

IK<sup>cal</sup>: índice de Kovats calculado.

IK<sup>ref</sup>: índice de Kovats reportado en la literatura. Ver Referencias (<sup>a</sup> ref. 1; <sup>b</sup> ref. 2; <sup>c</sup> ref. 3; <sup>d</sup> ref. 4; <sup>e</sup> ref. 5; <sup>f</sup> ref. 6; <sup>g</sup> ref. 7; <sup>h</sup> ref. 8; <sup>i</sup> ref. 9; <sup>j</sup> ref. 10; <sup>k</sup> ref. 11; <sup>l</sup> ref. 12; <sup>m</sup> ref. 13; <sup>n</sup> ref. 14; <sup>o</sup> ref. 15; <sup>p</sup> ref. 16; <sup>q</sup> ref. 17; <sup>r</sup> ref. 18; <sup>s</sup> ref. 19; <sup>t</sup> ref. 20; <sup>u</sup> ref. 21; <sup>v</sup> ref. 22; <sup>w</sup> ref. 23; <sup>x</sup> ref. 24; <sup>y</sup> ref. 25; <sup>z</sup> ref. 26; <sup>ab</sup> ref. 27; <sup>ac</sup> ref. 28; <sup>ad</sup> ref. 29; <sup>ae</sup> ref. 30; <sup>af</sup> ref. 31; <sup>ag</sup> ref. 32; <sup>ah</sup> ref. 33; <sup>ai</sup> ref. 34) en Anexo 5.

Bo1: Aceites de la primera recolección. Bo2: Aceites de la segunda recolección. Bo3: Aceites de la tercera recolección.

..... : no detectado.

\*: Sumatoria del % de cantidad relativa de los compuestos identificados en DB-5MS y HP-INNOWAX.



---

El análisis cuantitativo se basó en la comparación del porcentaje de cantidad relativa de los picos de los analitos detectados en FID con el porcentaje de cantidad relativa de los picos de los compuestos identificados en masas, tanto el análisis cualitativo y cuantitativo confirmaron la presencia en el aceite esencial analizado de los compuestos expuestos en la tabla 7, en la cual se presentan los porcentajes de cantidad relativa por recolección, el promedio y la desviación estándar. En la corrida cromatográfica en DB-5MS-FID las muestras analizadas son el resultado de la unión de los aceites obtenidos por recolección mientras que para HP-INNOWAX-FID se cromatografiaron cada una de las nuevas muestras, reportándose el promedio de la cantidad relativa de los compuestos presentes en los aceites obtenidos de las tres destilaciones realizadas por recolección.

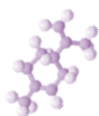
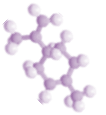


Tabla 7. Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos determinados por CG-MS y CG-FID.

COMPUESTOS	DB-5MS									HP-INNOWAX								
	%CANTIDAD RELATIVA						MASAS	FID		%CANTIDAD RELATIVA						MASAS	FID	
	Bo1		Bo2		Bo3			X	σ	Bo1		Bo2		Bo3			X	σ
	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS			FID	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS	FID		
α-thujene	0,54	0,41	0,68	0,50	0,43	0,26	0,55	0,39	0,12	0,59	0,32	0,72	0,44	0,40	0,21	0,57	0,32	0,12
α-pinene	9,49	8,24	10,61	9,44	6,97	6,03	9,02	7,90	1,73	9,66	6,29	10,81	7,89	7,44	4,49	9,30	6,22	1,70
Sabinene	1,04	0,83	1,14	0,92	0,99	0,83	1,06	0,86	0,05	1,06	0,70	1,17	0,82	1,04	0,67	1,09	0,73	0,08
β-pinene	8,05	7,95	9,26	9,39	7,36	7,51	8,22	8,29	0,98	8,58	6,44	9,96	8,12	8,22	5,90	8,92	6,82	1,16
Myrcene	2,15	2,20	2,46	2,51	2,01	2,01	2,21	2,24	0,25	2,46	1,97	2,79	2,51	2,28	1,80	2,51	2,09	0,37
Limonene	26,83	30,39	29,29	34,39	28,68	34,56	28,27	33,11	2,36	27,28	26,12	30,45	30,84	30,84	28,85	29,52	28,60	2,37
(E)-β-ocimene	1,25	1,06	1,39	1,27	1,15	0,82	1,26	1,05	0,23	1,30	1,02	1,50	1,25	1,11	0,83	1,30	1,03	0,21
γ-terpinene	.....	.....	0,30	0,20	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,29	0,21	.....	.....	.....	.....	.....
Linalool	0,29	0,28	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,31	0,27	0,33	0,30	.....	.....	0,32	0,29	0,02
Terpinen-4-ol	0,31	0,26	0,38	0,30	.....	.....	0,35	0,28	0,03	0,36	0,24	0,40	0,34	.....	.....	0,38	0,29	0,07
α-cubebene	0,66	0,22	0,60	0,52	0,61	0,45	0,62	0,40	0,16	0,57	0,52	0,49	0,47	0,54	0,50	0,53	0,50	0,03
β-cubebene	0,43	0,50	.....	.....	0,57	0,19	0,50	0,35	0,22	0,33	0,29	.....	.....	0,41	0,35	0,37	0,32	0,04
β-elemene	0,46	0,26	.....	.....	0,41	0,51	0,44	0,39	0,18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
β-caryophyllene	5,02	4,52	3,35	2,91	3,53	3,17	3,97	3,53	0,86	5,33	5,04	3,56	3,23	3,80	3,45	4,23	3,91	0,99
Alloaromadrene	0,73	0,51	0,54	0,39	0,50	0,31	0,59	0,40	0,10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
α-humulene	1,20	1,09	0,92	0,84	1,01	0,94	1,04	0,96	0,13	0,98	1,30	0,71	1,00	0,94	1,10	0,88	1,13	0,15
Epizonarene	0,52	0,32	0,48	0,29	.....	.....	0,50	0,31	0,02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
γ-murolene	1,45	1,14	1,21	0,91	1,14	0,91	1,27	0,99	0,13	1,85	1,66	1,46	1,29	1,42	1,24	1,58	1,40	0,23
Germacrene-D	10,95	9,51	8,05	6,92	10,26	8,39	9,75	8,27	1,30	10,19	10,47	7,53	7,31	9,64	9,49	9,12	9,09	1,62
Aromadendrene	1,41	1,82	1,08	1,34	1,02	1,25	1,17	1,47	0,31	0,51	0,48	0,37	0,35	.....	.....	0,44	0,42	0,09
Bicyclogermacrene	6,75	5,68	5,16	4,29	6,67	5,01	6,19	4,99	0,70	5,83	6,07	4,46	4,38	5,48	5,43	5,26	5,29	0,85
α-murolene	1,54	1,31	1,56	1,24	1,75	1,39	1,62	1,31	0,08	1,52	1,41	1,47	1,31	1,56	1,41	1,52	1,38	0,06
γ-cadinene	1,13	1,05	1,52	1,07	1,51	1,24	1,39	1,12	0,10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
δ-cadinene	5,58	4,28	6,19	4,21	5,42	3,82	5,73	4,10	0,25	7,01	6,54	7,20	6,35	6,69	6,07	6,97	6,32	0,24
Elemol	.....	.....	0,54	0,48	0,46	0,37	0,50	0,42	0,08	.....	.....	0,51	0,55	0,41	0,40	0,46	0,48	0,11
Nerolidol	0,79	0,50	0,69	0,36	0,81	0,62	0,76	0,49	0,13	0,99	1,28	0,93	0,97	0,99	1,24	0,97	1,16	0,17
Spathulenol	.....	.....	.....	.....	1,74	1,61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1,16	1,28	.....	.....	.....
Viridiflorol	0,64	0,60	0,47	0,71	0,47	0,32	0,53	0,54	0,20	0,69	0,84	0,45	0,44	0,53	0,51	0,56	0,60	0,21
γ-eudesmol	.....	.....	0,82	1,02	0,82	0,79	0,82	0,91	0,16	.....	.....	0,57	0,33	.....	.....	.....	.....	.....
α-cadinol	1,34	2,01	1,46	1,17	1,57	1,11	1,46	1,43	0,50	1,05	1,41	1,21	1,31	1,43	1,57	1,23	1,43	0,13



COMPUESTOS	DB-5MS									HP-INNOWAX										
	%CANTIDAD RELATIVA						MASAS	FID			%CANTIDAD RELATIVA						MASAS	FID		
	Bo1		Bo2		Bo3			X	X	σ	Bo1		Bo2		Bo3			X	X	σ
	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS				FID	MASAS	FID	MASAS	FID	MASAS	FID			
α-eudesmol	.....	.....	.....	.....	1,40	1,36	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,71	0,70	0,62	0,61	0,67	0,66	0,06	
τ-cadinol	2,82	2,21	4,04	3,26	3,16	3,41	3,34	2,96	0,65	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Phenethylbenzoate	0,78	0,64	0,52	0,43	0,77	0,71	0,69	0,59	0,15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Tricosane	0,58	0,68	0,41	0,48	0,85	1,05	0,61	0,74	0,29	0,65	0,88	0,44	0,66	0,96	1,51	0,68	1,02	0,44		
β-phellandrene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,19	0,14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Viridiflorene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1,01	0,96	0,71	0,64	0,57	0,55	0,77	0,72	0,22		
α-amorphene	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,22	0,37	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Geranyl acetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,64	0,61	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Geranyl butyrate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,74	0,72	0,54	0,54	0,98	0,95	0,75	0,74	0,21		
Heneicosane	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,31	0,44	.....	.....	.....	.....	
β-eudesmol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,78	0,77	0,85	0,86	0,82	0,82	0,06		
τ-muurolol	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	2,07	2,09	2,25	2,00	2,51	2,54	2,28	2,21	0,29		
Farnesyl acetate	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	0,33	0,40	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
							*94,43	*90,79									**94,00	**85,99		

Fuente: Investigación Experimental.

Elaboración: Jandry Rosales.

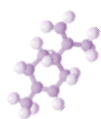
Compuestos según el orden de elución en la columna DB-5MS.

Bo1: Aceites de la primera recolección. Bo2: Aceites de la segunda recolección. Bo3: Aceites de la tercera recolección.

\*: Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna DB-5MS-MASAS y DB-5MS-FID.

\*\*: Sumatoria del % de cantidad relativa en la columna HP-INNOWAX-MASAS y HP-INNOWAX-FID

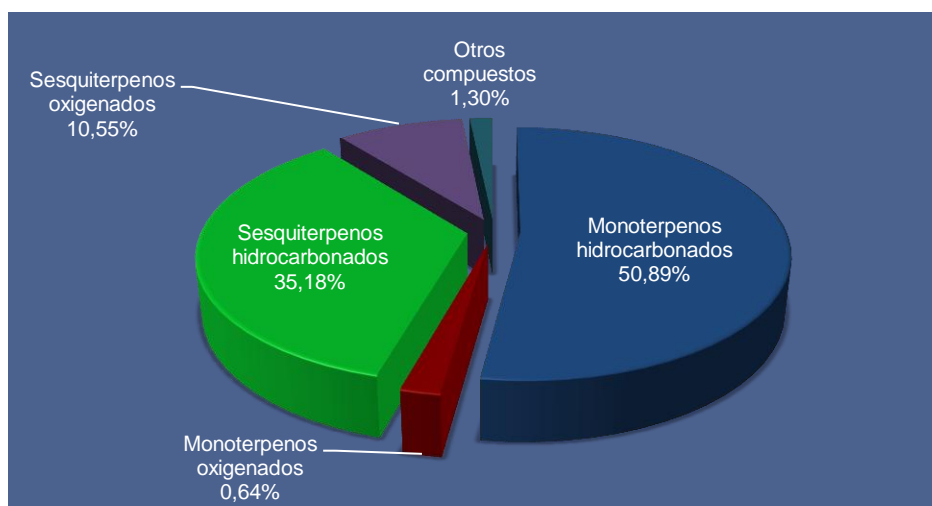




En el aceite esencial extraído por arrastre de vapor de las partes aéreas de *B. obtusifolia* y analizado por CG-MS y CG-FID, se identificaron 43 compuestos, de los cuales 28 compuestos están presentes en ambas columnas; en la columna DB-5MS se identificaron 34 compuestos con un porcentaje de identificación de 94,43% y en la columna HP-INNOWAX se identificaron 37 compuestos que representan el 94,00%.

El aceite esencial analizado está constituido principalmente por terpenos, la mayoría de los cuales son monoterpenos hidrocarbonados que están presentes en un 50,89%, seguido por sesquiterpenos hidrocarbonados que representan el 35,18%, monoterpenos oxigenados que participan con el 0,64%, sesquiterpenos oxigenados representados por el 10,55% y el 1,30% que corresponde a otro tipo de compuestos.(ver figura 13).

**Figura 13:** Grupos Químicos del aceite esencial de *B. obtusifolia*.



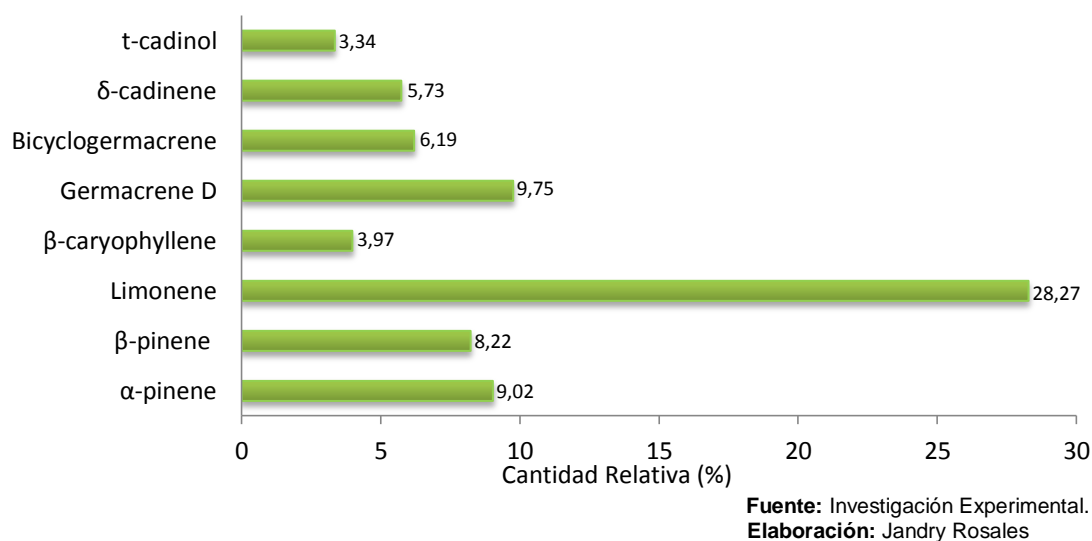
**Fuente:** Investigación Experimental.  
**Elaboración:** Jandry Rosales.

Los monoterpenos hidrocarbonados representan el principal grupo químico del aceite esencial de *B. obtusifolia*, este grupo reúne algunos de los compuestos mayoritarios como el Limonene, que es el compuesto con mayor concentración en el aceite esencial.

En las muestras analizadas se identificaron 8 compuestos mayoritarios (ver figura 14) entre los cuales tenemos:  $\alpha$ -pinene (9,02%),  $\beta$ -pinene (8,22%), Limonene (28,27%),  $\beta$ -caryophyllene (3,97%), Germacrene-D (9,75%), Bicyclogermacrene (6,19%),  $\delta$ -cadinene (5,73%),  $\tau$ -cadinol (3,34%).



Figura 14. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *B. obtusifolia*.



Estudios previos acerca de la composición química del aceite esencial de la especie *obtusifolia* no se encuentran disponibles en la literatura científica sin embargo un sinnúmero de investigaciones tienen como objeto el estudio de la composición química del aceite esencial de varias especies del género.

Limonene como compuesto mayoritario en el aceite analizado también ha sido reportada para las especies *B. spartioides*<sup>57</sup> y *B. darwinii*<sup>58</sup>, las mismas que presentan respectivamente (28,7-56,7%) y 47,1% de limonene en su aceite esencial. Este monoterpene hidrocarbonado considerado como uno de los constituyentes mayoritarios en el aceite de *B. spartioides* pertenece a uno de los grupos químicos representativos del aceite obtenido de esta especie.

Las altas concentraciones de α-pinene, β-pinene, limonene y bicyclogermacrene detectadas en las muestras analizadas son características de los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial extraído de las partes aéreas de *B. uncinella*<sup>59</sup> y de ejemplares masculinos y femeninos de *B. tandilensis* (β-pineno 33,1% en M y 30,0% en F, α-pineno 7,4% M y 4,5% en F, limoneno 3,7% en M y 12,3% en F, β-cariofileno 1,7% en M y 0,8% en F, espatulenol 7,0% en M y 8,4% en F,

<sup>57</sup> Van Baren, C., Di Leo Lira, P., Bandoni, A. (2002). Composition of essential oil of Pichana [*Baccharis spartioides* (Hook. et Arn.) Remy (Compositae)] from different populations of the Patagonia, Argentina. *Journal of Essential Oil Research*. Volumen 14, págs. 183-186.

<sup>58</sup> Kurdelas, R., López, S., Lima, B., Egly Feresin, G., Zygadlo, J., Zacchino, S., López, M., Tapia, A., Freile, M. (2012). Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. *Industrial Crops and Products*. Volumen 40, págs. 261-267.

<sup>59</sup> Frizzo, C., Serafini, L., Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P. (2001). Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. *Journal Flavour and Fragrance*. Volumen 16. N°4, págs. 286-288.



biciclogermacreno 4,0% en M y 3,2% en F y viridiflorol 15,8% en M y 17,0% en F)<sup>60</sup>, algunos componentes como el espatulenol y viridiflorol están presentes en cantidades minoritarias en el aceite de *B. obtusifolia*.

Mediante el análisis químico del aceite esencial de la especie dioecia *B. articulata* procedente de la provincia de Córdoba-Argentina se identificaron sus principales componentes en plantas hembra ( $\beta$ -pineno 14,7%, spathulenol 27,3% y (E)-nerolidol 10,1%) y plantas macho (spathulenol 30,3%,  $\beta$ -caryophyllene 9,5%, bicyclogermacrene 8,9% y (E)-nerolidol (8,1%))<sup>61</sup>; los mono y sesquiterpenos hidrocarbonados  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -caryophyllene y bicyclogermacrene fueron detectados en diferentes proporciones en el aceite analizado en el presente estudio.

El aceite esencial de *B. obtusifolia* es rico en monoterpenos hidrocarbonados (50,89%) representados principalmente por limonene que junto al  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -caryophyllene y spathulenol constituyen los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *B. notoserjila*<sup>62</sup>; a diferencia de la esencia analizada, el spathulenol no es un compuesto mayoritario. Generalmente este sesquiterpeno es identificado entre los principales componentes del aceite de varias especies del género *Baccharis*, muestra de ello son las altas concentraciones de spathulenol (42,65% F y 50,75% M) en el aceite esencial extraído de las hojas de especímenes hembra y macho de *B. semiserrata*<sup>63</sup> recolectadas en el estado de Paraná, Brasil. Junto a su principal componente mayoritario se encontraron los sesquiterpenos aromadendrene (9.61% F y 2.33% M),  $\alpha$ -muurolene (8.88% F y 2.38% M) y  $\delta$ -cadinene (9.52% F y 3.93% M); contrario al estudio del aceite de *B. obtusifolia* se determinó un contenido bajo en monoterpenos.

En las especies *B. dracunculifolia*, *B. latifolia*, *B. salicifolia*, *B. crispa* y *B. uncinella* se ha identificado comúnmente los sesquiterpenos  $\beta$ -caryophyllene, bicyclogermacrene, y germacrene D<sup>64</sup>. Las muestras de aceite esencial analizadas muestran los mismos

---

<sup>60</sup> Prado, H., Van Baren, C., Di Leo Lira, P., Bandoni, A., Orfila, E. (2003). El aceite esencial de *Baccharis tandilensis* Speg.-Asteraceae-. Revista Dominguezia. Volumen 19. N° 1, págs. 20-24.

<sup>61</sup> Zunino, M., López, M., Zygadlo, J. (2004). Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.)Pers. Journal of Essential Oil Research. Volumen 16, págs. 29-30.

<sup>62</sup> Cobos, M., Rodríguez, J., Oliva, M., Demo, M., Failaci, S., Zygadlo, J. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserjila*. Planta Medica. Volumen 67. N° 1, págs. 84-86.

<sup>63</sup> Mendes, S., Sávio, D., Boscacci, M., Capuano, R., Cechinel, V., Luiz, E., Wisniewski, A. (2008). Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source of spathulenol. Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias, Ponta Grossa. Volumen 14. N° 3, págs. 241-245.

<sup>64</sup> Frizzo, C.; Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S.; Cassel, E.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E. (2008). Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. Journal Flavour and Fragrance. Volumen 23. N° 2, págs. 99-106.



componentes mayoritarios, los cuales además forman parte del grupo de los sesquiterpenos hidrocarbonados que representan el 35,18% del aceite.

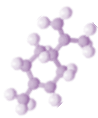
Los trabajos publicados sobre la composición química del aceite esencial de varias especies del género difieren cualitativamente y cuantitativamente en relación al aceite esencial analizado, sin embargo concuerdan con la presencia de algunos componentes como limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, bicyclogermacrene, spathulenol, viridiflorol,  $\beta$ -caryophyllene, aromadendrene,  $\alpha$ -muurolene,  $\delta$ -cadinene y germacrene D presentes en diferentes cantidades relativas y considerados como los constituyentes característicos de los aceites mencionados anteriormente. Las diferencias en cuanto a la composición y la abundancia relativa de los compuestos presentes en las distintas especies puede explicarse considerando las variaciones en las condiciones ecológicas (clima, tipo de suelo, estación del año, lugar geográfico) en que se desarrolla la planta; así como las condiciones de extracción (método de extracción, tiempo, condiciones de la materia prima), pueden producir en el aceite cambios cualitativos y cuantitativos,<sup>1</sup> e incluso en varias investigaciones se ha demostrado que las diferencias en la cantidad de terpenos identificados en un aceite esencial obtenido de una especie vegetal recolectada en la misma zona se debe al ambiente<sup>65</sup>.

#### 4.4.2. DATOS ESPECTRALES DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS.

Los espectros de los compuestos mayoritarios (Figura 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22) identificados en el aceite esencial extraído de las partes aéreas de *B. obtusifolia* se obtuvieron por CG-MS, en cada espectro se representa la abundancia de los diferentes tipos de iones (eje Y) en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ) (eje X). El primer valor corresponde a  $m/z$  y la abundancia del ión dado en porcentaje relativo corresponde al valor colocado entre paréntesis.

<sup>1</sup> Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T.; Naranjo, E.; Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). Revista Protección Vegetal. Volumen 24. N°1, págs. 39-46.

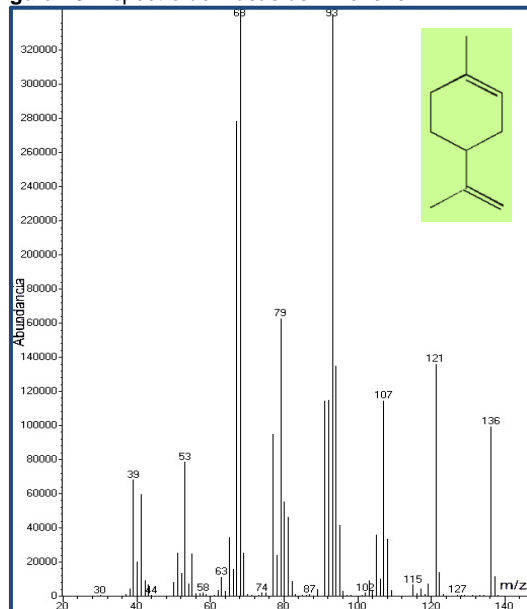
<sup>65</sup> Karaman, S. (2006). Morphogenetic Variation for Essential Oils in *Salvia palestiana* Bentham leaves and bracts from Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences. Volumen 9. N° 14, págs. 2720-2722.



► **Limonene:**

136(28,73); 127(0,16); 121(39,41); 115(1,87); 107(33,16); 102(0,52); 93(98,92); 87(0,25); 79(47,11); 74(0,50); 68(100); 63(3,19); 58(0,55); 53(22,78); 44(0,08); 39(19,72); 30(0,08).

Figura 15. Espectro de masas del limonene

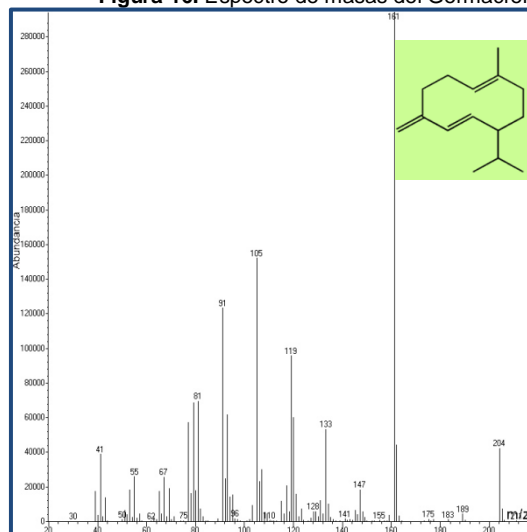


Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

► **Germacrene-D:**

204(14,42); 189(1,47); 183(0,41); 175(0,42); 161(100); 155(0,24); 147(6,22); 141(0,49); 133(18,09); 128(1,97); 119(32,49); 110(0,27); 105(51,72); 96(0,59); 91(41,90); 81(23,61); 75(0,17); 67(8,72); 62(0,12); 55(8,81); 50(0,39); 41(13,19); 30(0,05).

Figura 16. Espectro de masas del Germacrene-D.



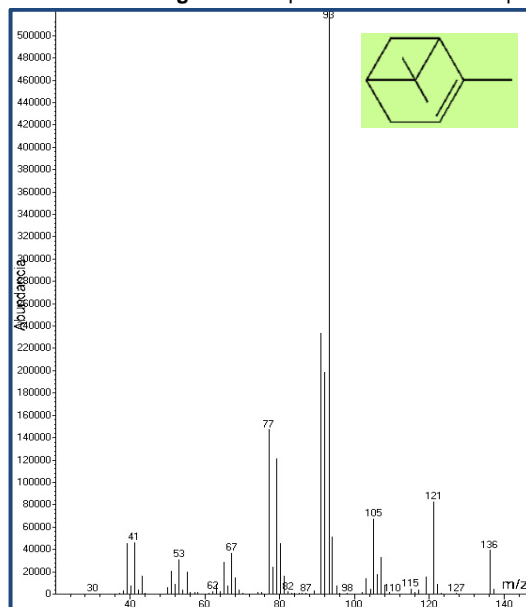
Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.



►  **$\alpha$ -pinene:**

136(7,50); 127(0,08); 121(15,82); 115(0,87); 110(0,04); 105(12,85); 98(0,10); 93(100); 87(0,10); 82(0,36); 77(28,11); 67(6,99); 62(0,45); 53(5,87); 41(8,81); 30(0,04).

Figura 17. Espectro de masas del  $\alpha$ -pinene.



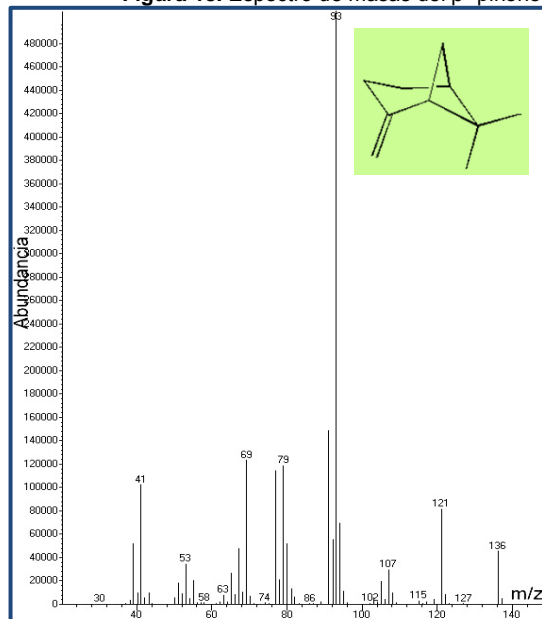
Fuente: Investigación Experimental.

Elaboración: Jandry Rosales.

►  **$\beta$ -pinene:**

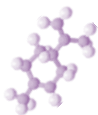
136(8,95); 127(0,08); 121(16,04); 115(0,59); 107(5,80); 102(0,19); 93(100); 86(0,08); 79(23,39); 74(0,21); 69(24,31); 63(1,54); 58(0,22); 53(6,80); 41(20,13); 30(0,04).

Figura 18. Espectro de masas del  $\beta$ -pinene.



Fuente: Investigación Experimental.

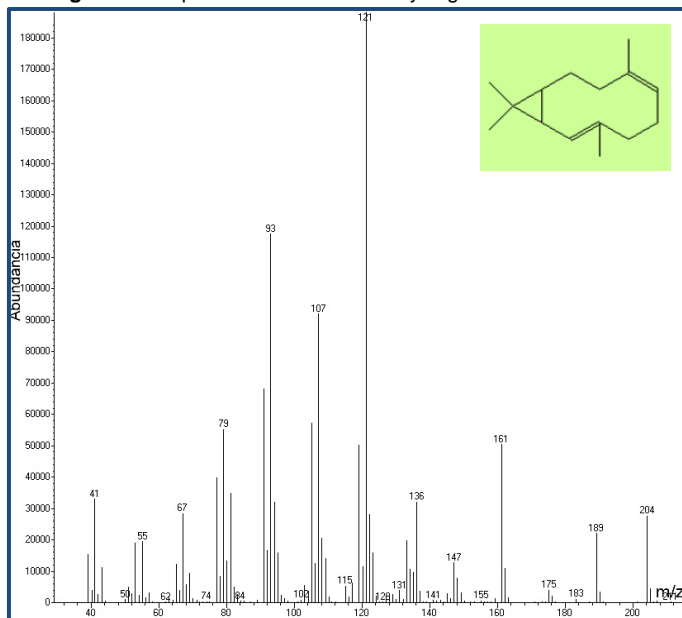
Elaboración: Jandry Rosales.



► **Bicyclogermacrene:**

204(14,64); 189(11,69); 183(0,57); 175(2,08); 161(26,74); 155(0,32); 147(6,76); 141(0,39); 136(17,05); 131(2,03); 128(1,50); 121(100); 115(2,83); 107(48,87); 102(0,42); 93(62,39); 84(0,28); 79(29,35); 74(0,17); 67(15,10); 62(0,13); 55(10,35); 50(0,55); 41(17,48).

Figura 19. Espectro de masas del Bicyclogermacrene.

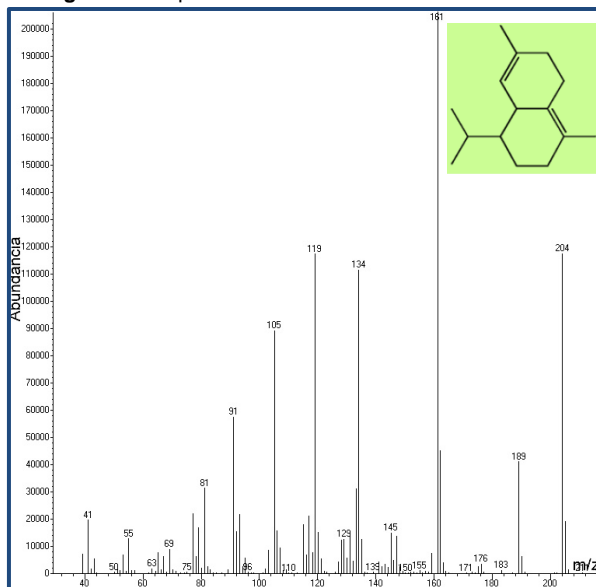


Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales

**δ-cadinene:**

204(56,93); 189(19,92); 183(0,56); 176(1,72); 171(0,10); 161(100); 155(0,55); 150(0,08); 145(7,25); 139(0,25); 134(54,06); 129(6,15); 119(56,90); 110(0,09); 105(43,24); 96(0,27); 91(27,84); 81(15,23); 75(0,23); 69(4,36); 63(0,87); 55(6,19); 50(0,26); 41(9,53).

Figura 20. Espectro de masas del δ-cadinene.



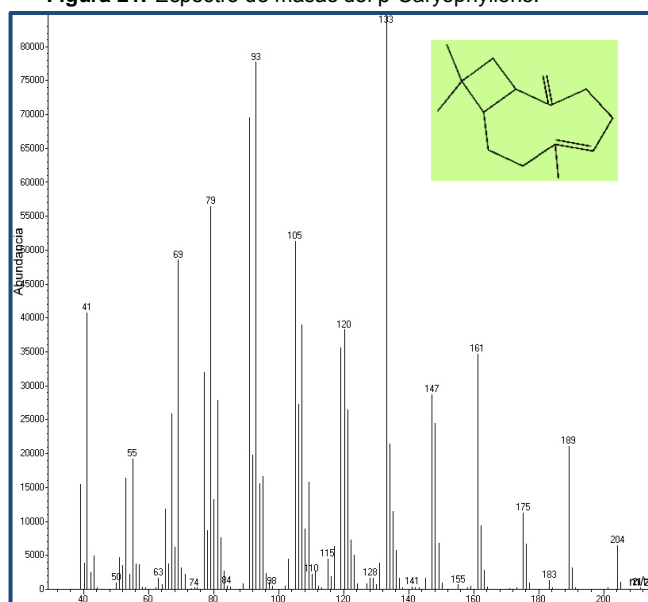
Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.



►  **$\beta$ -caryophyllene:**

204(7,62); 189(24,89); 183(1,55); 175(13,30); 161(40,92); 155(0,76); 147(33,87); 141(0,47); 133(100); 128(2,00); 120(45,10); 115(5,30); 110(2,67); 105(60,50); 98(0,51); 93(91,65); 84(0,57); 79(66,63); 74(0,27); 69(57,31); 63(1,99); 55(22,65); 50(1,16); 41(48,08).

Figura 21. Espectro de masas del  $\beta$ -Caryophyllene.

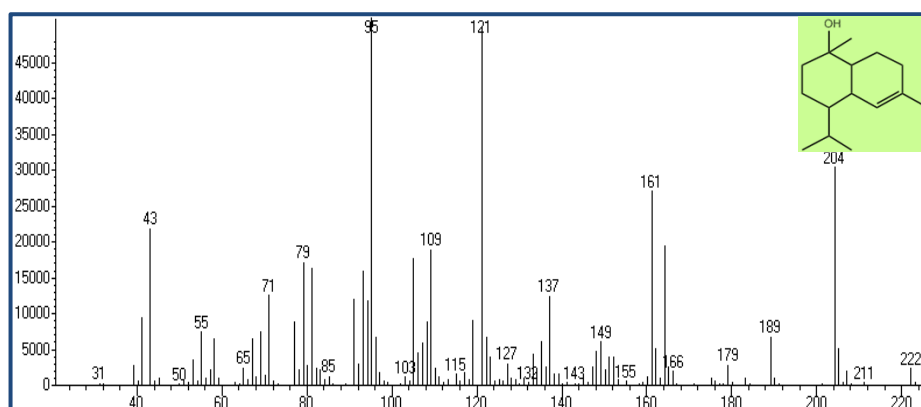


Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.

► **t-cadinol:**

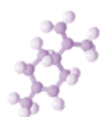
222(4,61); 211(0,56); 204(60,22); 189(13,05); 179(5,64); 166(3,55); 161(54,14); 155(1,02); 149(11,83); 143(0,40); 137(25,98); 132(0,67); 127(5,69); 121(96,14); 115(2,58); 109(37,64); 103(2,46); 95(100); 85(2,47); 79(32,26); 71(24,05); 65(4,87); 55(14,71); 50(0,32); 43(41,83); 31(0,40).

Figura 22. Espectro de masas del t-cadinol.



Fuente: Investigación Experimental.  
Elaboración: Jandry Rosales.





## 4.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *B. obtusifolia*.

### 4.5.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

#### 4.5.1.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (C.M.I.) ANTIBACTERIANA

En la tabla 8, se muestra la C.M.I. de los aceites de la primera, segunda y tercera recolección frente a 5 bacterias Gram-negativas y 2 Gram-positivas.

**Tabla 8.** Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los aceites esenciales de *B. obtusifolia* frente a 7 cepas bacterianas.

Aceites <i>B. obtusifolia</i>	GRAM-NEGATIVAS					GRAM-POSITIVAS	
	<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> ATCC25923
Bo111	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo112	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo113	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo121	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo122	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo123	NA	1000	NA	NA	NA	1000	NA
Bo131	NA	1000	NA	NA	NA	NA	NA
Bo132	NA	500	NA	NA	NA	NA	NA
Bo133	NA	500	NA	NA	NA	NA	NA
<b>CONTROL</b>	<b>Gentamicina</b>					<b>Ampicilina</b>	
	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$

**Fuente:** Investigación Experimental.  
**Elaboración:** Jandry Rosales.

**NA:** No Activo a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$  que fue la más alta que se probó.

**Bo111, Bo112, Bo113:** Aceites de la primera recolección.

**Bo121, Bo122, Bo123:** Aceites de la segunda recolección.

**Bo131, Bo132, Bo133:** Aceites de la tercera recolección.

El crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* no es inhibido por los aceites ensayados. Para las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*, los aceites de la primera y segunda recolección presentan una C.M.I. de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; sin embargo las muestras de la tercera recolección no presentan actividad frente a *E. faecalis* pero muestran una C.M.I. de 1000 y 500  $\mu\text{g/mL}$  para *K. pneumoniae*. De acuerdo a los valores de C.M.I. expuestos, los aceites analizados no mostraron una inhibición significativa frente a *K. pneumoniae* y *E. faecalis*.

De acuerdo a las hipótesis propuestas en el capítulo "Fin, propósito y componentes del proyecto" sección 1.4.; los aceites esenciales analizados presentan actividad antibacteriana a concentraciones altas lo cual no es relevante ya que lo ideal es el



poder de inhibitorio de las sustancias naturales a una menor concentración por lo cual la C.M.I. permite determinar la susceptibilidad de un organismo a una mínima cantidad de antimicrobiano.

En varias investigaciones se ha demostrado la susceptibilidad de las bacterias evaluadas ante al aceite esencial de especies del género *Baccharis*, no obstante datos publicados sobre la actividad biológica del aceite esencial de la especie *obtusifolia* no han sido registrados a pesar de las propiedades medicinales y usos terapéuticos de la planta.

Es complejo comparar los resultados obtenidos con los publicados en otros estudios, la divergencia de los valores de las C.M.I. de los aceites esenciales entre los diferentes estudios puede explicarse por la diversidad de las técnicas utilizadas, la variación en la composición química de los aceites de acuerdo con los géneros y las especies de las plantas o por la procedencia geográfica<sup>66</sup>, muestra de ello es la interesante actividad antibacteriana que exhiben productos naturales como el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *B. grisebachii* de la provincia de San Juan-Argentina con relación a lo observado en las muestras analizadas; los resultados de los ensayos antimicrobianos de la especie argentina demuestran la actividad del aceite frente a cepas de *Yersinia enterocolitica* y *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina con una de C.M.I de 250  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>67</sup> De la misma forma la susceptibilidad de *E. faecalis* frente al aceite esencial extraído de las partes aéreas de *B. latifolia* y *B. prunifolia* procedente de Mérida-Venezuela ha sido reportada respectivamente con valores de C.M.I. de 90 y 260  $\mu\text{g/mL}$ ; mientras que *S. aureus* frente al aceite de *B. latifolia* presentó una C.M.I. de 80  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>24</sup>

#### 4.5.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

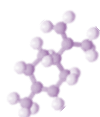
##### 4.5.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (C.M.I.) ANTIFÚNGICA.

La C.M.I. de los aceites esenciales frente a los dermatófitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se exponen en la tabla 9.

<sup>24</sup> Rojas, J.; Velasco, J.; Rojas, L.; Díaz, T.; Carmona, J.; Morales, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H.B.&K. (Asteraceae). Revista Natural Product Communications. Volumen 2, N°12, págs. 1245-1248.

<sup>66</sup> Zapata, B.; Durán, C.; Stashenko, E.; Betancur, L.; Mesa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. Revista Iberoamericana de Micología. Volumen 27, N°2, págs.101-103.

<sup>67</sup> Hadad, M.; Zygadlo, J.; Lima, B.; Derita, M.; Egly, G.; Zacchino, S.; Tapia, A. (2007). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of essential oil from *Baccharis grisebachii* Hieron (ASTERACEAE). Journal of the Chilean Chemical Society. Volumen 52, N° 2, págs. 1186-1189.



**Tabla 9.** Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los aceites esenciales de *B. obtusifolia* frente a 2 cepas fúngicas.

<b>HONGOS ESPORULADOS</b>		
<b>Aceites <i>B. obtusifolia</i></b>	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28185
Bo111	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
Bo112	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Bo113	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Bo121	500 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
Bo122	500 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
Bo123	500 $\mu\text{g/mL}$	62,5 $\mu\text{g/mL}$
Bo131	250 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
Bo132	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Bo133	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
<b>CONTROL</b>	<b>Itraconazol 1mg/mL</b>	
	7,81 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$

**Fuente:** Investigación Experimental.

**Elaboración:** Jandry Rosales.

**Bo111, Bo112, Bo113:** Aceites de la primera recolección.

**Bo121, Bo122, Bo123:** Aceites de la segunda recolección.

**Bo131, Bo132, Bo133:** Aceites de la tercera recolección.

Todos los aceites esenciales obtenidos del material de las diferentes recolecciones inhibieron el crecimiento de los dermatofitos en diferentes concentraciones, expresándose como la concentración mínima inhibitoria frente al control de Itraconazol.

Aunque actualmente no se tienen criterios estándares para definir la actividad antimicótica de productos naturales, Holetz citado por Zapata et al. (2010); indica clasificar la actividad antimicótica de productos naturales con base en el valor de la C.M.I. de la siguiente manera: C.M.I. inferior o igual a 100  $\mu\text{g/mL}$ : buena, C.M.I. entre 100 y 500  $\mu\text{g/mL}$ : moderada, y C.M.I. entre 500 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ : débil.<sup>66</sup> De acuerdo a la clasificación mencionada, los aceites esenciales frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* presentan una actividad moderada a excepción de los aceites de la segunda recolección (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) que muestran una buena actividad ante *T. mentagrophytes*.

De acuerdo a las hipótesis propuestas en la presente investigación, las aceites de *B. obtusifolia* presentan actividad antifúngica clasificada como buena actividad acorde a la clasificación expuesta anteriormente.

<sup>66</sup> Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. Aiyana ediciones. Impreso en España. Págs. 99.



Es interesante destacar la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites, especialmente los de la segunda recolección ya que el efecto antifúngico de los aceites esenciales de *B. obtusifolia* se explica por la presencia de terpenos, los mismos que han demostrado ser los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales<sup>68</sup>; sin embargo las diferencias que pueden existir en la composición química de los aceites afectan directamente sus actividades biológicas.<sup>69</sup> Además la variabilidad en los resultados de la actividad antimicótica de los productos naturales se atribuye a los factores descritos en los estudios antibacterianos y a las diferencias estructurales que existen entre los géneros o las especies de los hongos evaluados.<sup>66</sup>

Al igual que en otros estudios, los aceites de las tres recolecciones generalmente presentan los mismos compuestos, no obstante existen diferencias en su composición y su cantidad relativa, muestra de ello es la presencia de algunos compuestos únicamente en dos recolecciones o en los aceites de la segunda recolección, los mismos que tienen una mejor inhibición fúngica; a esta variación se suman los diferentes valores de C.M.I. sugiriendo de tal forma la existencia de una relación entre la composición química del aceite y su actividad. Es difícil correlacionar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales con un compuesto específico debido a la complejidad y variabilidad de los aceites.<sup>24</sup> Algunos autores sugieren que los componentes presentes en altas concentraciones no son necesariamente los responsables de gran parte de la actividad biológica, los componentes minoritarios pueden también contribuir a la actividad del aceite por efectos sinérgicos con otros componentes activos<sup>70</sup>.

El análisis cualitativo y cuantitativo de los aceites evaluados, indicaron la presencia de compuestos a los que se les atribuyen propiedades antimicrobianas, entre ellos se incluyen terpenos como el Linalool,  $\alpha$ - humuleno,  $\delta$ -cadinene,  $\beta$ - elemeno,  $\gamma$ -terpinene,  $\gamma$ -muroloeno, mirceno, entre otros, algunos de los cuales se encuentran en proporción considerable.

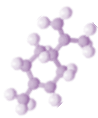
<sup>24</sup> Rojas, J; Velasco, J; Rojas, L; Díaz, T; Carmona, J; Morales, A. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. pruniifolia* H.B.&K. (Asteraceae). Revista Natural Product Communications. Volumen 2. N°12, págs. 1245-1248.

<sup>66</sup> Zapata, B.; Durán, C; Stashenko, E; Betancur, L; Mesa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. Revista Iberoamericana de Micología. Volumen 27. N°2, págs.101-103.

<sup>68</sup> Maguna, F.; Romero, A.; Garro, O. Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.

<sup>69</sup> Oliva, M; Beltramo, E; Gallucci, N.; Casero, C.; Zygaldo, J.; Demo, M.(2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L. Her.) Britton from different regions of Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Volumen 9. N°1, págs.29-37.

<sup>70</sup> Selim, S. (2011). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the *Egyptian lemongrass Cymbopogon proximus* Stapf. Revista Grasas y Aceites. Volumen 62. N° 1, págs.55-61.



La evaluación de la actividad antifúngica de Linalool, un monoterpeno identificado en el aceite estudiado junto al linalyl acetate, 1,8-cineole, ha demostrado un gran potencial antifúngico frente a cepas como *T. mentagrophytes*; la C.M.I. determinada por los métodos de macro y microdilución fue la misma para el Linalool. Los resultados de otras investigaciones también confirman el gran potencial antifúngico de este compuesto frente al 1,8-cineole<sup>71</sup>.

La actividad antifúngica ante *T. mentagrophytes* con una C.M.I. de 62,5 µg/mL también ha sido reportada para *T. rubrum* frente al aceite de *B. grisebachii*<sup>67</sup>, especie que es conocida por su uso en la medicina tradicional de Argentina.

Resulta de interés la actividad antifúngica presente en los aceites analizados de *B. obtusifolia* considerando que la especie vegetal es utilizada con fines antimicóticos por la etnia Saraguro<sup>16</sup> y la falta de publicaciones acerca de la actividad biológica del aceite de *B. obtusifolia* contra microorganismos responsables de las micosis en los humanos.

Debido al gran número de diferentes grupos químicos presentes en los aceites esenciales lo más probable es que la actividad antimicrobiana no sea atribuida a un mecanismo específico, de igual forma no todos los mecanismos de acción trabajan en puntos específicos, algunos de estos sitios pueden verse afectados como consecuencia de otros mecanismos.<sup>72</sup> Los mecanismos de acción de los componentes naturales están relacionados con la desintegración de la membrana citoplasmática, la desestabilización de la fuerza motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, transporte activo y la coagulación del contenido celular. Entre las características responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales tenemos la hidrofobicidad de sus componentes que permiten la participación de lípidos de las membranas celulares bacterianas los cuales desestabilizan las estructuras celulares haciéndola más permeable. Los componentes químicos de los aceites esenciales también actúan en las proteínas de la membrana citoplasmática; los hidrocarburos cíclicos actúan en las ATPasas que son enzimas localizadas en la membrana citoplasmática.<sup>22</sup>

---

<sup>16</sup> Tene, V.; Malagón, O.; Vita Finzi, P.; Vidari, G.; Armijos, Ch.; Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. Volumen 111. N°1, págs. 63-81.

<sup>22</sup> Silva, NCC; Fernandes, J. (2010). Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Volumen 16. N°3, págs. 402-413.

<sup>67</sup> Hadad, M.; Zygadlo, J.; Lima, B.; Derita, M.; Egly, G.; Zacchino, S.; Tapia, A. (2007). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of essential oil from *Baccharis grisebachii* Hieron (ASTERACEAE). *Journal of the Chilean Chemical Society*. Volumen 52. N° 2, págs. 1186-1189.

<sup>71</sup> Soković, M.; Brkić, D.; Džamić, A.; Ristić, M.; Marin, P. (2009). Chemical composition and antifungal activity of *Salvia desoleana* Atzei & Picci essential oil and its major components. *Journal Flavour and Fragrance*. Volumen 24, págs. 83-87.

<sup>72</sup> Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. Volumen 94, pp: 223-253.

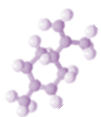


**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

1. El promedio de humedad de la materia vegetal fue de 56,89% y el rendimiento promedio más alto del material vegetal recolectado en estado fresco fue de 0,24% mientras el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,16%.
2. La densidad obtenida en las recolecciones fue de 0,8752, 0,8686 y 0,8787 para la primera, segunda y tercera recolección respectivamente. La media resultado de los valores anteriormente mencionados fue de 0,8742.
3. El índice de refracción para los aceites de la primera, segunda y tercera recolección fue de 1,4850; 1,4830 y 1,4870 calculándose una media de 1,4850.
5. En el aceite esencial analizado se detectaron 43 compuestos que representan el 94,43% de los cuales 28 se identificaron en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX.
6. Los terpenos son los principales constituyentes del aceite esencial de *B. obtusifolia* analizado por CG-MS y CG-FID.
7. El grupo químico predominante lo conforman los monoterpenos hidrocarbonados (50,89%), seguido por sesquiterpenos hidrocarbonados (35,18%), monoterpenos oxigenados (0,64%), sesquiterpenos oxigenados (10,55%) y otros compuestos (1,30%).
8. El monoterpeno hidrocarbonado limonene es el compuesto mayoritario en todas las muestras.
9. Se identificaron 8 compuestos mayoritarios:  $\alpha$ -pinene (9,02%),  $\beta$ -pinene (8,22%), limonene (28,27%),  $\beta$ -caryophyllene (3,97%), germacrene-D (9,75%), bicyclogermacrene (6,19%),  $\delta$ -cadinene (5,73%),  $\tau$ -cadinol (3,34%).
10. Las muestras del aceite no mostraron una buena actividad frente a *K. pneumoniae* ni frente a *E. faecalis*.
11. Las muestras no inhibieron significativamente el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*.

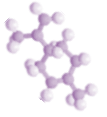


12. Los aceites obtenidos de las distintas recolecciones presentan una moderada actividad frente a los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.
13. Los aceites obtenidos de la materia vegetal de la segunda recolección presentan una buena actividad evidenciándose la estrecha relación que existe entre composición química y actividad biológica.



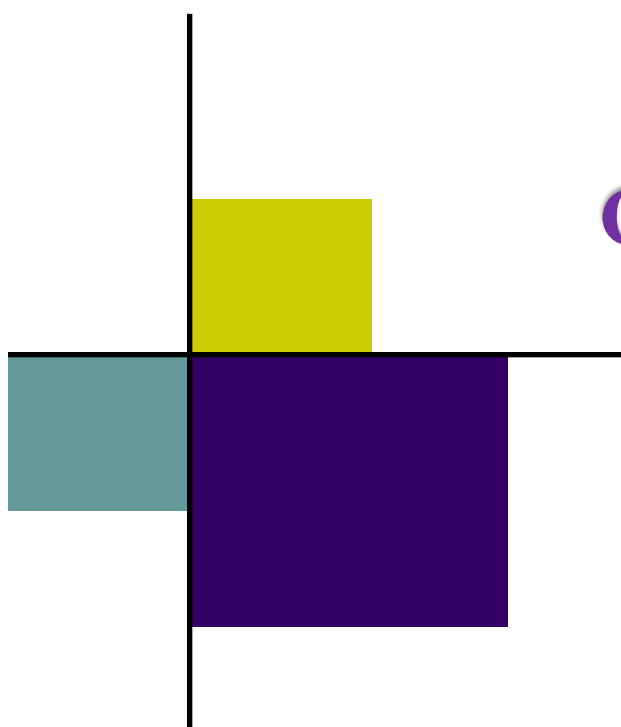


**CAPITULO VI**  
**RECOMENDACIONES**



## 6. RECOMENDACIONES

1. Controlar la temperatura y presión de vapor, los mismos que influyen en el proceso de destilación debido a la volatilidad de los constituyentes de los aceites esenciales.
2. En la extracción del aceite esencial se debe investigar y determinar los parámetros que influyen en la obtención de una producción mayor así como en la composición cualitativa y cuantitativa con la finalidad de asegurar la calidad del aceite.
3. Evaluar y publicar la actividad antimicrobiana, los posibles sinergismos y la forma de acción de los compuestos identificados como mayoritarios.
4. Se recomienda evaluar la actividad de los aceites frente a otras cepas bacterianas y fúngicas de interés en salud pública.
5. En caso de ser viable el empleo de la esencia como antifúngico debería estudiarse la posibilidad de investigar y desarrollar una forma farmacéutica de acuerdo a altos estándares de calidad.
6. Debido a que esta especie que pertenece al género *Baccharis* tuvo actividad antifúngica, se recomienda estudiar otras especies del mismo género.



# **CAPITULO VII**

## **ANEXOS**



## 7. ANEXOS

### ANEXO 1

#### DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

##### PRINCIPIO:

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

##### MATERIAL:

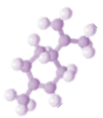
- Estufa
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

##### 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:

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



Donde:

**Hm:** %de humedad

**m:** peso de la cápsula vacía (gr)

**m<sub>1</sub>:** peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

**m<sub>2</sub>:** peso de la cápsula + muestra seca (gr).



---

## ANEXO 2

### DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

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:

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

Donde:

**R:** Rendimiento expresado en porcentaje.

**V:** Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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



---

## ANEXO 3

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

### DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C (Método de Referencia)

#### PROPUESTA:

La presente norma está basada en la norma ISO 279-1981 publicada por la Organización Internacional de Normalización.

#### OBJETIVO DE APLICACIÓN:

La presente norma especifica el método referido a la determinación de la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales.

#### REFERENCIAS:

- NF T 75-003 Aceites esenciales-Reglas generales para la preparación.
- NF T 75-110 Aceites esenciales-Preparación de la muestra previa al análisis.

#### 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.

#### NOTA:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial 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  $30^{\circ}\text{C}$ , con una variación de  $0.2^{\circ}\text{C}$  a  $0.1^{\circ}\text{C}$ .
- 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  $20^{\circ}\text{C}$ . 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:

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

Donde:

$d_{20}^{20}$ : densidad relativa a  $20^{\circ}\text{C}$ , referido al agua a  $20^{\circ}\text{C}$ .





---

$m_0$ : 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.

#### DEFINICIÓN:

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  $(589.3 \pm 0.3)\text{nm}$ , correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

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

#### APARATOS:

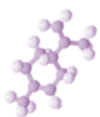
**Refractómetro:** Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre:  $1.300$  y  $1.700$  o con una precisión de  $\pm 0.0002$ .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$ , 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  $\pm 0.2^\circ\text{C}$  y debe mantenerse a  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ .

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.

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

Donde:

$n_D^t$  = 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  $\pm 0.0002$ .

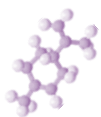


## ANEXO 5

### REFERENCIAS DE LOS INDICES DE KOVATS (IK)

<sup>a</sup> ref 1; <sup>b</sup> ref 2; <sup>c</sup> ref 3; <sup>d</sup> ref 4; <sup>e</sup> ref 5; <sup>f</sup> ref 6; <sup>g</sup> ref 7; <sup>h</sup> ref 8; <sup>i</sup> ref 9; <sup>j</sup> ref 10; <sup>k</sup> ref 11; <sup>l</sup> ref 12; <sup>m</sup> ref 13; <sup>n</sup> ref 14; <sup>ñ</sup> ref 15; <sup>o</sup> ref 16; <sup>p</sup> ref 17; <sup>q</sup> ref 18; <sup>r</sup> ref 19; <sup>s</sup> ref 20; <sup>t</sup> ref 21; <sup>u</sup> ref 22; <sup>v</sup> ref 23; <sup>w</sup> ref 24; <sup>x</sup> ref 25; <sup>y</sup> ref 26; <sup>z</sup> ref 27; <sup>ab</sup> ref 28; <sup>ab</sup> ref 29; <sup>ac</sup> ref 30; <sup>ad</sup> ref 31; <sup>ae</sup> ref 32; <sup>af</sup> ref 33; <sup>ag</sup> ref 34.

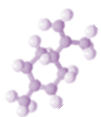
1. De Feo, V.; Porta, G.; Urrunaga, E.; Urrunaga, R.; Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 13, págs.145-147.
2. Heravi, M.; Sereshti, H. (2007). Determination of Essential Oil Components of *Artemisia haussknechtii* Boiss using simultaneous Hydrodistillation-Static Headspace Liquid Phase Microextraction - Gas Chromatography Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. Págs. 81-89.
3. Storer, J.; Elmore, J.; van Emden, H. (1993). Airborne volatiles from the foliage of three cultivars of autumn flowering chrysanthemums. Phytochemistry. Volumen 34. N° 6, págs.1489-1492.
4. Tzakou, O.; Bazos, I.; Yannitsaros, A. (2007). Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 22, págs.358-362.
5. Marongiu, B.; Porcedda, S.; Piras, A.; Sanna, G.; Murreddu, M.; Loddo, R. (2006). Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. nana Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.148-154.
6. Adams, R. (2009). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> edition. Allured Business Media.
7. Choi, H. (2003). Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 51, págs.2687-2692.



8. Sagrero, L.; Bartley, J.; Espinosa, G.; Dominguez, X.; Verde, J. (1997). Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 12, págs.401-403.
9. Moon, S.; Cliff, M.; Li-Chan, E. (2006). Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and –olfactometry. Food Research International. Volumen 39, págs.294-308.
10. Pavlovic, M.; Tzakou, O.; Petrakis, P.; Couladis, M. (2006). The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.84-87.
11. Apel, M.; Sobral, M.; Zuanazzi, J.; Henriques, A. (2006). Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). Flavour and Fragrance Journal. Volumen 21, págs.565-567.
12. Silva, W.; Doria, G.; Maia, R.; Nunes, R.; Carvalho, G.; Blank, A.; Alves, P.; Marcal, R.; Cavalcanti, S. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technology. Volumen 99, págs.3251-3255.
13. Dob, T.; Dahmane, D.; Chelghoum, C. (2006). Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. Pharmaceutical Biology. Volumen 44, págs.1-6.
14. Elias, V.; Simoneit, B.; Cardoso, J. (1997). Analysis of volatile sesquiterpenoids in environmental and geological samples. Journal of High Resolution Chromatography. Volumen 20, págs.305-309.
15. Angioni, A.; Barra, A.; Coroneo, V.; Dessi, S.; Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 54, págs.4364-4370.
16. Noudogbessi, J.; Yedomonhan, P.; Sohounhloue, D.; Chalchat, J.; Figueredo, G. (2008). Chemical composition of essential oil of *syzygium guineense* (Willd.) DC. var. *guineense* (Myrtaceae) from Benin. Rec. Nat. Prod. Págs. 33-38.



17. Araújo, E.; Silveira, E.; Lima, M.; Neto, M.; de Andrade, I.; Lima, M.; Santiago, G.; Mesquita, A. (2003). Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 51, págs.3760-3762.
18. Wang, Y.; Finn, C.; Qian, M. (2005). Impact of Growing Environment on Chickasaw Blackberry ( *Rubus* L.) Aroma Evaluated by Gas Chromatography Olfactometry Dilution Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 53, págs.3563-3571.
19. Senatore, F.; Urrunaga, E.; Urrunaga, R.; Porta, G.; de Feo, V. (1998). Essential oil from two peruvian *Satureja* species. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 13, págs.1-4.
20. König, W.; Joulain, D.; Hochmuth, D. (2006). GC/MS Library: Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Retrieved from <http://www.massfinder.com/mfterpenoids.htm>.
21. Moreno, P.; Lima, M.; Sobral, M.; Young, M.; Cordeiro, I.; Apel, M.; Limberger, R.; Henriques, A. (2007). Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. Scientia Agricola (Piracicaba Braz). Volumen 64. N° 4, págs.428-432.
22. Abreu, P.; Noronha, R. (1997). Volatile constituents of the rhizomes of *Aframomum alboviolaceum* (Ridley) K. Schum from Guinea-Bissau. Flavour and Fragrance Journal. Volumen 12, págs.79-83.
23. Acree, T.; Arn, H., Flavornet, 2004, retrieved from <http://www.flavornet.org/>.
24. Vahirua-Lechat, I.; Mitermite, Y. (2010). Aromatic Plants of French Polynesia. IV. Composition and chemical variations of the essential oils of leaves of *Etilingera cevuga* (Seeman) R.E. Smith. The Journal of essential oil research. Volumen 22. N° 5, págs.407-408.
25. Hognadottir, A.; Rouseff, R. (2003). Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. Journal of Chromatography A. Volumen 998, págs.201-211.



26. BenTaarit, M.; Msaada, K.; Hosni, K.; Ben Amor, N.; Marzouk, B.; Kchouk, M. (2010). Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the Northeast region of Tunisia. The journal of essential oil research. Volumen 22. N°5, págs.449-453.
27. Wannes, W.; Mhamdi, B.; Marzouk, B. (2009). Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. Journal Food Chemistry. Volumen 112. N° 3, págs.621-626.
28. Szafranek, B.; Chrapkowska, K.; Ska, M.; Szafranek, J. (2005). Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 53, págs.2817-2822.
29. Umano, R.; Hagi, Y.; Shibamoto, T. (2002). Volatile chemicals identified in extracts from newly hybrid citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 50, págs.5355-5359.
30. Davies, N. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. Journal of Chromatography A. Volumen 503, págs.1-24.
31. Jaramillo, B.; Stashenko, E.; Martínez, J. (2010). Composición química volátil de *Satureja brownei* (Sw.) Briq. colombiana y determinación de su actividad antioxidante. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Volumen 15. N°1, págs.52-63.
32. Chung, T.; Eiserich, J.; Shibamoto, T. (1993). Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 41, págs.1693-1697.
33. Hamilton, J.; Hall, D.; Kirk, W. (2005). Identification of a male-produced aggregation pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Journal of Chemical Ecology. Volumen 31, págs.1369-1379.
34. Gaydou, E., Randriamiharisoa, R., Bianchini, J. (1986). Composition of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson forma genuina) from Madagascar. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Volumen 34, págs.481-487.