



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”. “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Artemisia absinthium*.”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Villavicencio Reinoso, Marlon Bolivar

DIRECTOR: MSc. Andrade Morocho, José Miguel

LOJA- ECUADOR
2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

MSc.

Jose Miguel Andrade Morocho.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: “Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”. “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Artemisia absinthium*.” realizado por Villavicencio Reinoso Marlon Bolivar, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, 12 de Septiembre de 2014

f).....

MSc. José Miguel Andrade Morocho

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Villavicencio Reinoso Marlon Bolivar declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: “Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible”. “Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Artemisia absinthium*.”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo José Miguel Andrade Morocho director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Marlon Bolivar Villavicencio Reinoso

1103771646

DEDICATORIA

En primer lugar doy infinitamente las gracias a mi madre que a pesar de la distancia me acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y de vida, demostrado su amor, corrigiendo mis faltas, celebrando mis triunfos, brindándome su confianza y apoyo lo que me han permitido culminar esta etapa de mi vida y a quien dedico el presente proyecto. A mis abuelitos que me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos. A mis amigos y demás familiares quienes directa o indirectamente me apoyaron durante mi vida estudiantil y finalmente pero no menos importante a Sol y Alice mis compañeras incondicionales y fuente de incontables alegrías.

Marlon Villavicencio

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Madre quien me dio la vida por todo su esfuerzo para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que ha demostrado todos estos años, juntos logramos este éxito.

Al MSc. José Miguel Andrade, mi director de tesis, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo y quien ha sabido guiarme con sus enseñanzas, tiempo y paciencia para alcanzar este logro.

Especial agradecimientos al PhD. Vladimir Morocho por sus sabios consejos, relevantes aportes y apoyo incondicional y al MSc. Luis Cartuche por sus críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

Finalmente, a la Universidad Técnica Particular de Loja, por el apoyo académico y espiritual que me brindado a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Marlon Villavicencio

ÍNDICE DE CONTENIDOS	pp
CARATULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORÍA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	6
1.1 FIN DEL PROYECTO	7
1.1.1 Objetivo general	7
1.1.2 Objetivos específicos	7
1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO	7
1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO	7
CAPITULO II. ANTECEDENTES	8
2.1 ANTECEDENTES	9
2.1.1 Descripción botánica de la especie <i>Artemisia absinthium</i> L.	10
2.1.2 Propiedades farmacológicas	11
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA	14
3.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	14
3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	14
3.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	15
3.5 ANALISIS DE LOS EXTRACTOS	16
3.6 DESCLOROFILACIÓN DEL EXTRACTO	18

3.7	FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS	19
3.7.1	Cromatografía en capa fina (CCF)	20
3.8	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	20
3.9	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	20
3.10	OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR EL MÉTODO DE ARRASTRE DE VAPOR	21
3.10.1	Determinación de la humedad	21
3.10.2	Determinación del rendimiento del aceite esencial	22
3.11	DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE	22
3.11.1	Densidad relativa	22
3.11.2	Índice de refracción	22
3.12	IDENTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL	22
3.12.1	Preparación de las muestras	23
3.12.2	Parámetros operacionales del CG-EM	23
3.12.3	Determinación de los Índices de Kóvats (IK)	24
	CAPITULO IV. RESULTADOS Y ANALISIS	25
4.1	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE <i>A. absinthium</i>	26
4.2	EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA ESPECIE <i>A. absinthium</i>	27
4.2.1	Actividad antimicrobiana de la especie <i>A. absinthium</i>	27
4.2.2	Actividad antioxidante de la especie <i>A. absinthium</i>	28
4.3	FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EtAA	30
4.3.1	Unión de fracciones EtAA	31
4.4	FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EtDAA1	32
4.4.1	Unión de fracciones EtDAA1	33
4.5	PURIFICACIÓN DE FRACCIONES	34
4.6	PORCENTAJE DE HUMEDAD	36
4.7	RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL	37
4.8	PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL	37
4.8.1	Densidad	37
4.8.2	Índice de refracción	38
4.9	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE <i>A. absinthium</i>	38

4.9.1	Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB5 (MS) y DB5 (FID)	40
4.9.2	Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de <i>A. absinthium</i> .	41
	CONCLUSIONES	44
	RECOMENDACIONES	45
	BIBLIOGRAFÍA	46
	ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS	pp
Figura 1. <i>Artemisia absinthium</i> L.	10
Figura 2. Obtención de extractos	15
Figura 3. Placas de sílica gel CCF fase directa de los extractos HxAA, AcAA, MeAA	16
Figura 4. Placas de sílica gel CCF fase inversa de los extractos HxAA, AcAA, MeAA	17
Figura 5. Placas de sílica gel CCF fase directa de los extracto EtAA	17
Figura 6. Proceso de desclorofilación	19
Figura 7. Equipo de destilación por arrastre de vapor	21
Figura 8. Actividad Antioxidante	30
Figura 9. Espectro de masas (CG-EM) fracción DFU4	34
Figura 10. Estructura química de los compuestos identificados en la fracción DFU4	35
Figura 11. Espectros CG-EM de 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	35
Figura 12. Espectros CG-EM de 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin	36
Figura 13. Cromatograma del aceite esencial de <i>A. absinthium</i> en DB-5MS	38
Figura 14. Compuestos identificados del aceite esencial de <i>A. absinthium</i>	40
Figura 15. Sabinyl acetate	41
Figura 16. β -Thujone	42
Figura 17. Sabinene	43

LISTA DE TABLAS	pp
Tabla 1. Descripción botánica <i>Artemisia absinthium</i> L	10
Tabla 2. Propiedades farmacológicas	12
Tabla 3. Parámetros operacionales de las columnas capilares utilizadas	23
Tabla 4. Resultado del Tamizaje Fitoquímico	26
Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de <i>A. absinthium</i> .	27
Tabla 6. Actividad antimicrobiana	28
Tabla 7. Actividad antioxidante	29
Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico del extracto EtAA	30
Tabla 9. Fracciones unidas extracto EtAA	31
Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico del extracto EtDAA1	32
Tabla 11. Fracciones unidas extracto EtDAA1	33
Tabla 12. Porcentaje de humedad	37
Tabla 13. Densidad	37
Tabla 14. Composición química del aceite esencial de <i>A. absinthium</i>	39

ABREVIATURAS

¹HRMN	Resonancia magnética nuclear protón
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
AcAA	Extracto en Acetato de Etilo
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de llama
CH₂CL₂	Diclorometano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DB-5MS	5%-Fenil –metilpolisiloxano
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
EtAA	Extracto en Éter Etilico
EtDAA1	Extracto desclorofilado del extracto de Éter Etilico fracción Metanol-Agua 8:2 (v/v)
EtDAA2	Extracto desclorofilado del extracto de Éter Etilico fracción Metanol-Agua 9:1 (v/v)
EtDAA3	Extracto desclorofilado del extracto de Éter Etilico fracción Metanol 100%
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HxAA	Extracto en Hexano
INIAP	Instituto Nacional De Investigaciones Agropecuarias
MeAA	Extracto en Metanol
MeOH	Metanol
Rf	Factor de retención
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Utilizando técnicas cromatográficas, CG-EM y CG-FID se determinó la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Artemisia absinthium* recolectada en Catamayito-Catamayo (Ecuador). Se identificó un total de diez compuestos, los cuales representan el 93,80% del total del aceite. Los principales constituyentes del aceite fueron Sabinyl acetate (57,76%), β -Thujone (20,65%), Sabinene (8,25%). Se evaluó la actividad biológica de los extractos obtenidos en Hexano, Éter etílico, Acetato de etilo, Etanol, Metanol, Agua y del aceite esencial por el método de microdilución en caldo. El extracto de Éter Etílico presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y 250 $\mu\text{g/mL}$ para *P. vulgaris* en el extracto etéreo. Finalmente se determinó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante mediante el método DPPH y ABTS.

Palabras Claves: *Artemisia absinthium*, DPPH, ABTS, Sabinyl acetate.

ABSTRACT

Using chromatographic techniques, GC-MS and GC-FID was determined composition chemistry of essential oil of the aerial parts of *Artemisia absinthium* collected in Catamayito-Catamayo (Ecuador). It was identified the presence of ten constituents, which represent 93.80% of the total oil. The major constituents of the oil were Sabinyl acetate (57.76%) and β -Thujone (20.65%), Sabinene (8.25%). The biological activity of the extracts obtained in Hexane, Ethyl Ether, Ethyl Acetate, Ethanol, Methanol, Water and essential oil was evaluated by the broth microdilution method. Ethyl Ether extract presented a minimum inhibitory concentration (MIC) against strains of Gram-negative, exhibiting MIC values of 15.62 $\mu\text{g/mL}$ for *S. aureus* and 250 $\mu\text{g/mL}$ for *P. vulgaris* in ether extract. Finally, the total phenolic content and antioxidant activity was determined by the DPPH and ABTS method.

Keywords: *Artemisia absinthium*, DPPH, ABTS, Sabinyl acetate.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de sus enfermedades, estas últimas llamadas plantas medicinales, eran veneradas por las virtudes que se les había reconocido, transmitiéndose los conocimientos de generación en generación; nadie buscaba el saber por qué o cómo actuaban, pero era un hecho incontestable y que parecía mágico (Maldonado et al., 2010).

A pesar de su extensión relativamente pequeña, el Ecuador es considerado como uno de los países más ricos en diversidad de especies y ecosistemas en todo el mundo. Su posición geográfica y la presencia de la cordillera de Los Andes determinan la existencia de una enorme variedad de bosques y microclimas, desde los húmedos de la Amazonia y noroccidente, a los ecosistemas secos del sur; desde las cálidas playas del Pacífico hasta las nieves eternas de los volcanes (Grijalva, 2012). De la Torre et al., (2011) reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas útiles en el Ecuador; de las cuales el 75% de las especies medicinales son nativas, el 5% endémicas y el 11% introducidas, siendo las hojas la parte más utilizada de la planta (30%), la planta entera (10%) y las flores o inflorescencia (6%).

Los grupos étnicos del Ecuador han alcanzado a través de años de evolución social y biológica, manejar y utilizar numerosas especies medicinales en beneficio propio. Desafortunadamente estos conocimientos han sido relegados por los procesos de la industria farmacéutica; la aculturación, la expansión de la frontera agrícola y las acciones antropogénicas, todo esto han llevado en los últimos tiempos a la destrucción y pérdida de los bosques en donde los indígenas recogen las plantas medicinales; esta pérdida de biodiversidad conlleva también la pérdida de conocimientos, fruto de miles de años de desarrollo cultural, de un estilo de vida en armonía con la naturaleza. Sin embargo, existen comunidades que guardan aún sus valores culturales como los Saraguro en el sur del país, que mantienen conocimiento sobre recursos fitoterapéuticos ancestrales que son aplicados por los Hampi Yachak (sanadores comunitarios) (Andrade, 2012).

El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación de productos y el nivel de las investigaciones mundiales hacen que el área de los productos naturales sea la de mayor crecimiento dentro del campo de la química orgánica.

En la actualidad se reportan cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes especies. Han surgido novedosos y sofisticados métodos y técnicas de aislamiento, dependientes del creciente desarrollo de la biotecnología, la bioingeniería y la aparición de nuevas demandas en la terapia humana (Krishnaswamy & Raghuramulu, 2000).

Estudios realizados del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L, reportan actividad antimicrobiana (Sengul et al., 2011), acción emenagoga (reguladora de la menstruación) (Montesdeoca, 2010), alelopatía y el poder supresor de la aparición de malas hierbas (Zaragoza & Cirujeda, 2005); se han reportado atributos y usos medicinales en casas de salud venezolanas indicado eficacia en el alivio de desórdenes renales, dolores estomacales, colerina y dolor dental (CEPAL, 2005); en homeopatía es utilizada para prevenir las crisis de epilepsia, sonambulismo, hemorragias uterinas, convulsiones además de ser antiinflamatoria y antipirética (Chalala et al., 2004); Según Shafi et al., (2012) en su investigación pudo apreciar la habilidad de alterar la morfología celular de células cancerígenas mostrando condensación nuclear y una significativa fragmentación del núcleo celular indicativos del proceso de apoptosis.

Basados en este contexto el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja en colaboración con el Departamento de Nutrición y Calidad del INIAP en su proyecto denominado “Estudio de los Recursos Fitoterapéuticos Ancestrales para su Conservación y Aprovechamiento Sostenible” se desarrolló el estudio químico de los extractos y el aceite esencial de la especie *Artemisia absinthium* L, de la región Sur del Ecuador. La presente investigación busca aislar, identificar, y evaluar microbiológicamente los metabolitos secundarios, que le otorgarían a la especie *Artemisia absinthium* L, comúnmente llamada “ajenjo” los atributos de carácter medicinal.

CAPÍTULO I
FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin del proyecto.

Contribuir a mejorar la calidad de vida de las poblaciones rurales más vulnerables del Ecuador, mediante la conservación y revalorización de la especie *Artemisia absinthium* L, en un contexto de respeto por el ambiente, el conocimiento ancestral y la cultura local.

1.1.1. Objetivo general.

- Estudiar los recursos fitogénéticos ancestrales de plantas medicinales para su conservación y aprovechamiento sostenible.

1.1.2 Objetivos específicos.

- Realizar un screening preliminar cualitativo mediante tamizaje fitoquímico de *Artemisia absinthium* L.
- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios a partir de *Artemisia absinthium* L. y evaluar la actividad biológica de sus extractos totales.
- Determinar la composición físico-química y evaluar la actividad biológica del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L.

1.2 Propósito del proyecto.

- El presente proyecto pretende aislar, caracterizar y evaluar la actividad biológica de los extractos totales y el aceite esencial y de esta forma revalorizar las especies ancestrales de uso medicinal.

1.3 Componentes del proyecto.

- Como resultado de este trabajo investigativo se espera obtener los metabolitos secundarios de los extractos totales, además evaluar la composición química y actividad biológica de su aceite esencial.

CAPITULO II
ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes.

Las plantas medicinales han sido milenariamente utilizadas en la medicina tradicional y ahora son cada vez más valiosos como materia prima en la preparación de medicamentos modernos (occidentales) para la industria farmacéutica y herbal, cuyo mercado, igualmente importante, sigue una tendencia hacia un aumento significativo.

La familia de las compuestas (*Compositae* o *Asteraceae*), con más de 1.000 géneros y aproximadamente 20.000 especies, es una de las más importantes de las plantas formadoras de semillas (espermatofitos), tanto en lo que respecta al número de especies como en la diversidad de su morfología, hábitat, formas vitales y sistemas de dispersión de los frutos (Guilarte, 2003). En general, el grupo está caracterizado por la presencia de ácidos iso- y clorogénico isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoides (Del Vitto & Petenatti, 2009).

Artemisia absinthium L., denominada comúnmente “ajenjo”, es una planta herbácea medicinal de la familia de las asteraceae que según estudios fitoquímicos presenta una composición química en hojas del (1-2%) de aceite esencial el cual contiene feladreno, a-pineno, tuyona (3-12%), tuyo y derivados (alcohol, isovaleratos, palmitato), bisaboleno, canfeno, cadineno, felandreno, nerol y azulenos, absintina, isoabsintina, 1,4-dimetil-7-etilazuleno, 7-etil-3,6-dihidro-1,4-dimetilazuleno, 7-etil-5,6-dihidro-1,4-dimetilazuleno, 3-O-b-D-glucopiranosido, 3-O-rutósido; además contiene taninos, resinas, almidón, malatos, nitrato de potasio y otras sales; en flores presenta absintina, isoabsintina, 1,4-dimetil-7-etilazuleno, 7-etil-3,6-dihidro-1,4-dimetilazuleno, 7-etil-5,6-dihidro-1,4-dimetilazuleno, 3-O-b-D-glucopiranosido, 3-O-rutósido; en raíz presenta sesartermina, episartermina A, diasartermin; en semillas en base seca contiene proteína (25,8%), grasa (33,4%) y ceniza (6,6%) (Villar & Villavicencio, 2001).

2.1.1 Descripción botánica de la especie *Artemisia absinthium* L.



Figura 1. *Artemisia absinthium* L.

Elaboración: El Autor

Tabla 1. Descripción botánica *Artemisia absinthium* L.

Descripción botánica	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Genero	<i>Artemisia</i>
Nombre científico	<i>Artemisia absinthium</i> L.
Nombre común en algunos países o idiomas	Absinth, bitterer beifuss, wermut (alemán); incienso (Cuba); hierba dulce (Chile); alcanfor (Ecuador); absintio, ajencio, ajenjo, incienso (España); absinthe, aluyne, armoise amére (francés); té ruso (Guatemala); absinth, Green,

	<p>giger, wormwood (ingles); assenzio maggiore, assenzio romano (italiano); bsinto, acinto, artemisia, assintro, axenxo, losna, losna maior, rainha das ervas (portugués); ajenjo de sierra, artemisia (Venezuela). En varios países tambien se le llama: ajenjo común, ajenjo macho, ajenjo mayor, alosna, amargosa, asenjo, incienso, hierba santa, hierba de san Juan.</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fuente: Fonnegra & Jiménez, 2007.

Elaboración: El Autor

Artemisia absinthium L, es una planta herbácea medicinal de la familia de las asteraceae. Su apariencia es blanquecina, mide entre de 50 cm a 1,30 m de altura y olorosa. Las hojas presentan un color entre blanco a gris-verde, está constituido por unas flores pequeñas amarillentas que pueden medir de 3 a 5 mm de diámetro y salen en el mes de junio a septiembre. Originaria de Europa, se cultiva como ornamental en el Este de América del Norte, donde ahora crece de forma silvestre junto a los caminos. Crece en clima cálido, semicálido y templado, entre 297 y 3,100 msnm. Asociada a la vegetación perturbada del bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y subperennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de encino-pino y pino-encino (Martínez, 2009).

2.1.2 Propiedades farmacológicas.

Desde el punto de vista farmacológico, el ajenjo posee propiedades digestivas, actuando como tónico estomacal, carminativo, aperitivo, expectorante, antibacteriano y vermífugo. También tiene propiedades diuréticas por la presencia de elevadas concentraciones de sales de potasio. Se encuentra indicada en amorrea, dismenorrea, meteorismo, anorexia, disquinesia biliar, bronquitis y externamente como vulneraria. La planta tiene también propiedades vermífugas y emenagogas. También es un buen repelente de abejas, cuando se manipulan colmenas o cuando se quiere evitar la formación de las mismas en lugares inadecuados. (Llorens et al., 2008). En la tabla 2 se pueden apreciar algunas de las propiedades farmacológicas.

Tabla 2. Propiedades farmacológicas.

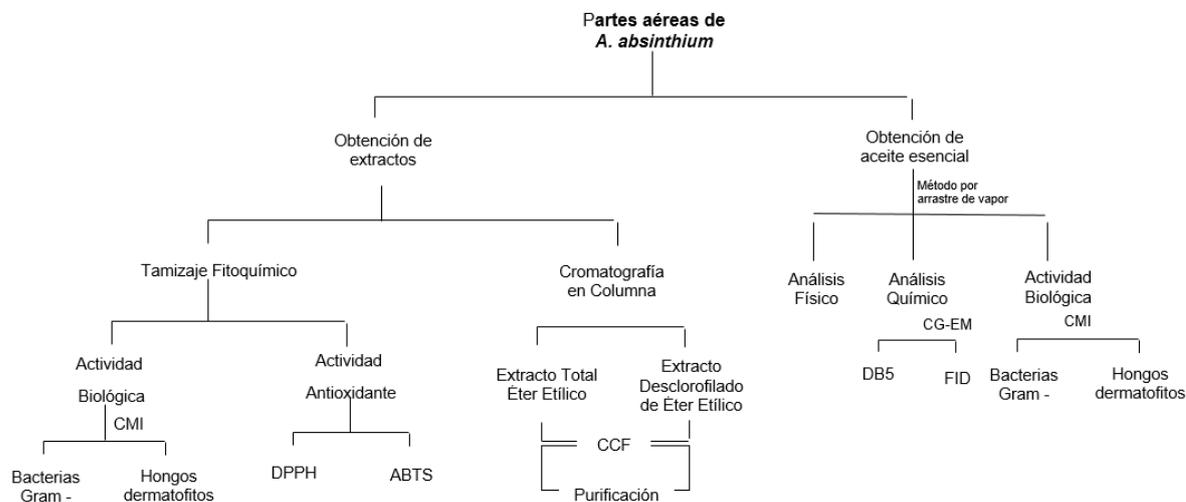
Acción	Efecto
Orexígeno	El ajeno estimula las papilas gustativas, las cuales por un efecto reflejo aumentan la producción de jugos gastrointestinales, estimulando el apetito.
Digestivo	El ajeno aumenta la producción de jugos gastrointestinales, favoreciendo la digestión.
Antiespasmódico	El ajeno produce una relajación del músculo liso
Protector hepático	En ensayos in vitro sobre hepatocitos e in vivo sobre ratón, se ha comprobado que el extracto metanólico de ajeno ejerce un efecto hepatoprotector frente a la toxicidad producida por acetaminofeno y tetracloruro de carbono.

Fuente: Montesdeorca, 2010

Elaboración: El Autor

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema general de la metodología empleada.



3.2 Recolección de la muestra.

La recolección de la muestra de la especie vegetal *Artemisia absinthium*, fue realizada el 19 de Febrero de 2013 con voucher ECU20139, en el sector de Catamayito, Parroquia El Tambo, Cantón Catamayo de la Provincia de Loja, a 1 kilómetro del aeropuerto de Catamayo en la finca del Sr. Luis Amable Castillo, con coordenadas geográficas 4.02.31,5 S ; 79.22.57,7 W. La clasificación taxonómica y morfológica la realizó el INIAP en la Estación Experimental Santa Catalina y la Granja Experimental Tumbaco.

3.3 Tamizaje fitoquímico.

Permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de ello orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Para la presente investigación se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico a partir de extractos etéreo, etanólico y acuoso utilizando la metodología descrita por Miranda (2002) y Ordoñez (2005) realizando su análisis por triplicado.

3.4 Obtención del extracto.

El material vegetal se deshidrató en una cámara de secado por 3 días en condiciones estables a 32°C. Se tomó 500g del material vegetal seco y se trituro, posteriormente fue sometido a maceración dinámica por un periodo de 4 horas con disolventes de polaridad creciente, Hexano, Acetato y Metanol por triplicado y consecutivamente, en el caso del Éter Etílico se partió de una muestra nueva de 500g la cual fue tratada únicamente con este disolvente. La extracción se realizó en forma triplicada con el mismo disolvente. Los extractos obtenidos de la maceración se separaron por filtración al vacío y se concentraron mediante rotavaporador a presión reducida a una temperatura de 30 grados centígrados. (Fig. 2)

Para facilitar la identificación y trabajo con los extractos obtenidos se los denominó como se muestra a continuación: Extracto total en Hexano (HxAA), Éter Etílico (EtAA) Acetato de Etilo (AcAA), Extracto en Metanol (MeAA).

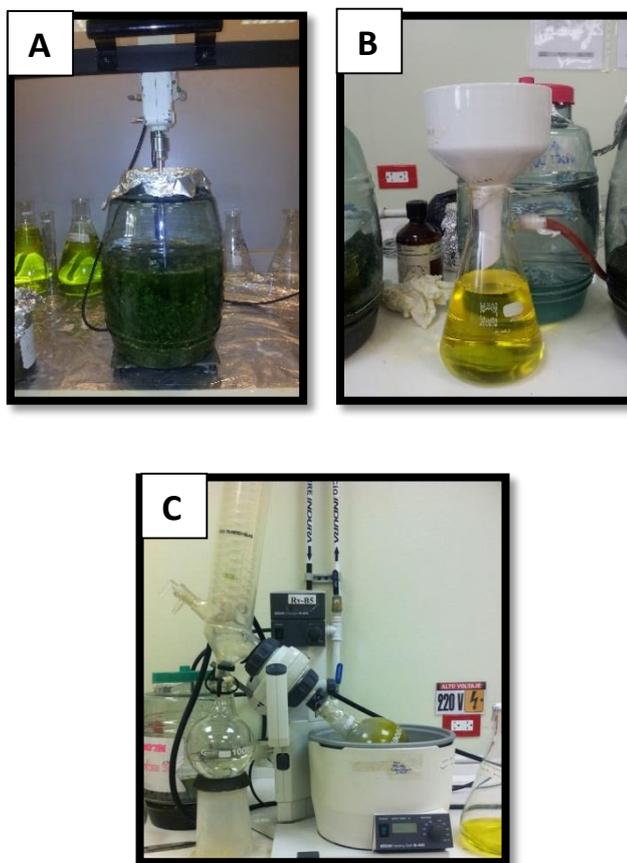


Figura 2. Obtención de los extractos.

A). Maceración dinámica (4 horas), B). Filtración al vacío, C). Rotaevaporación

Los cuatro extractos obtenidos (HxAA, EtAA, AcAA, MeAA) se almacenaron en refrigeración y se registraron los datos obtenidos con respecto al peso, para obtener el rendimiento total de los extractos en relación a la planta.

3.5 Análisis de los extractos.

Obtenidos los cuatro extractos en Hex, Éter Etílico, AcOEt, MeOH, se determinó su rendimiento utilizando la fórmula descrita en el Anexo 1. Utilizando placas de sílica gel 60, se observó los extractos con mayor riqueza y mejor separación de los compuestos. Cabe indicar que se realizó la CCF en fase directa e inversa, y a distintas polaridades (Fig. 3-4-5). Finalmente con los resultados obtenidos se decidió optar por desclorofilar el extracto total Etéreo el cual presentó mayor actividad biológica y riqueza de compuestos mediante CCF.

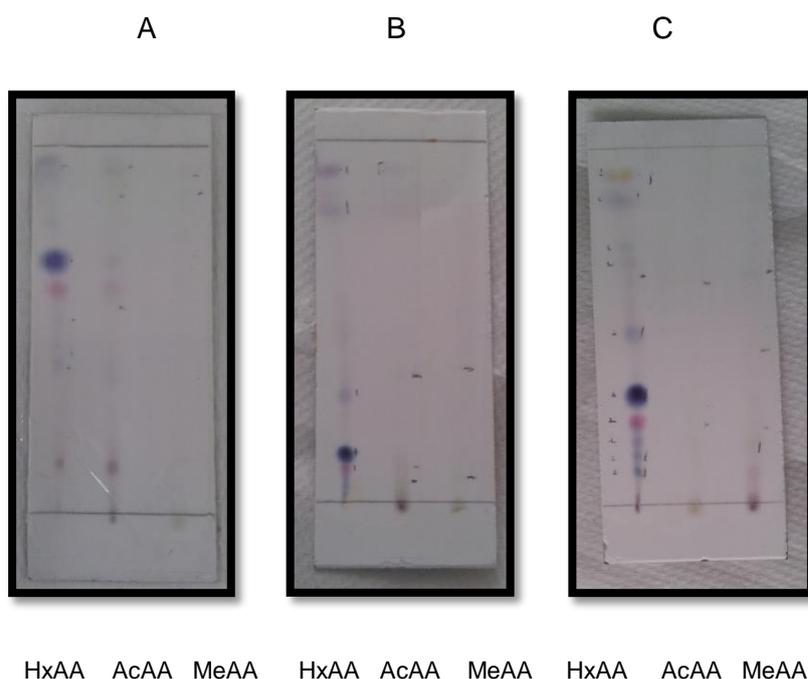
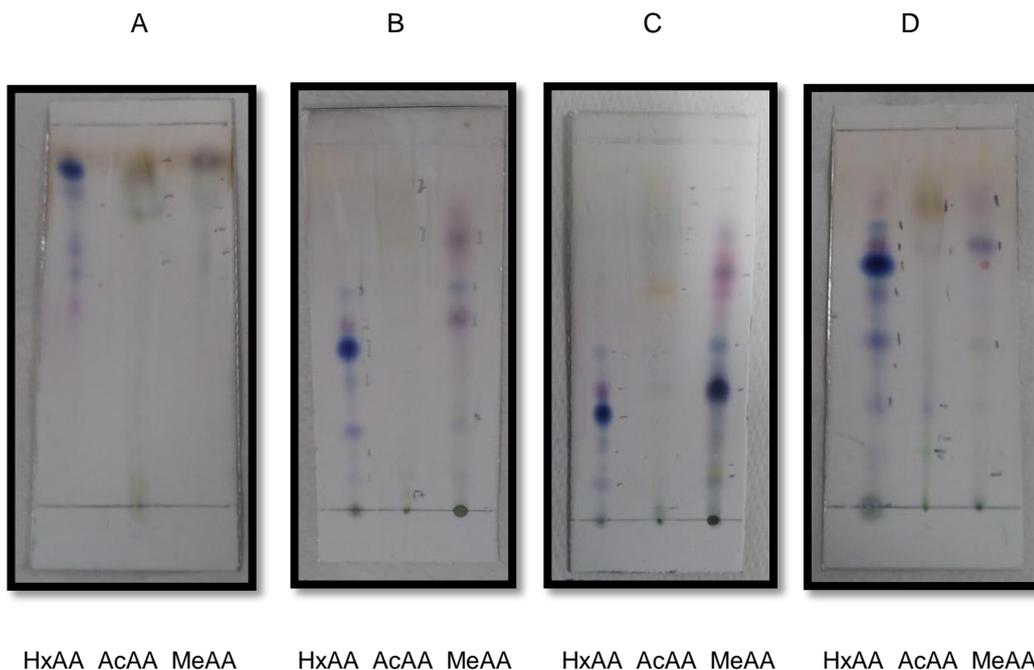


Figura 3. Placas de sílica gel CCF fase directa de los extractos HxAA, AcAA, MeAA.

(A) F. móvil: Hex-AcOEt 5:5 (v/v); B) F. móvil: Hex-AcOEt 8:2 (v/v); C) F. móvil: Hex-AcOEt 7: 3 (v/v)



HxAA AcAA MeAA HxAA AcAA MeAA HxAA AcAA MeAA HxAA AcAA MeAA

Figura 4. Placas de sílica gel CCF fase inversa de los extractos HxAA, AcAA, MeAA.

A) F. móvil: acetona 100%; B) F. móvil: MeOH- H₂O 8:2 (v/v); C) F. móvil: MeOH-H₂O 7:3 (v/v); D) F. móvil: MeOH- H₂O 9:1 (v/v)

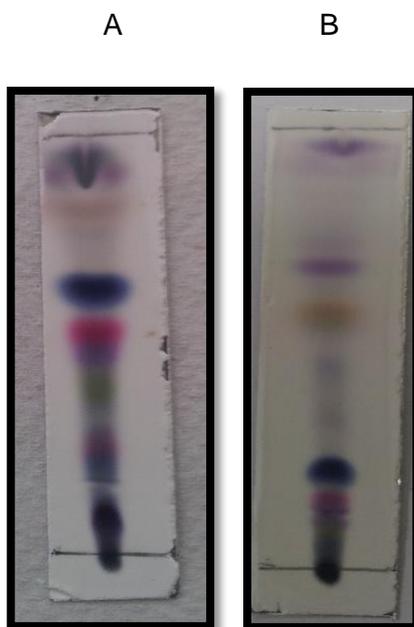


Figura 5. Placas de sílica gel CCF fase directa del extracto EtAA.

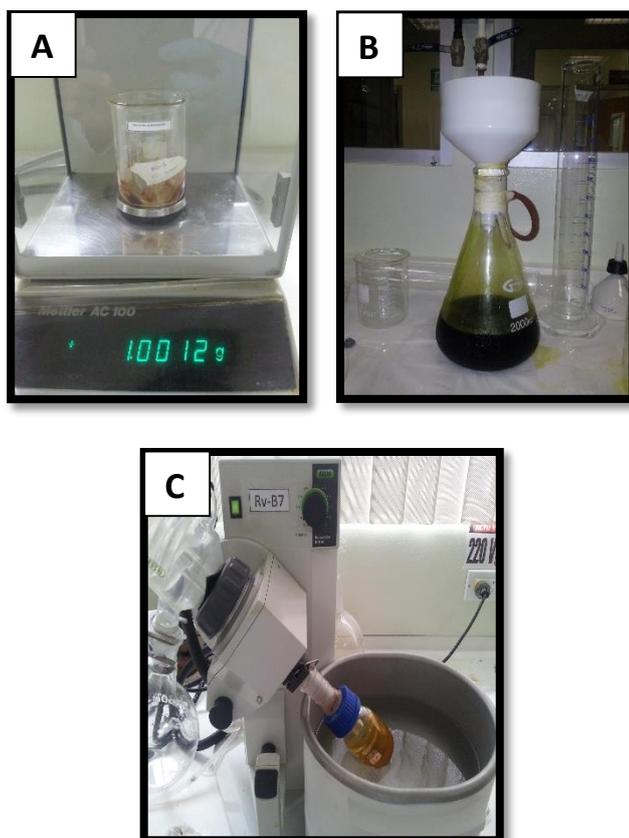
A) F. móvil: Hex-AcOEt 5:5 (v/v); B) F. móvil: Hex-AcOEt 8:2 (v/v)

3.6 Desclorofilación del extracto.

Para obtener extractos libres de clorofila y de esta forma facilitar el proceso de fraccionamiento procedemos a desclorofilar, para lo cual, empleamos una técnica de cromatografía en embudo büchner con sílica gel fase inversa. (Fig. 6)

Se sembró 10g del extracto total EtAA en 100g de sílica gel fase inversa en embudo büchner y se procedió a filtrar al vacío utilizando como eluyentes MeOH - H₂O 8:2 (v/v) (EtDAA1), MeOH - H₂O 9:1 (v/v) (EtDAA2) y MeOH 100% (EtDAA3). Las fracciones obtenidas concentraron en rotavaporador a presión reducida y 30°C. Se registró el peso obtenido y se etiqueto.

Finalmente con los resultados obtenidos de este proceso se decidió utilizar el extracto EtDAA1 el cual no presentó clorofilas.





EtDAA1 EtDAA2 EtDAA3

Figura 6. Proceso de desclorofilación.

A) Pesado de la muestra. B) Filtrado con eluyentes MeOH - H₂O 8:2 (EtDAA1), MeOH - H₂O 9:1 (EtDAA2), MeOH 100% (EtDAA3). C) Rotaevaporación de fracciones. D) CCF fase directa Hex-AcOEt 5:5 (EtDAA1- EtDAA2- MVD-3)

3.7 Fraccionamiento de los extractos.

Se realizó mediante cromatografía en columna (CC). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice 60 en una relación muestra sílice 1:100, y para la elución rápida de los compuestos del extracto se utilizó como fase móvil disolventes con un gradiente de polaridad ascendente (Hex, AcOEt y MeOH) aplicando una bomba de presión.

Para el proceso de fraccionamiento se decidió trabajar con el extracto de Éter de Etilo en dos diferentes columnas cromatográfica, partiendo de 5g de extracto sin desclorofilar EtAA para la primera y 3g de extracto desclorofilado EtDAA1 para la segunda, ambas en sílica gel fase directa y mediante CCF se determinó la proporción de disolventes de partida usando como referencia que la muestra que eluya como máximo a un R_f de 0,5.

3.7.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

Se realizó ensayos en cromatografía de capa fina (CCF) a las fracciones obtenidas, se utilizó una placa de sílica gel 60 F₂₅₄ fase directa y la visualización se realizó en el equipo de luz UV a una longitud de 254 y 360nm; además se corroboró esta información con el agente revelador utilizando ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 1% (Anexo 2). Las fracciones se unieron de acuerdo a su similitud y Rf que se obtiene aplicando la fórmula descrita en el Anexo 3.

3.8 Determinación de actividad biológica.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por el método de microdilución en caldo, que determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra las cepas de bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2®), bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) y para hongos dermatofitos: *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185).

3.9 Determinación de actividad antioxidante.

Para las medidas de la actividad antioxidante se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como control positivo y solo DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) o ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) como controles negativos (sin antioxidante). Los resultados expresados como µMol equivalentes de Trolox/g de muestra, indican que la muestra analizada tiene una actividad antioxidante equivalente a µMol de Trolox. En el caso de los fenoles totales, se empleó ácido gálico como estándar (control positivo) y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico. La ausencia de ácido gálico corresponde al control negativo.

3.10 Obtención del aceite esencial por el método de arrastre de vapor.

Se partió de 950g de muestra seca de partes aéreas de *A. absinthium* y se colocó en el equipo de destilación por arrastre de vapor. (Fig. 7)

Este método es una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial, finalmente se separan en un vaso Florentino.



Figura 7. Equipo de destilación por arrastre de vapor.

3.10.1 Determinación de la humedad.

Se obtuvo calculando la pérdida de peso al secado, se utilizó un instrumento de humedad el cual posee una lámpara de luz infrarroja para secar y una balanza sensible para pesar la muestra. Los resultados fueron obtenidos aplicando la fórmula descrita en el Anexo 4.

3.10.2 Determinación del rendimiento del aceite esencial.

Para la determinación del rendimiento se tomó en cuenta el peso total de la materia vegetal destilada y la cantidad de aceite esencial obtenido. El resultado fue obtenido aplicando la fórmula descrita en el Anexo 1.

3.11 Determinación de las propiedades físicas del aceite.

3.11.1 Densidad relativa.

La densidad relativa se obtuvo por el método del picnómetro. Se utilizó un picnómetro de 2mL y el resultado fue obtenido aplicando la fórmula descrita en el Anexo 5.

3.11.2 Índice de refracción.

El índice de refracción del aceite esencial se determinó según la norma ANFOR NF 75 -112 (Anexo 6) la determinación de esta propiedad se la realizó en el refractómetro ABBE.

3.12 Identificación de la composición química del aceite esencial.

Para la identificación de los compuestos del aceite esencial de la especie *Artemisia absinthium*, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (CG-EM) y al detector de ionización de llama (CG-FID), obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos, se realizó en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil – metilpolisiloxano) y DB-5 FID.

Para la obtención de los cromatogramas se utilizó el equipo cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, constituido con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, el cual cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, acoplado a un detector de ionización de llama.

3.12.1 Preparación de las muestras.

Se preparó una disolución de 990µL CH₂CL₂ grado HPLC y 10µL de aceite esencial, de similar forma se preparó para hidrocarburos de C₁₀ a C₂₅ que fueron inyectados en la columna DB-5MS en el CG-EM, dado que los tiempos de retención de los hidrocarburos nos sirven de base en la determinación de índices de Kóvats de cada compuesto.

3.12.2 Parámetros operacionales del CG-EM.

En la tabla 3 se describen los parámetros y características de la columna capilar DB-5MS y DB-5MS FID.

Tabla 3. Parámetros operacionales de las columnas capilares utilizadas.

	DB-5MS	DB-5MS FID
COLUMNA		
Modelo	Agilent 122-5532, de 0,25mm*30m*0,25µm	Agilent 122-3832, de 0,25mm*30m*0,25µm
Temperatura máxima	350°C	360°C
Flujo	Constante	Constante
Flujo inicial	0,9mL/seg	0,9mL/seg
Presión inicial	44,8 kPa	76,6 kPa
Velocidad promedio	35cm/seg	26cm/seg
INYECTOR		
Modo	Split	Split
Radio de partición	50:1	50:1
Temperatura	250°C	250°C
Gas	Helio	Helio
HORNO		
Temperatura inicial	50°C	50°C
Temperatura final	230°C	230°C
Gradiente de temperatura	2,5°C/min	2,5°C/min
DETECTOR		
Temperatura del detector	250°C	250°C
Gas portador	Helio	Helio

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental.

3.12.3 Determinación de los Índices de Kóvats (IK).

Los Índices de Kóvats (IK) se calcularon en base a la comparación de los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos a partir del C₁₀ hasta C₂₅ y los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial. Los valores obtenidos se determinaron mediante la fórmula descrita en el Anexo 7.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Tamizaje fitoquímico de la especie *A. absinthium*.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4. Resultado del Tamizaje Fitoquímico.

EXTRACTO	PRUEBA	RESULTADO 1	RESULTADO 2	RESULTADO 3
Etéreo	SUDAN	Positivo	Positivo	Positivo
	DRAGENDORFF	++	++	++
	MAYER	++	++	++
	WAGNER	++	++	++
	BALJET	Negativo	Negativo	Negativo
	LIEBERMANN-BURCHARD	Positivo	Positivo	Positivo
Etanólico	CATEQUINAS	Negativo	Negativo	Negativo
	RESINAS	Negativo	Negativo	Negativo
	FEHLING	Negativo	Negativo	Negativo
	DRAGENDORFF	+++	+++	+++
	MAYER	++	++	++
	WAGNER	++	++	++
	BALJET	++	++	++
	LIEBERMANN-BURCHARD	Positivo	Positivo	Positivo
	ESPUMA	Positivo	Positivo	Positivo
	CLORURO FERRICO	Negativo	Negativo	Negativo
	NINHIDRINA	Negativo	Negativo	Negativo
	SHINODA	Negativo	Negativo	Negativo
	ANTOCIANIDINAS	Negativo	Negativo	Negativo
KEDDE	Negativo	Negativo	Negativo	
Acuoso	FEHLING	Negativo	Negativo	Negativo
	DRAGENDORFF	+++	+++	+++
	MAYER	Negativo	Negativo	Negativo
	WAGNER	++	++	++
	ESPUMA	Positivo	Positivo	Positivo
	CLORURO FERRICO	Positivo	Positivo	Positivo
	SHINODA	Positivo	Positivo	Positivo
	MUCILAGOS	Negativo	Negativo	Negativo
	P. AMARGOS Y ASTRINGENTES	Positivo	Positivo	Positivo
(+) = Opalescencia (++) = Turbidez (+++) = Precipitado				

A partir del análisis confirmamos la presencia de algunos grupos de principios activos como alcaloides, ácidos grasos, terpenos, cumarinas, flavonoides, azúcares reductores, fenoles y saponinas datos comparables a los obtenidos por Lazar (2010) variando su resultados al indicar la presencia de mucilagos y ausencia de saponinas.

4.2 Extractos obtenidos de la especie *A. absinthium*.

En la tabla 5 se describe el peso y rendimiento de los extractos HxAA, EtAA, AcAA y MeAA a partir de 500g de muestra vegetal seca. Así como los resultados del proceso de desclorofilación del extracto EtAA.

Tabla 5. Peso y rendimiento de los extractos y derivados obtenidos de *A. absinthium*.

EXTRACTO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	RENDIMIENTO (%)
Extracto total en Hex (HxAA)	500	11,74	2,34
Extracto total en Éter Etilico (EtAA)	500	36,18	7,23
Extracto total en AcOEt (AcAA)	500	18,65	3,73
Extracto total en MeOH (MeAA)	500	16,81	3,36
Extracto total en Éter Etilico desclorofilado (EtDAA1)	10	3,42	34,2
Extracto total en Éter Etilico desclorofilado (EtDAA2)	10	1,24	12,4
Extracto total en Éter Etilico desclorofilado (EtDAA3)	10	0,57	5,7

4.2.1 Actividad antimicrobiana de la especie *A. absinthium*.

Se considera que si un extracto o compuesto presenta una CMI <100 µg/mL la actividad antimicrobiana es buena, de 100 a 500 µg/mL moderada, de 500 a 1000 µg/mL mala, y >1000 µg/mL nula (Holetz, *et al.*, 2002). De acuerdo a esto, el extracto etéreo de *Artemisia absinthium* (15,63 µg/mL) presentó una buena actividad frente a *S. aureus*; dado que no se

pudo aislar compuestos de los extractos obtenidos no se puede determinar el o los compuestos que le confieren su capacidad antimicrobiana. En el caso del aceite esencial en literatura se reporta su actividad contra *S. aureus* (Moslemi, 2012), atribuyendo su actividad antimicrobiana a camphor, p-cymene, caryophyllene, α -pinene y β -pinene de los cuales p-cymene y α -pinene estuvieron presentes en cantidades minoritarias en nuestra planta en estudio. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	MUESTRA	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	M.O. sensible	Control (+)	Control (-)
Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>	Extracto	250	<i>P. vulgaris</i>	Gentamicina Sa y Pv: 0,195 mg/ μL Ef. 0,7812 ug/mL	DMSO 5%
		Etéreo	15,62	<i>S. aureus</i>		
		Extracto Acuoso	1000	<i>S. aureus</i>		
		Extracto Etanólico	NA	-		
		Extracto Hex	NA	-		
		Extracto AcOEt	NA	-		
		Extracto MeOH	NA	-		
		Aceite Esencial	NA	-		
NA: No presentó actividad en ningún microorganismo, bajo ninguna concentración.						

4.2.2 Actividad antioxidante de la especie *A. absinthium*.

Los resultados obtenidos de *Artemisia absinthium* para actividad antioxidante se los puede apreciar en la tabla 7, expresando mayor actividad antioxidante en el extracto metanólico desclorofilado: ABTS $471,333 \pm 6,138 \mu\text{Mol Trolox/g}$ extracto; DPPH $710,352 \pm 4,725 \mu\text{Mol Trolox/g}$ extracto; fenoles totales $59,399 \pm 1,477 \text{ mg ac. Galico/g}$ extracto; y el extracto el etéreo: ABTS $289,282 \pm 10,475 \mu\text{Mol Trolox/ g}$ extracto; DPPH $759,303 \pm 16,766 \mu\text{Mol Trolox/g}$ extracto; fenoles totales $22,179 \pm 1,553 \text{ mg ac. Galico/g}$ extracto. (Fig. 8)

Tabla 7. Actividad antioxidante

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	EXTRACTO	ABTS (μMol Trolox/g extracto)	DPPH (μMol Trolox/g extracto)	FENOLES TOTALES (mg ac. Galico/g extracto)
Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>	Etéreo	289,282 ± 10,475	759,303 ± 16,766	22,179 ± 1,553
		Etanólico	399,538 ± 2,701	309,707 ± 8,201	38,295 ± 1,226
		Acuoso	215,521 ± 3,683	97,283 ± 21,888	21,067 ± 1,182
		Hex.	96,611 ± 7,887	23,130 ± 4,525	No identificado
		Hex Desclorofilado	408,278 ± 3,127	206,833 ± 10,816	No identificado
		AcOEt	229,389 ± 3,735	116,833 ± 2,422	9,249 ± 0,786
		AcOEt Desclorofilado	374,528 ± 4,683	179,056 ± 7,474	35,958 ± 0,702
		MeOH	161,333 ± 7,717	86,463 ± 6,195	5,214 ± 1,424
		MeOH Desclorofilado	471,333 ± 6,138	710,352 ± 4,725	59,399 ± 1,477

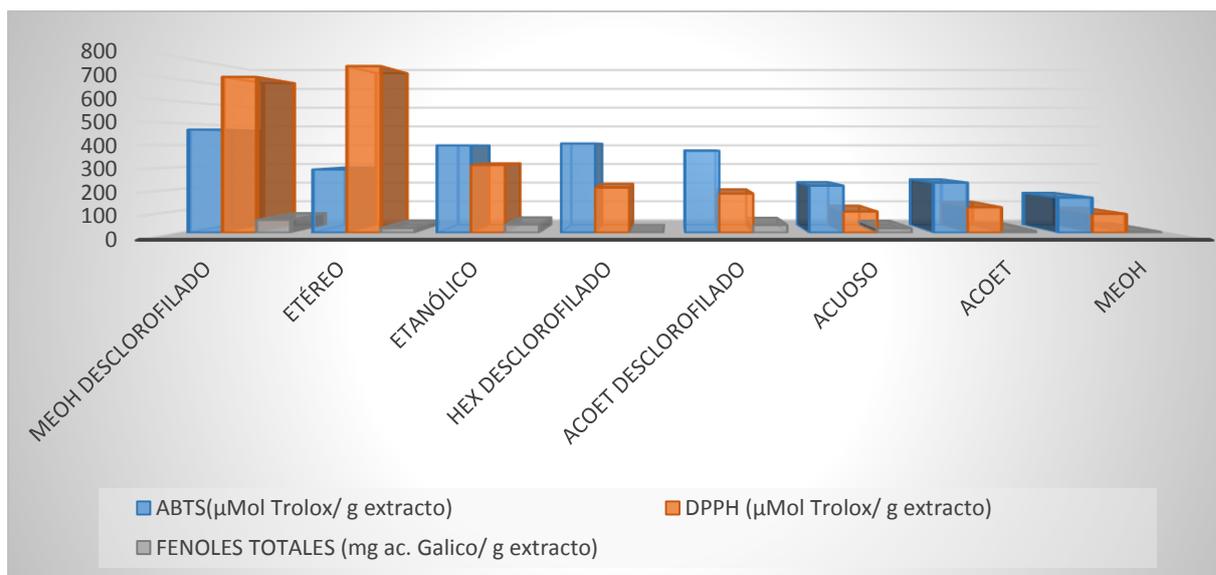


Figura 8. Actividad Antioxidante.

4.3 Fraccionamiento del extracto EtAA.

Del Extracto en Éter Etilico sin desclorofilar (EtAA) se obtuvo 163muestras con un volumen aproximado de 50mL de las cuales se determinó 34 fracciones. En la tabla 8 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las muestras fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron. Se realizó CCF en fase directa en intervalo de muestras para determinar el número de fracciones.

Tabla 8. Fraccionamiento cromatográfico del extracto EtAA.

MUESTRAS	PROPORCION	MEZCLA DE SOLVENTES	APARIENCIA
1-12	90:10	Hex-AcOEt	Aceitoso
13-24	80:20	Hex-AcOEt	Aceitoso
25-36	70:30	Hex-AcOEt	Aceitoso
37-48	60:40	Hex-AcOEt	Aceitoso
49-60	50:50	Hex-AcOEt	Aceitoso
62-72	40:60	Hex-AcOEt	Aceitoso
73-84	30:70	Hex-AcOEt	Aceitoso
85-96	20:80	Hex-AcOEt	Aceitoso
97-108	10:90	Hex-AcOEt	Aceitoso

109-120	100	AcOEt	Aceitoso
121-132	90:10	AcOEt- MeOH	Aceitoso
133-149	80:20	AcOEt- MeOH	Aceitoso
150-163	100	MeOH	Aceitoso

4.3.1 Unión de fracciones EtAA.

Las fracciones se unieron de acuerdo a su Rf y similitud. (Tabla 9)

Tabla 9. Fracciones unidas extracto EtAA.

FRACCIONES UNIDAS	APARIENCIA	DENOMINACION	Peso (mg)
1-7	aceitoso	FU1	128,8
8-11	aceitoso	FU2	50,3
12-21	aceitoso	FU3	16,1
22-28	aceitoso	FU4	1185,4
29-32	aceitoso	FU5	319,8
33-34	aceitoso	FU6	87,3
35-36	aceitoso	FU7	113,9
37-41	aceitoso	FU8	144,6
42-45	aceitoso	FU9	166,1
46-48	aceitoso	FU10	265,8
49-52	aceitoso	FU11	263,8
53-54	aceitoso	FU12	167,1
55-56	aceitoso	FU13	136,2
57-58	aceitoso	FU14	59,1
59-60	aceitoso	FU15	48,2
61-64	aceitoso	FU16	88,3
65-69	aceitoso	FU17	97,6
70-71	aceitoso	FU18	55,6
72-76	aceitoso	FU19	207,1
77-78	aceitoso	FU20	38,1
79-93	aceitoso	FU21	102,6
94-96	aceitoso	FU22	77,2

97-98	aceitoso	FU23	30,6
99-101	aceitoso	FU24	31,7
102-104	aceitoso	FU25	9,4
105-109	aceitoso	FU26	9,2
110	aceitoso	FU27	7,7
111	aceitoso	FU28	5,3
112-121	aceitoso	FU29	51,1
122-124	aceitoso	FU30	16,6
125-126	aceitoso	FU31	9,4
127-129	aceitoso	FU32	8,5
130-137	aceitoso	FU33	23,7
138-163	aceitoso	FU34	6,3

4.4 Fraccionamiento del extracto EtDAA1.

Del Extracto en Éter Etílico desclorofilado (EtDAA1) se obtuvo 274 muestras con un volumen aproximado de 100mL de las cuales se determinó 18 fracciones. En la tabla 10 se exponen los disolventes empleados y las proporciones a las cuales las muestras fueron eluidas así como también la apariencia que presentaron. Se realizó CCF en fase directa en intervalo de muestras para determinar el número de fracciones.

Tabla 10. Fraccionamiento cromatográfico del extracto EtDAA1.

FRACCIONES	PROPORCION	MEZCLA DE SOLVENTES	APARIENCIA
0	100	Hex	Sin muestra
1-20	95:05	Hex-AcOEt	Aceitoso
21-40	90:10	Hex-AcOEt	Aceitoso
41-60	85:15	Hex-AcOEt	Aceitoso
61-80	80:20	Hex-AcOEt	Aceitoso
81-100	75:25	Hex-AcOEt	Aceitoso
101-120	70:30	Hex-AcOEt	Aceitoso
121-140	65:35	Hex-AcOEt	Aceitoso
141-160	60:40	Hex-AcOEt	Aceitoso
161-180	55:45	Hex-AcOEt	Aceitoso

181-200	50:50	Hex-AcOEt	Aceitoso
201-220	45:55	Hex-AcOEt	Aceitoso
221-240	40:60	Hex-AcOEt	Aceitoso
241-260	25:75	Hex-AcOEt	Aceitoso
261-270	10:90	Hex-AcOEt	Aceitoso
271-272	50:50	AcOEt- MeOH	Aceitoso
273-274	100	MeOH	Aceitoso

4.4.1 Unión de fracciones EtDAA1.

Las fracciones se unieron de acuerdo a su Rf y similitud. (Tabla 11)

Tabla 11. Fracciones unidas extracto EtDAA1.

FRACCIONES UNIDAS	APARIENCIA	DENOMINA-CION	Peso (mg)
1-5	Aceitoso	DFU1	35,5
6-10	Aceitoso	DFU2	42,8
11-15	Aceitoso	DFU3	72
22-29	Aceitoso	DFU4	172,1
30-38	Aceitoso	DFU5	70,5
39-47	Aceitoso	DFU6	98,4
48-60	Aceitoso	DFU7	166,3
61-70	Aceitoso	DFU8	113,9
71-79	Aceitoso	DFU9	94,8
80-84	Aceitoso	DFU10	10,7
85-91	Aceitoso	DFU11	132,8
92-104	Aceitoso	DFU12	107,4
105-123	Aceitoso	DFU13	109,2
130-136	Aceitoso	DFU14	57,2
153-164	Aceitoso	DFU15	91,1
167-187	Aceitoso	DFU16	381,2
190-227	Aceitoso	DFU17	248,7
248-269	Aceitoso	DFU18	70,7

4.5 Purificación de fracciones.

Considerando la riqueza de las fracciones unidas obtenidas del Extracto EtAA y EtDAA1 se procedió a realizar un aislamiento de compuestos a través de micro columnas obteniendo mezclas de compuestos, los mismos que no fue posible purificar ni determinar por la mínima cantidad de muestra resultante. En el caso de la fracción DFU4 se logró llegar a una mezcla donde mediante CG-EM identificó dos compuestos (Fig. 9); el primero con un tiempo de retención de 19,20 minutos y porcentaje de área relativo de 12,72%, el 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl (Fig. 10) con una probabilidad del 92% el mismo que fue reportado en *A. armeniaca* (Mojarrab, 2013) y el segundo con un tiempo de retención de 19,33 minutos y porcentaje de área relativo de 20,15%, el 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin (Fig.10) con una probabilidad del 95% el mismo que es un contaminante ambiental perteneciente al grupo de los almizcles sintéticos (Osemwengie, 2001); logrando ser identificados únicamente por comparación entre los espectros obtenidos y los de la base de datos Wiley 7n.1 y NIST. (Fig 11 y 12)

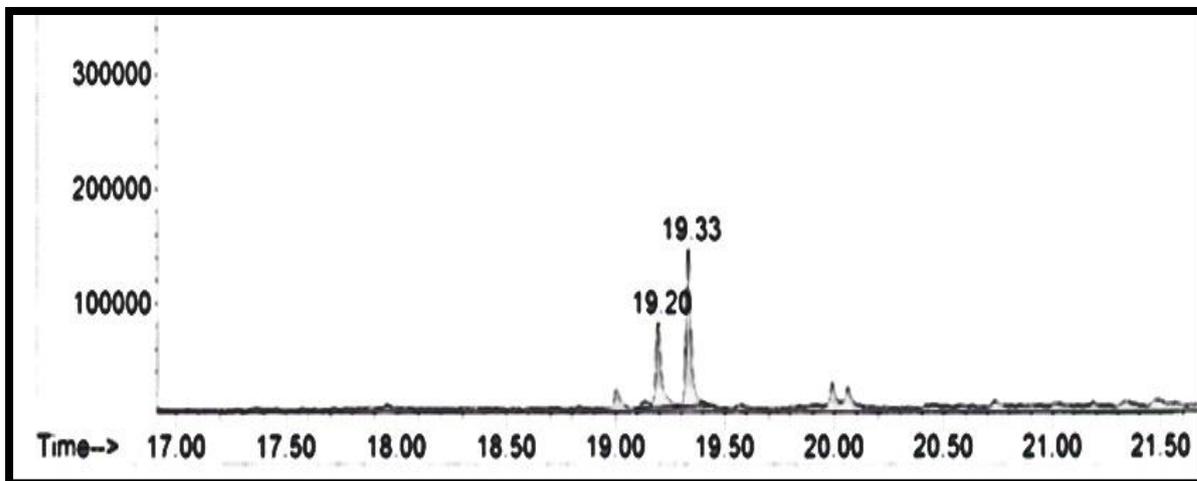
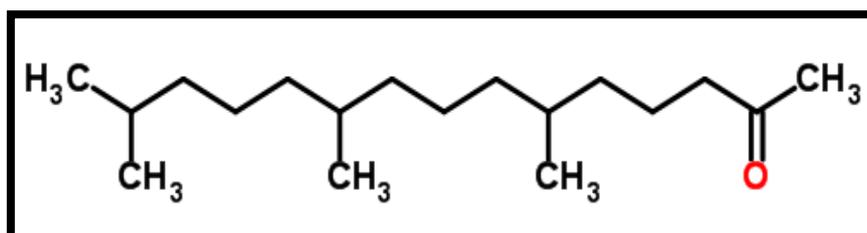


Figura 9. Espectro de masas (CG-EM) fracción DFU4

A



B

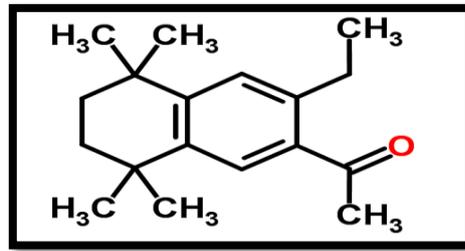
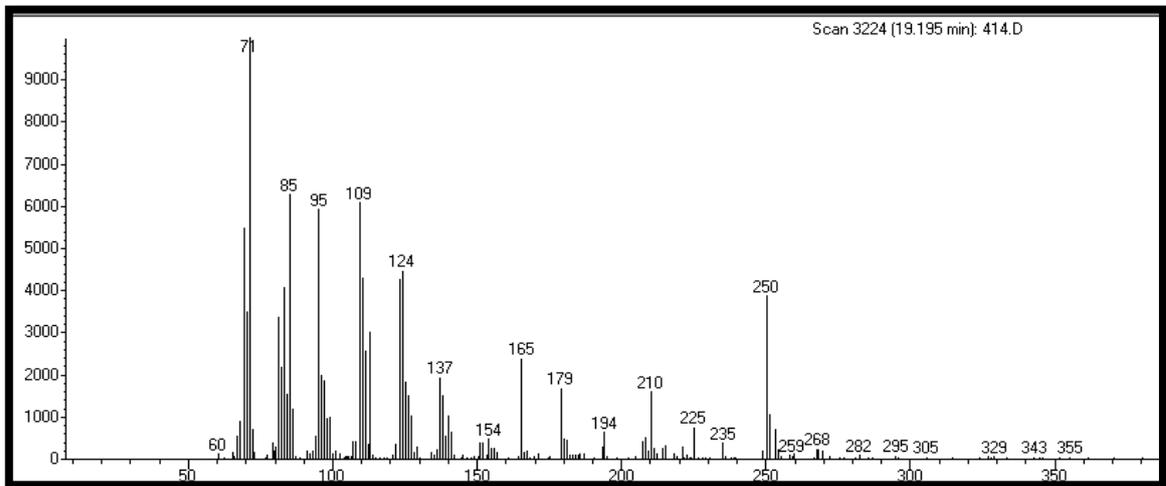


Figura 10. Estructura química de los compuestos identificados en la fracción DFU4

(A) 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl. B) 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin

A



B

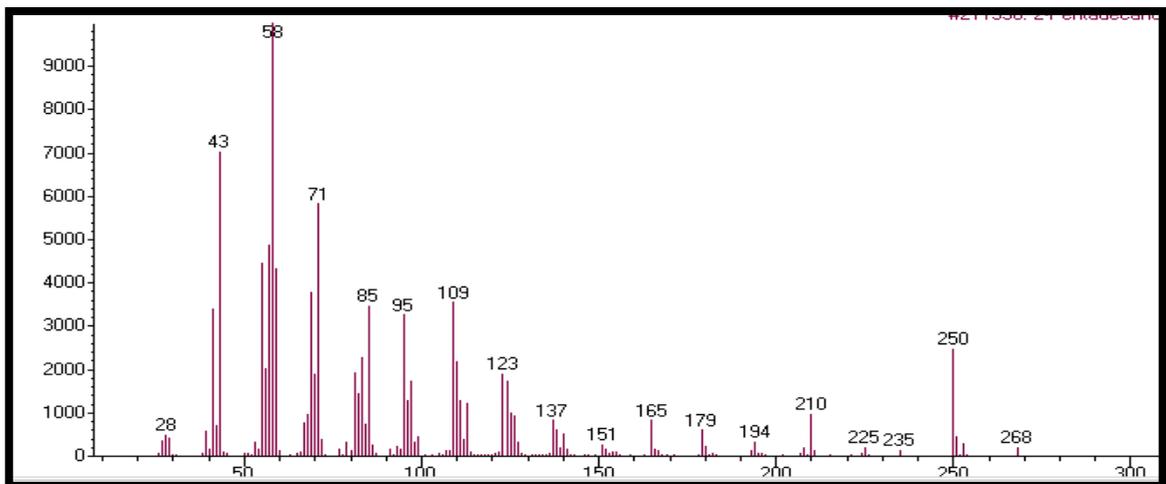
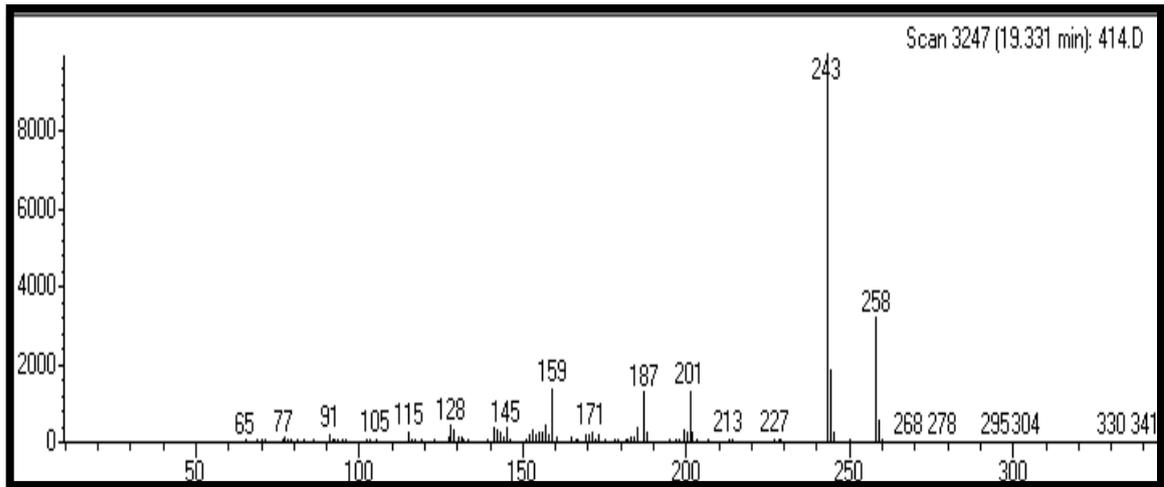


Figura 11. Espectros CG-EM de 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl

(A) Espectro obtenido de CG-EM. B) Espectro obtenido de la base de datos de Wiley 7n.1

A



B

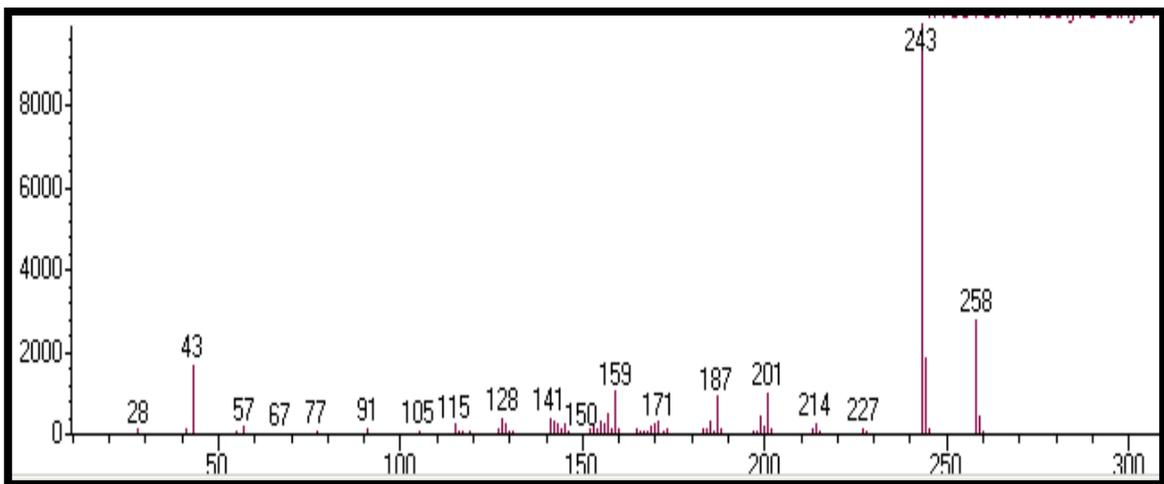


Figura 12. Espectros CG-EM de 7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4-tetramethyltetralin

A) Espectro obtenido de CG-EM. B) Espectro obtenido de la base de datos de Wiley 7n.1

4.6 Porcentaje de humedad.

En la tabla 12 se presenta el promedio de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación por triplicado.

Tabla 12. Porcentaje de humedad.

Código	Hm (%)	\bar{X}	Σ	CV
AA 1	76,10	75,33	1,20	1,44
AA 2	75,95			
AA 3	73,95			
AA: <i>Artemisia absinthium</i> \bar{X} : Promedio σ : Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación				

4.7 Rendimiento del aceite esencial.

El rendimiento obtenido fue de 0,52 % valor que se encuentra acorde a la literatura donde se considera esta en torno al 0,2 y 0,5 % (Navarro, 2012).

4.8 Propiedades físicas del aceite esencial.

El aceite esencial de *A. Absinthium* es líquido a temperatura ambiente y en refrigeración, presentando una coloración café oscura.

4.8.1 Densidad.

En la tabla 13 se presenta el promedio de densidad, desviación estándar y coeficiente de variación por triplicado.

Tabla 13. Densidad.

Código	Densidad	\bar{X}	Σ	CV
AA 1	0,940	0,938	0,002	0,0000067
AA 2	0,937			
AA 3	0,935			
AA: <i>Artemisia absinthium</i> \bar{X} : Promedio σ : Desviación Estándar CV: Coeficiente de Variación				

La densidad promedio del aceite esencial obtenida es de 0,938 g/cm³ la cual guarda relación a la reportada por Morales et al., (2002) que fue de 0,921 g/cm³.

4.8.2 Índice de refracción.

No fue posible determinar el índice de refracción debido a que el aceite esencial presentó una coloración café oscura lo cual impidió determinar su refracción dado que el haz de luz era absorbido por la muestra disminuyendo su capacidad de reflexión.

4.9 Composición química del aceite esencial de la especie *A. absinthium*.

La determinación de la composición química se realizó en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM) utilizando la columna capilar DB-5MS basándose en las comparación de los espectros de masa con los espectros de la base de datos Wiley 7n.1 del equipo y los índices de Kóvats calculados y corroborando con los reportados en la literatura. Se identificaron un total de 10 compuestos que corresponden a un 93,80 % de los compuestos totales del aceite esencial (Tabla 14) y su cromatograma se lo puede apreciar en la figura 13.

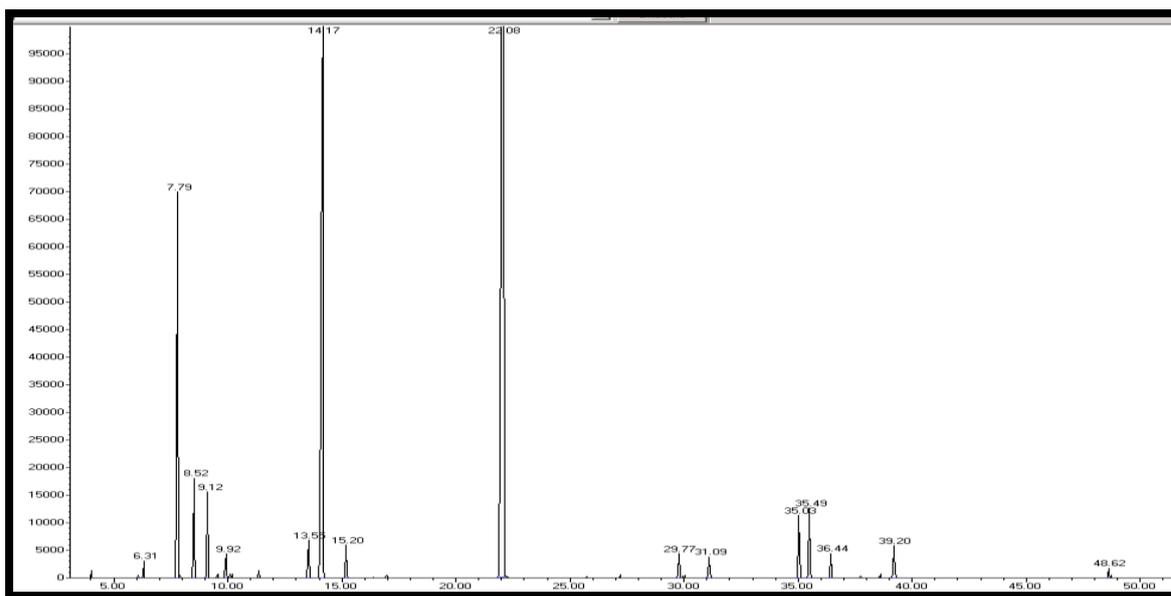


Figura 13. Cromatograma del aceite esencial de *A. absinthium* en DB-5MS.

Los componentes mayoritarios del aceite esencial, pueden constituir hasta un 85% del total, mientras que el resto se presentan como trazas dado que la concentración del compuesto concreto en el total de la mezcla del aceite de la planta puede ser muy variable, debido a condiciones climáticas, de crecimiento, destilación y la forma de almacenamiento.(Zekaria, 2007).

Tabla 14. Composición química del aceite esencial de *A. absinthium*.

Pico #	Compuestos ^a	DB-5MS		% Cantidad	% Cantidad
		IK ^b	IK ^{ref}	Relativa DB-5MS	Relativa DB-5 FID
1	α -Pinene	940	939 ^c	0,29	0,51
2	Sabinene	973	976 ^c	8,25	8,92
3	β -Myrcene	989	991 ^c	2,03	2,83
4	α -Phellandrene	1002	1005 ^c	1,82	1,97
5	p-Cymene	1021	1026 ^c	0,52	0,60
6	β -Thujone	1117	1114 ^c	20,65	22,83
7	Sabinol	1140	1142 ^d	0,71	1,32
8	Sabinyl acetate	1291	1298 ^e	57,76	48,08
9	cis-Muurolo-4(14),5-diene	1472	1466 ^c	0,75	1,14
10	Chamazulene	1719	1714 ^f	1,01	1,00
			TOTAL	93,80	89,20

IK^b = Índices de Kóvats determinados experimentalmente
IK^{ref} = Índices de Kóvats de acuerdo a referencias bibliográficas
a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en le columna DB-5MS
IK^{ref}, Literatura: ^cref, ^dref, ^eref, ^fref. (Anexo 8)

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial fueron: Sabinyl acetate (57,76%), β -Thujone (20,65%), Sabinene (8,25%) y en menor proporción: β -Myrcene (2,03%), α -Phellandrene (1,82%), Chamazulene (1,01%) y cis-Muurolo-4(14),5-diene (0,75%), Sabinol (0,71%), p-Cymene (0,52 %), α -Pinene (0,29%) (Fig. 14). En comparación a investigaciones previas se reporta: Sabinyl acetate (27,2 %), β -Thujone (40.2%) como compuestos mayoritarios analizados de una muestra comercial de aceite esencial de *A. absinthium* (Bailen et al., 2013) demostrando una diferencia cuantitativa pero no así en el aspecto cualitativo que expresan similitud; mientras que en un análisis realizado de una muestra

recolectada en Croacia se reporta: β -Thujone (20,9%) como compuesto mayoritario y Sabinyl acetate (5,7 %), Sabinene (7,7%), α -Phellandrene (6,0%) y Chamazulene (1,2), p-Cymene (0,6 %) en menor proporción (Juteau et al., 2003) corroborando así al β -Thujone como compuesto mayoritario, existiendo una diferencia notable del Sabinyl acetate entre las investigaciones realizadas. En el caso del cis-Muurolo-4(14),5-diene no se reportó en literatura para la especie *A. absinthium* pero si existe una referencia den la especie *A. annua* en el cual se presenta en un 0,3% (Cavar, 2011).

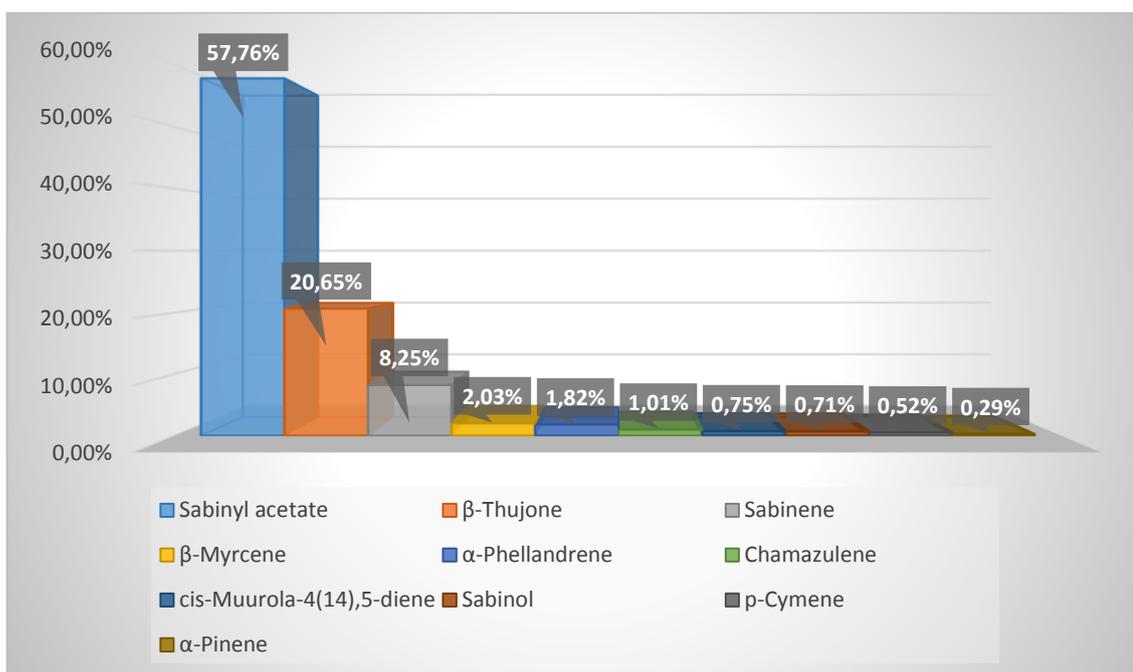


Figura 14. Compuestos identificados del aceite esencial de *A. absinthium*.

4.9.1 Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB5 (MS) y DB5 (FID).

Entre los criterios de identificación tentativa en GC-FID, están la comparación de los tiempos de retención (t_r) de las sustancias de referencia con los tiempos de retención de los analitos en la muestra y la determinación de sus índices de Kóvats (IK), calculados bajo las mismas condiciones operacionales usados para los patrones. De acuerdo a la correlación realizada entre MS y FID se determinó la presencia de los compuestos en ambos detectores con una pequeña variación en cuanto al porcentaje de los compuestos.

4.9.2 Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *A. absinthium*.

Los espectros que se muestran en la figura 15-16-17 corresponden a los compuestos más representativos presentes en el aceite esencial.

Sabinyl acetate

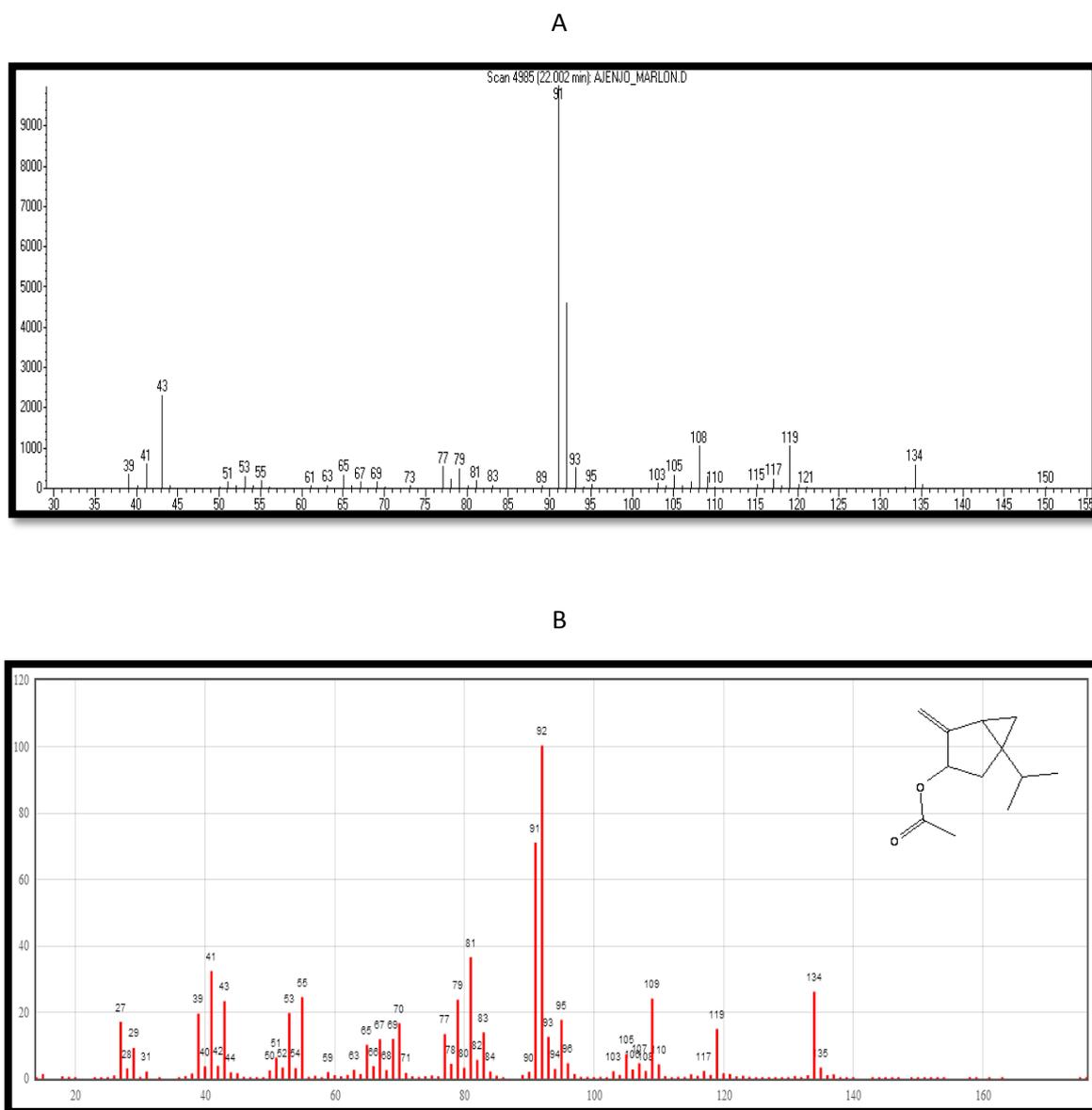


Figura 15. Sabinyl acetate

A) Espectro obtenido de CG-EM. B) Espectro obtenido de la base de datos de NIST

β -Thujone

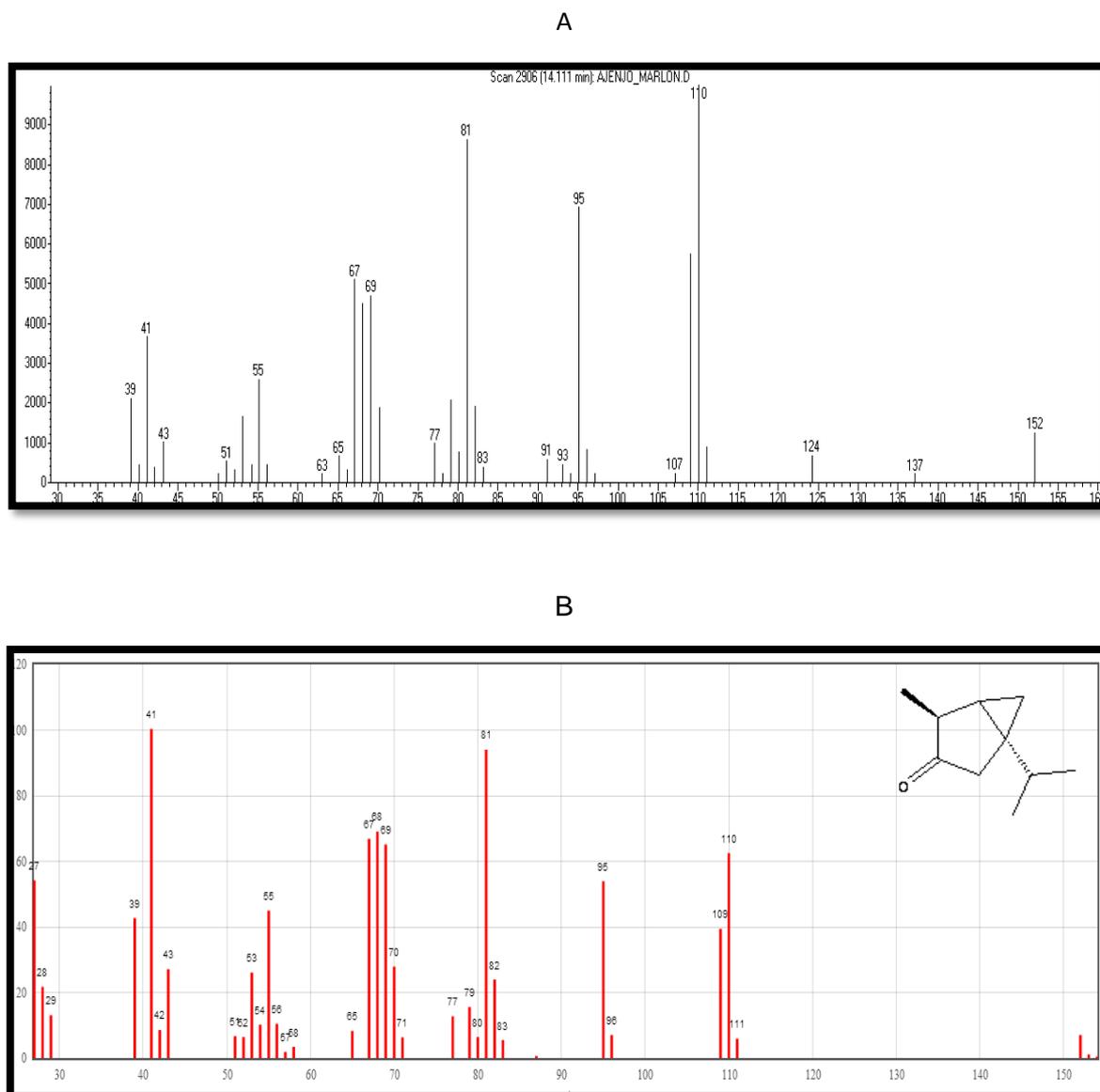
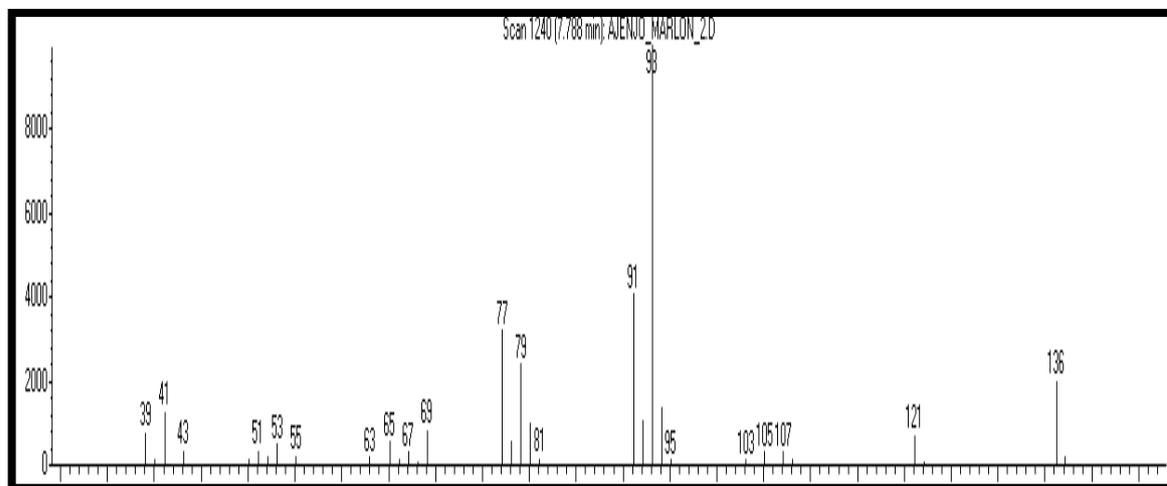


Figura 16. β -Thujone

A) Espectro obtenido de CG-EM. B) Espectro obtenido de la base de datos de NIST

Sabinene

A



B

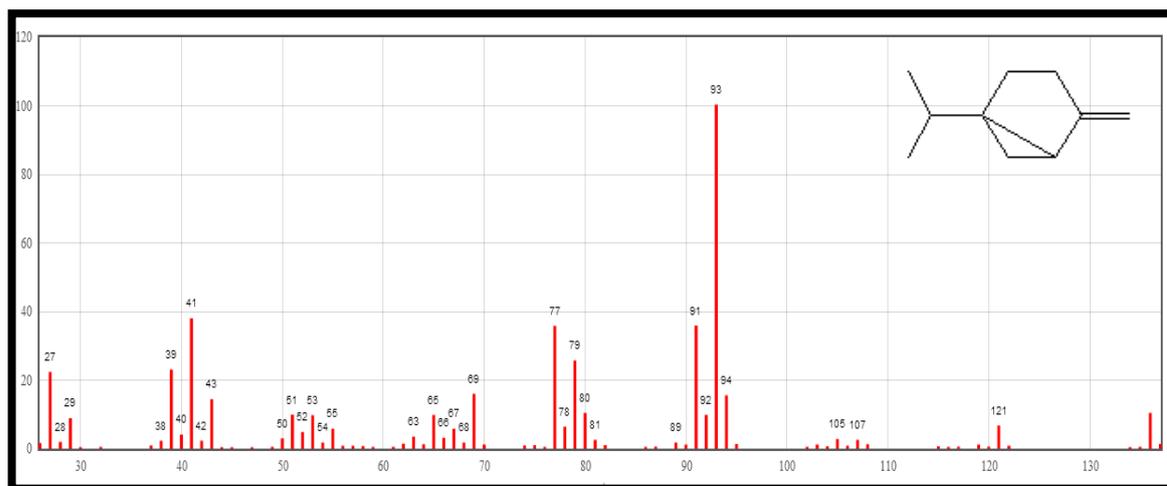


Figura 17. Sabinene

A) Espectro obtenido de CG-EM. B) Espectro obtenido de la base de datos de NIST

CONCLUSIONES

- Las propiedades físicas de los aceites esenciales de *A. absinthium* obtenidos fueron: promedio total de humedad 73,33%, rendimiento de 0,52%, densidad 0,938 gr/cm³ y índice de refracción indeterminado.
- El índice de refracción no se pudo determinar presumiblemente a su color café anaranjado oscuro consistente con lo reportado en literatura, el que podría estar absorbiendo el haz de luz y disminuyendo así la capacidad de refracción.
- Los compuestos determinados en el aceite esencial se encuentran entre los ya reportados en literatura con ciertas variaciones cuantitativas pero no así en el aspecto cualitativo lo que se puede atribuir a su genotipo y condiciones ambientales lo que afectan la biosíntesis de metabolitos secundarios.
- El aceite esencial de *A. absinthium* está compuesto principalmente por terpenos y monoterpenos. Un total de 10 compuestos fueron identificados en la columna DB-5 MS constituyendo el 93.80% del total del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios fueron: Sabinyl acetate (57,76%), β -Thujone (20,65%) y Sabinene (8,25%).
- El extracto de Éter Etílico expresó una CMI buena contra *S. aureus* y moderada para *P. vulgaris* con valores de CMI de 15,62 μ g/mL y 250 μ g/mL respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de la especie vegetal *Artemisia absinthium* utilizando técnicas de concentración aplicable a compuestos volátiles como la microextracción en fase sólida (SPME) o estandarizando nuevos métodos con el fin de determinar los compuestos responsables de las propiedades terapéuticas que se le atribuyen a la planta.
- Realizar recolecciones de diferentes lugares que se encuentre la especie *A. absinthium*, para poder determinar las condiciones óptimas que expresen un mayor rendimiento del aceite esencial y riqueza en metabolitos secundarios.
- Continuar realizando estudios en especies vegetales con antecedentes etnobotánicas y endémicas de nuestra región, con el fin de respaldar científicamente la aplicación medicinal de las mismas.

BIBLIOGRAFIA

- Andrade, J. (2012). *Las plantas medicinales y su riqueza ancestral*. Revista Perspectivas desde la ciencia. (11):7-8.
- Bailen, M., Julio, L., Diaz, C., Sanz, J., Martínez, R., Cabrera, R., Burillo, J., Gonzales, A. (2013). *Chemical composition and biological effects of essential oils from Artemisia absinthium L. cultivated under different environmental conditions*. Industrial Crops and Products. (49):102-107.
- Cavar, S., Maksimovic, M., Vidic, D., Paric, A. (2011). *Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of Artemisia annua L. from Bosnia*. Industrial Crops and Products. (37):479-485,
- Chalala, M., García, D., Crespo M., Rodríguez, C., Hechevarría, I. (2004). *Evaluación y control de calidad de la tintura homeopática de Artemisia absinthium L.* Revista Cubana Plant Med. 9(1).
- Chiriboga, J. (1997). *Biodiversidad, Bioprospección y Bioseguridad. Los fitofármacos: Un sistema alternativo de atención primaria de salud*. Quito. 151-159.
- Comision Economica para America Latina (CEPAL). (2005). *Biotechnologia para el uso sostenible de la biodiversidad: Capacidades locales y mercados potenciales*.
- Cruz, A., Padilla, I., Garcia, E. (2009). *Laboratorio de química bioorgánica. Manual de prácticas*. Instituto Politécnico Nacional. México. 105-111
- De la Torre, L., Alarcón, D., Lars, P., & Salazar, J. (2011). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Usos medicinales de las plantas*. Obtenido de Herbario QCA & Herbario AAU. Quito. 1(3):8-12,
- Del Vitto, L., Petenatti, M. (2009). *Asteraceas de Importancia economica y ambiental. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industria*. Red de revistas científicas de América Latina, el Caribe, Epaña y Portugal. (19):87-115
- Fonnegra, R & Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Antioquia. 2da. Ed. 23-26.
- Grijalva, J., X. Checa, R. Ramos, P. Barrera y R. Limongi. 2012. *Situación de los Recursos Genéticos Forestales – Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional*

de *Forestería del INIAP con aval del INIAP/FAO/MAE/MAGAP/MMRREE*. Documento sometido a la Comisión Forestal de la FAO-Roma, para preparación del Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo. 6:13.

- Guilarte, M., Nevot, S. (2003). *Adolescente con dermatitis de contacto por compuestas*. España. 53-54.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). *Biological activity of species used in the Brazilian folk medicine*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 97(7):1027-1031.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessiere, J., Viano, J. (2003). *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Artemisia absinthium from Croatia and France*. Planta Med. 69:158-161.
- Krishnaswamy, K. Raghuramulu, N. (2000). *Bioactive phyto-chemicals with emphasis on dietary practices*. Indian Journal of medical research. 108:167-81.
- Llorens, J., Castell, V., & Pascual, R. (2008). *Composición del aceite esencial de Artemisia absinthium L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales*. Xiloca. (36):61-84.
- Maldonado, M., Coba, P., Cerna, M. (2010). *Colección de especies vegetales de la provincia de Morona Santiago con potencial uso medicinal: aislamiento, caracterización química y biológica*. Revista de Biotecnología. 9(1):23-28.
- Martínez, M. (2009) *Usos medicinales del ajeno o Artemisia absinthium L.* Revista Tlahui-Medic. Cuernavaca. 29(1/10).
- Miranda, M., Cuellar, A. (2002). *Farmacognosia y Productos naturales*. La Habana. 126
- Montesdeoca, V. 2010. *Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de Ajeno (Artemisia absinthium L.), Romero (Rosmarinus officinalis L.) y Manzanilla (Matricaria chamomilla L.) para combatir la menstruación dolorosa*. Tesis de Pregrado. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Facultad De Ciencias. Ecuador.
- Morales, T., Saravia, J., Aguilar, B., Marck, R., Chávez, B., Hernández, M. (2002). *Obtención y caracterización de aceites esenciales de 4 plantas medicinales cultivadas a diferentes niveles altitudinales de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Proyecto 77-00

- Moslemi, H., Hoseinzadeh, H., Badouei, M., Kafshdouzan, K., Nezhad, R. (2012). *Antimicrobial Activity of Artemisia absinthium Against Surgical Wounds Infected by Staphylococcus aureus in a Rat Model*. Indian Journal of Microbiology. 52(4):601-604.
- Navarro, L. (2012). *Aplicación de procesos de separación con CO2 supercrítico a la producción y optimización de bioplaguicidas*. Tesis Doctoral. Consejo Económico Y Social De Aragón. Zaragoza.
- Ordóñez, P., Vega, M., Malagón, O. (2005). *Estudio fitoquímico de Especies vegetales nativas utilizadas en la medicina tradicional de la Provincia de Loja*. Journal of ecology and application. 10(2):65-71.
- Osemwengie, L., Steinberg, S. (2001). *On-site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra-trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography–mass spectrometry in the full-scan mode*. Journal of Chromatography A. (932):107-118.
- Sengul, M., Ercisli, S., Yildiz, H., Gungor, N., Kavaza, A., & Çetin, B. (2011). *Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of Artemisia absinthium, Artemisia santonicum and Saponaria officinalis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10(1):49-56
- Shafi, G., Hasan, T., Ahmed, N., Al-Hazzani, A., Munshi, A. (2012). *Artemisia absinthium (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cáncer*. Molecular biology reports. 39(7):7373-7379.
- Villar, M., Villavicencio, O. (2001). *Manual de fitoterapia*. Organización Panamericana de la Salud. Lima. 101-103.
- Zaragoza, C & Cirujeda A. (2005). *Integración de sistemas no químicos en la lucha contra la resistencia de malezas*. España. 36-51
- Zekaria D. 2007. *"Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos"*. Laboratorios Calier.

ANEXO 1

Cálculo para determinación del Rendimiento.

El rendimiento se obtiene utilizando la siguiente formula.

$$\%R = \left(\frac{b}{a}\right) \times 100$$

Dónde:

%R = Porcentaje de Rendimiento

a = Peso inicial de la muestra

b = Peso obtenido al final del proceso

ANEXO 2

Preparación del revelador.

Ácido Sulfúrico y Vainillina: Se emplea como revelador en cromatogramas de aceites esenciales y la mayor parte de compuestos orgánicos.

Reactivos	Composición	Procedimiento
Ácido Sulfúrico	250mL Etanol	Se aforan los 12,5mL de ácido sulfúrico con los 250mL de etanol.
	12,5mL Ácido Sulfúrico	
Vainillina	250mL Etanol	Se aforan los 12,5g de vainillina con los 250mL de etanol.
	12,5g Vainillina	

ANEXO 3

Cálculo del Rf en la placa de sílica gel marca Merck60 F₂₅₄

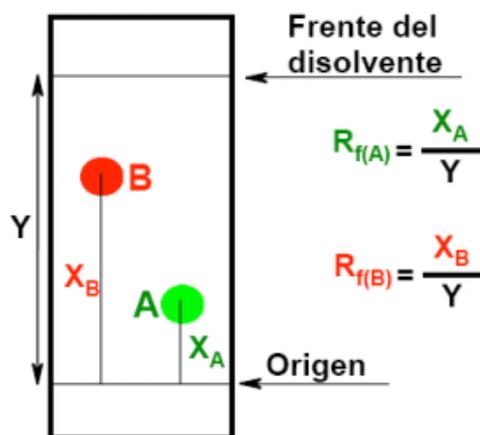
Rf = Distancia recorrida por el compuesto/ Distancia recorrida por el disolvente

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Dónde:

X = Distancia recorrida por el compuesto desde la línea de origen hasta el centro de la marca del compuesto

Y = Distancia recorrida por el disolvente desde la línea de origen hasta la línea de frente del disolvente



Determinación de Rf Fuente: Cruz (2009)

ANEXO 4

Cálculo para determinación de Humedad.

El porcentaje de Humedad se obtiene utilizando la siguiente formula.

$$Hm = \left(\frac{m1 - m2}{m1 - cv} \right) \times 100$$

Dónde:

Hm = Porcentaje de Humedad

c.v. = Peso de la capsula vacía (gr).

m1 = Peso de la capsula + muestra a analizar (gr).

m2 = Peso de la capsula + muestra seca (gr).

ANEXO 5

Cálculo para determinación de Densidad Relativa.

La densidad relativa se obtiene utilizando la siguiente formula.

$$d = \left(\frac{m2 - m0}{m1 - m0} \right)$$

Dónde:

d = Densidad Relativa

m0 = Peso del picnómetro vacío (gr).

m1 = Peso del picnómetro + agua destilada (gr).

m2 = Peso del picnómetro + muestra de aceite esencial (gr).

ANEXO 6

Determinación del Índice de refracción a norma ANFOR NF 75 -112

Principio

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

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación

D1 y D2 del espectro de sodio.

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

Equipos:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

Modo de operación:

Determinación Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos

son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 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.

Nota:

- Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.
- La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .

ANEXO 7

Cálculo para determinación del Índice de Kóvats (IK).

El índice de kóvats (IK) se obtiene utilizando la siguiente formula.

$$Ik = 100n + 100 \times \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right)$$

Dónde:

IK = Índice de Kóvats

n = Numero de átomos de carbono en el n-alcano

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto estudiado, que eluye en el centro de los n- alcanos

t_{Rn} = Tiempo de retención del n-alcano, que eluye antes del compuesto estudiado

t_{RN} = Tiempo de retención del n-alcano, que eluye después del compuesto estudiado

ANEXO 8

Bibliografía de los índices de Kóvats reportados en la literatura.

- c). Adams, R., González, M., González, M., Slinkman, E.(2006). *DNA fingerprinting and terpenoid analysis of Juniperus blancoi var. huehuentensis (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango*. Biochem. Syst. Ecol. México
- d). Rohloff, J., Mordal, R., Dragland, S. (2004). *Chemotypical variation of tansy (Tanacetum vulgare L.) from 40 different locations in Norway*. J. Agric. Food Chem
- e). Amparo, M., Pérez, I., Boira, H. (2003). *Essential oil analysis of Teucrium libanitis and T. turredanum by GC and GC-MS*. Flavour Fragr. J.
- f). Blagojevic, P., Radulovic, N., Palic, R., Stojanovic, G. (2006). *Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing Srtemisia absinthium and Artemisia vulgaris*. J. Agric. Food Chem.