



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) de la provincia de Loja.

TRABAJO DE TITULACION

Autor: Cabrera Gualpa, Yessica Pamela

Director: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado: “**Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides* (Paico) de la provincia de Loja**” realizado por Cabrera Gualpa Yessica Pamela, 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, abril del 2017

.....

Ph.D. Benito Eduardo Valarezo Valdez

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Cabrera Gualpa Yessica Pamela declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* de la provincia de Loja”**, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez 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 exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Formar 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) _____

Yessica Pamela Cabrera Gualpa

1104090368

DEDICATORIA

"Todo logro, grande o pequeño, comienza en tu mente".

Mary Kay Ash

Al creador de todas las cosas, el que cada día fortalece mi fe, Dios.

A mi MADRE Lupita Cabrera, por la comprensión, amistad, apoyo y sobre todo por el amor incondicional que me da. Si hoy he llegado a cumplir esta meta es por usted, porque no permitió que me dé por vencida, porque siempre ha estado a mi lado dándome los ánimos que necesitaba para llegar hasta aquí. A usted mi ángel protector, por darme más de lo que le pido y me merezco. Gracias por traerme al mundo y permitirme compartir junto a usted la vida.

A Leonardo Becerra, por todo el apoyo moral que me ha brindado.

A mis hermanos Pavel, Byron, Bethsabet y Amy, quienes me han regalado un espacio en su corazón, quienes son mis verdaderos amigos, compañeros de aventuras y de vida.

A mis tíos Hugo C. y Cecibel C., quienes se han convertido en mis ángeles guardianes, consejeros y también mis segundos padres.

A mi abuelito Alberto C., quien desde pequeña me albergo en su corazón.

Con amor Jessica Pamela.

AGRADECIMIENTO

"La gratitud es la memoria del corazón"

Lao Jse

A Dios por su bondad y bendiciones que derrama sobre mí a diario, por sus milagros concedidos y por esa familia de la que formo parte. A San Judas Tadeo por ser mi intercesor.

A mi madre por enseñarme a ser perseverante, a ser fuerte y buscarle solución a los problemas.

A mi familia, por brindarme palabras de aliento, por todas sus muestras de cariño y sobre todo por ser mi ejemplo de emprendimiento.

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja, por permitirme formarme profesionalmente. A todos los docentes por impartirme sus conocimientos.

De manera muy especial al Ing. Eduardo Valarezo por brindarme su confianza al permitirme formar parte de su grupo de investigación y brindarme el apoyo para culminar este proyecto.

A las personas que he llegado a conocer en la Universidad y que con el tiempo se han convertido en mis amigos(as), gracias por brindarme su amistad, por hacer más corto el tiempo de estudio, por todas esas anécdotas que quedaran plasmadas en la mente.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I	5
MARCO TEORICO.....	5
1.1. Aceites esenciales.	6
1.1.1 Extracción.	7
1.1.2. Clasificación.	7
1.1.3. Caracterización.	8
1.2. Cromatografía de gases.	9
1.3. Actividad Biológica.	10
1.3.1. Bacterias.	10
1.3.1.1. Bacterias Gram positivas.	11
1.3.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3.1.2. Bacterias Gram negativas.	11
1.3.1.2.1. <i>Salmonella Typhimurium</i>	11
1.3.1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	12
1.3.1.2.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	12
1.3.1.2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.3.1.2.5. <i>Proteus vulgaris</i>	13
1.4 Actividad Antioxidante.	13
1.4.1. Método DPPH.	14
1.4.2. Método ABTS.	14
1.5. Plantas medicinales.	14
1.6. Flora Ecuatoriana.	15
1.7. La familia Chenopodiaceae.	15
1.7.1. El género Chenopodium.	16
1.7.1.1. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	16
1.7.1.2. Taxonomía de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	17
CAPITULO II..	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. Metodología.	19
2.1.1. Recolección del material vegetal.	20
2.1.2. Extracción del aceite esencial.	20
2.1.3 Determinación de las propiedades físicas.	21
2.1.3.1. Determinación de la humedad relativa de la planta.	21
2.1.3.2. Determinación del rendimiento del aceite esencial.	22
2.1.3.3. Densidad relativa del aceite esencial.	22
2.1.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.	22
2.1.3.5. Actividad óptica del aceite esencial.	23
2.1.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.	24
2.1.4.1. Cromatografía de gases.	24
2.1.4.1.1. Preparación de la muestra.	24

2.1.4.1.2. Análisis del aceite esencial en CG-EM y CG-FID.	24
2.1.4.1.3. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS acoplada a espectrometría de masas.	25
2.1.4.1.4. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.	26
2.1.4.1.5. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> , tanto en la columna polar como en la no polar.	27
2.1.4.1.6. Corrida cromatografía en la columna DB-5MS acoplada al detector de ionización en llama (FID).	28
2.1.4.1.7. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama (FID).	29
2.1.4.1.8. Cuantificación de los compuestos identificados mediante cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama (FID), en ambas columnas polar y no polar.	30
2.1.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	30
2.1.5.1. Cepas bacterianas empleadas.	31
2.1.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.....	31
2.1.5.2.1. Método de microdilución en caldo.	31
2.1.5.2.2. Preparación de la muestra.	32
2.1.5.2.3. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight”.....	32
2.1.5.2.4. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.....	32
2.1.6.2.5. Procedimiento.....	33
2.1.5.2.6. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana e interpretación de los resultados.....	34
2.1.6 Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	35
2.1.6.1. Preparación de las muestra del aceite esencial <i>Chenopodium ambrosioides</i>	35
2.1.6.2. Método de capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS+.....	36
2.1.6.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS+.....	36
2.1.6.2.2. Estándar Trolox para ABTS+.....	37
2.1.6.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.	37
2.1.6.3. Método DPPH.	38
2.1.6.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.	38
2.1.6.3.2. Estándar Trolox para DPPH.	39
2.1.6.3.3. Lectura de muestras diluidas del aceite esencial.	39
2.1.6.4. Análisis de los datos obtenidos mediante ABTS+ y DPPH+.....	40
CAPITULO III	41
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	41
3.1. Recolección de la materia vegetal.	42
3.2. Extracción del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	43
3.3. Propiedades Físicas.	43
3.3.1 Determinación del Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.....	43
3.3.2 Rendimiento del aceite esencial.	44
3.3.3 Densidad relativa del aceite esencial.	45
3.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.	46
3.3.5. Actividad óptica.	46
3.4. Composición Química del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	47
3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.	47
3.5. Actividad biológica del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	56
3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.....	57

3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	58
3.6.1. Método ABTS+.....	58
3.6.1.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.....	58
3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.	59
3.6.2. Método DPPH.	61
3.6.2.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.....	61
3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	62
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Muestra botánica de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	17
Figura 2: Esquema de los análisis realizados.....	19
Figura 3: <i>Chenopodium ambrosioides</i> en estado de foliación.....	20
Figura 4: Equipo de destilación.....	21
Figura 5: Refractómetro ABBE.....	23
Figura 6: Polarímetro digital.....	23
Figura 7: Cromatógrafo de gases.....	25
Figura 8: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna DB5-MS.....	26
Figura 9: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna HP-INNOWAX.....	27
Figura 10: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna no polar DB5-MS acoplada a un detector de ionización (FID).....	29
Figura 11: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).....	30
Figura 12: Microplaca TC 96 con las concentraciones del aceite ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	34
Figura 13: Muestras del aceite esencial <i>Chenopodium ambrosioides</i> analizadas mediante método ABTS+.....	38
Figura 14: Muestras del aceite esencial <i>Chenopodium ambrosioides</i> analizadas mediante el método DPPH.....	39
Figura 15: Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.....	40
Figura 16: Área de recolección de la especie <i>Chenopodium ambrosioides</i>	42
Figura 17: Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (a) columna no polar (DB5-MS); (b) columna polar (HP-Innowax).....	48
Figura 18: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-MS).....	52
Figura 19: Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax).....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características taxonómicas <i>Chenopodium ambrosioides</i>	17
Tabla 2: Microorganismos de prueba.....	31
Tabla 3: Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para las bacterias.....	32
Tabla 4: Volumen necesario para cada dilución en aceite.....	36
Tabla 5: Volumen necesario para cada dilución en Trolox.....	37
Tabla 6: Peso obtenido de la recolección de la muestra vegetal.....	42
Tabla 7: Cantidad (mL) de aceite esencial extraído de cada recolección de <i>C. ambrosioides</i>	43
Tabla 8: Porcentaje de humedad de la materia vegetal.....	44
Tabla 9: Porcentaje de rendimiento de la materia vegetal.....	44
Tabla 10: Densidad relativa del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	45
Tabla 11: Índice de refracción del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	46
Tabla 12: Actividad óptica específica del aceite esencial.....	47
Tabla 13: Composición química de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	54
Tabla 14: Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.....	54
Tabla 15: CMI antibacteriana ($\mu\text{g}/\text{ml}$) del aceite esencial frente a 6 cepas bacterianas.....	57
Tabla 16: Datos del método ABTS+ para el estándar TROLOX.....	59
Tabla 17: Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.....	60
Tabla 18: Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.....	61
Tabla 19: Datos del método DPPH para el aceite esencial.....	62

RESUMEN

Chenopodium ambrosioides conocida comúnmente como paico, es una planta aromática, perenne que crece en suelos húmedos y bajos, el aceite esencial de esta especie fue extraído por destilación. Su composición química se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/EM y al detector de ionización de llama CG/FID. La actividad biológica fue evaluada por el método de microdilución en caldo expresada como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad antioxidante por medio de dos métodos espectrofotométricos ABTS⁺ y DPPH. Igualmente se determinaron las propiedades físicas del aceite esencial. Se identificaron 22 compuestos que representan el 92,86 % del aceite esencial, sus compuestos mayoritarios son: Limonene (29,73 %), Mentha-2,8-dien-1-ol<trans-p-> (10,86 %), p-Cymene (8,92 %), α -Terpinene (8,83 %), Mentha-1(7),8-dien-2-ol<trans-p-> (6,90 %). La densidad del aceite fue de 0,9494 g/cm³, índice de refracción de 1,4828; y actividad óptica de -75,98°. El aceite esencial presentó actividad biológica débil frente a *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* con una CMI de 0,625 mg/mL. El aceite esencial presentó actividad antioxidante solo para el método ABTS⁺ a una concentración de 10000 ppm con un porcentaje de disminución de 81,93 %.

Palabras claves: *Chenopodium ambrosioides*, Aceite esencial, Cromatografía de gases, CMI, Actividad biológica, Actividad antioxidante.

ABSTRACT

Chenopodium ambrosioides, commonly known as Paico, is an aromatic, perennial plant that grows in humid and low soils, the essential oil of this plant was extracted by distillation. Its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to CG / EM mass spectrometry and the CG / FID flame ionization detector. The biological activity was evaluated by the microdilution method in broth expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and the antioxidant activity by means of two spectrophotometric methods ABTS + and DPPH. The physical properties of the essential oil were also determined. A total of 22 compounds representing 92.86 % of the essential oil were identified, with the following compounds: Limonene (29.73 %), Mentha-2,8-dien-1-ol <trans-β-(10.86 %), P-Cymene (8.92 %), α-Terpinene (8.83 %), Mentha-1 (7), 8-dien-2-ol <trans-β- (6.90 %). The density of the oil was 0.9494 g/cm³, refractive index of 1.4828; And optical activity of -75.98 °. The essential oil had weak biological activity against *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* with a MIC of 0,625 mg /mL. The essential oil presented antioxidant activity only for the ABTS + method at a concentration of 10000 ppm with a percentage decrease of 81.93 %.

Key words: *Chenopodium ambrosioides*, Essential oil, Gas chromatography, MIC, biological activity, Antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* de la provincia de Loja. Se desarrolla en 3 capítulos, el primer capítulo titulado Marco Teórico trata sobre el estado del arte de este tema, en el segundo capítulo se da a conocer las técnicas y los materiales utilizados para llevar a cabo la investigación y en el capítulo 3 se expone y analiza los resultados. Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de Región Sur del Ecuador y específicamente al proyecto “Evaluación de la flora aromática de la Provincia Loja” que se desarrolla en la Sección de Ingeniería de Proyectos de la Universidad Técnica de Loja. Con este estudio se aumenta el conocimiento sobre la existencia de los aceites esenciales sus propiedades y usos para aplicaciones en las diferentes industrias tales como: farmacéutica, cosmética y alimenticia, la información es también alimentada en el Catálogo de Plantas Aromáticas. Una vez conocida la composición química, propiedades físicas y actividad biológica y antioxidante de los aceites esenciales de la región del sur del Ecuador, los mismos pueden ser usados como materia prima para las diferentes industrias o para la formulación de subproductos.

El objetivo general de desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, y determinar los componentes químicos y las propiedades físicas presentes en la especie en estudio así como también determinar la actividad biológica y los objetivos específicos, también considerados como componentes del proyecto: Extracción del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* y cálculo del rendimiento real; determinar las propiedades físicas y composición química las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial; Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* y el de contribuir al desarrollo de nuevos estudios sobre la dicha especie fueron desarrollados en su totalidad. Para lo cual se inició con la recolección del material vegetal, al cual luego de un tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial mediante arrastre con vapor, al aceite obtenido se le determino la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición química utilizando cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas CG/MS y acoplada un detector de Ionización de llama CG/FID, La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo usando una concentración de 5×10^5 cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhimurium* (LT2) y bacteria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*

(ATCC 25923). La actividad antioxidante fue evaluada mediante dos métodos espectrofotómetros: capacidad de atrapamiento del catión-radical +ABTS y DPPH.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica que se encuentran en numerosas plantas, se encuentran en las distintas partes de la planta como en raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; separables por métodos químicos o físicos, como destilación, centrifugación, entre otros. (Peredo-Luna, Palou-García, & López-Malo, 2009)

En la naturaleza, los aceites esenciales cumplen una función importante sobre la protección de las plantas, actúan como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas, así mismo actúan contra los herbívoros, haciéndolas menos apetecidas. (Bakkali et al., 2008)

La mayor parte de los aceites esenciales tienen olor agradable, esto se debe a los componentes que contengan el aceite, o la planta de la que se lo extrae. No todas las plantas poseen aceite esencial y muchas de ellas poseen cantidades pequeñas que imposibilitan la extracción del mismo. De los millones de plantas existentes en el mundo, solo se conocen aproximadamente 4000 variedades de aceites esenciales. (Bernal, 2012)

En diversas investigaciones se puede demostrar que la composición química de los aceites esenciales y extractos pueden alterar de acuerdo al método de extracción empleado. Estas tergiversaciones aunque no parezca tener importancia, pueden ser detectables por técnicas de sensibilidad como la de cromatografía de gases. Sus variaciones se pueden evidenciar en diferencias de proporciones de compuestos y número de los mismos. (Peredo-Luna et al., 2009)

En los vegetales, los aceites esenciales pueden desempeñar diferentes papeles, los cuales siempre están vinculados con sus propiedades volátiles y olorosas. Intervienen en la polinización, además actúan como defensa frente al ataque de parásitos e insectos. (Osorio, 2014)

Los aceites esenciales poseen características organolépticas y propiedades terapéuticas que son insostenibles de representar de manera sintética, tal motivo ha impulsado a tomar fuerza sobre estudios de estos compuestos en forma natural. Los principales usos de los aceites esenciales son en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéutica, donde son sus propiedades aprovechadas. (Bernal, 2012)

1.1.1 Extracción.

Los aceites esenciales se pueden adquirir de muestras vegetales, a través de métodos como destilación por arrastre de vapor, métodos mecánicos (expresión) y métodos no oficiales como la extracción con disolventes orgánicos, extracción con grasas (enflorado, digestión, método neumático) y extracción con gases licuados. (Meza & Vargas, 2013)

La destilación por arrastre de vapor es una técnica muy empleada y reconocida, es utilizada a nivel industrial, principalmente para la extracción de esencias fluidas debido a su alto rendimiento y la pureza del aceite obtenido. (Plazas, 2011).

En la destilación por arrastre de vapor, la materia prima vegetal es colocada dentro del hidroddestilador evitando el contacto con el agua, la generación del vapor es mediante agua sobrecalentada, conforme el vapor calienta la materia prima esta a su vez va liberando el aceite esencial contenido. A la salida del condensador se forma una emulsión líquida inestable, que es separada mediante un decantador dinámico o florentino. El proceso termina cuando el volumen del aceite esencial que se encuentra acumulado en el florentino no varíe con el tiempo de extracción, este aceite es retirado y almacenado en un lugar apropiado. (Rodríguez, Alcaez, & Real, 2012)

1.1.2. Clasificación.

Según Osorio (2014) los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los compuestos mayoritarios.

- **Consistencia:** esencias fluidas que son líquidos volátiles a temperatura ambiente, bálsamos son de consistencia espesa, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización y oleorresinas que poseen el aroma de la planta en forma concentrada, son líquidos muy viscosos.
- **Origen:** Naturales se obtiene directamente de la planta y no sufren modificaciones, su rendimiento es bajo; Artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus compuestos; y los Sintéticos son producidos por la combinación de sus compuestos mediante síntesis química.
- **Naturaleza química:** se las clasifica de acuerdo con el tipo de sustancias que corresponden a los compuestos mayoritarios.

1.1.3. Caracterización.

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. Una representación significativa de aceites esenciales estima una densidad menor a la del agua, existiendo excepciones como los aceites de almendras amargas, canela o clavo de olor. El índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando este se diluye con otras sustancias. (Peredo-Luna et al., 2009)

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente aunque algunos se solidifiquen a baja temperatura. La mayoría son prácticamente transparente, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos), pueden existir excepciones como la esencia de manzanilla, que contiene chamazuelo de un intenso color azul. En su gran mayoría son de olor agradable, pueden existir ciertos olores desagradables, por tener compuestos azufrados. Ciertos aceites son inflamables. Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua, hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque algunos de sus compuestos se solubilizan. Los aceites esenciales son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares. La solubilidad en alcohol es variable y suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. (Osorio, 2014)

1.1.3.1 Propiedades.

Las propiedades de los aceites esenciales son muy variables desde el punto de vista farmacológico, debido a la variedad de sus componentes. Algunas sustancias encontradas en los aceites esenciales de ciertas plantas tienen gran interés terapéutico, lo que ha contribuido con el origen a la aromaterapia. Varias de estas acciones, han demostrado tener efecto sobre la piel, por tal razón también se hace uso en cosmetología. Así mismo los aceites esenciales poseen efectos tóxicos, debido a ciertos componentes que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y afectar al sistema nervioso central. (M. T. López, 2004)

Las propiedades biológicas de los aceites esenciales son antioxidantes, antibacterias o antifúngicos, con lo cual sirve de aprovechamiento para su uso como diferentes presentaciones de productos finales, farmacéuticos, aseo personal, cosméticos, conservantes entre otros. (E. Stashenko, 2009)

1.1.3.2 Usos y aplicaciones.

El uso de los aceites esenciales y su entendimiento viene desde la antigüedad, principalmente

en la medicina. La utilidad de los aceites esenciales depende de las propiedades y características. Tienen alta actividad terapéutica, por tener procedencia natural, por lo tanto son utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia. (Bernal, 2012).

El uso de los aceites esenciales de condimentos y especias en las industrias de alimentos y farmacéutica es más generalizado, debido en parte a la homogeneidad del aroma y a la minimización de las posibilidades de contaminación microbiana, cuando se compara con el uso directo de estas especias y condimentos. (Peredo-Luna et al., 2009)

En la actualidad se ha ampliado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para emplear su uso en alimentos, o principalmente como nuevos fármacos y así suplantar los antioxidantes sintéticos, debido a que estos presentan restricción carcinogénica. (Rosales, 2014)

1.2. Cromatografía de gases.

La cromatografía, es una técnica analítica de separación, en donde nos permite cualificar y cuantificar los componentes de una sustancia. La cromatografía de gases permite la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles como los hidrocarburos alifáticos. (Montoya & Páez, 2012)

En la cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia del reparto entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatografía de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna (Montoya & Páez, 2012).

Según Montoya & Páez (2012) un cromatógrafo de gases consiste en:

- Fase móvil (gas portador)
- Puerto de inyección
- Horno
- Columna
- Fase estacionaria
- Detector
- Sistema de registro de datos

El detector de ionización de llama (FID) es el más utilizado y en común es uno de los más aplicables en cromatografía de gases, debido a su muy alta sensibilidad, también presenta una característica muy importante que es la de poseer un factor de respuesta (en masas) casi idéntico para todos los hidrocarburos. (Montoya & Pàez, 2012)

La cromatografía de gases es considerada para el análisis de aceites esenciales, por tal razón se utiliza esta técnica para cuantificar componentes específicos que podrían ser identificativos de calidad del aceite para detectar la añadidura de otros compuestos clandestinos como antioxidantes así como componentes utilizados como diluyentes, la gran mayoría de estos compuestos resultan frágiles e importantes comercialmente. (Olguín & Rodríguez, 2004)

1.3. Actividad Biológica.

Los aceites esenciales han probado la capacidad inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, estas últimas dando como resultado resistencia. Ciertos aceites son activos frente a bacterias pero no frente a hongos y viceversa, mientras que otros activan el crecimiento de estos microorganismos. (Oliva M, 2011)

El uso de algunos aceites esenciales para eliminar bacterias como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, resistentes a los antibióticos tradicionales y varios hongos patógenos, está vinculado con la composición muy compleja de los aceites, que son mezclas multicomponente formadas por sustancias con actividad biológica diversa, potenciada a menudo precisamente gracias a esta combinación única de varios componentes, que ejercen una relación sinérgica. (E. Stashenko, 2009)

En múltiples investigaciones se ha comprobado la diversa actividad biológica de terpenoides como agentes quimiopreventivos, principios activos y coadyuvantes en el tratamiento de arterosclerosis, trombosis y como un medio de vinculación para facilitar la penetración transdérmica de muchas drogas de uso tópico. (E. Stashenko, 2009)

1.3.1. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos con una célula única relativamente simples, las bacterias se denominan procariotas, debido a que su material genético no se encuentra cubierto por una membrana nuclear. (Tortora, Funke, & Case, 2007)

1.3.1.1. Bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram –positivas tienen una pared bacteriana más simple, y voluminosa, es una capa gruesa de un polímero de polisacárido unido por aminoácidos o cadenas cortas de estos y, entre ella y la membrana citoplasmática, hay una estructura apenas perceptible denominada periplasma, que corresponde a peptidoglicano laxo. (Hernández, 2002)

Las bacterias Gram-positivas retienen el colorante violeta de la tinción luego de un proceso de decoloración con éter-acetona, por lo tanto toman el color violeta o azul intenso oscuro. Son sensibles frente a la penicilina. (Hernández, 2002)

1.3.1.1.1. Staphylococcus aureus:

Staphylococcus aureus es un agente etiológico de varias enfermedades, en las cuales se encuentran las infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genito urinario. (Gil, 2000)

S. aureus, también es conocido como estafilococo dorado por el pigmento no difusible de color amarillo que lo forma, produce coagulasa y fermenta el manitol. (Granados & Vilaverde, 2003)

1.3.1.2. Bacterias Gram negativas.

La pared de la Gram–negativas es más compleja, tienen una membrana externa y una capa delgada de peptidoglicano incluida en una región de periplasma muy notoria. El componente más externo de este tipo de pared es la membrana externa, morfológicamente parecida a la membrana citoplasmática, cuya composición difiere, debido a que posee una cantidad relativa de un compuesto denominado Lipo-polisacárido (LPS).(Hernández, 2002)

Las Gram-negativas se decoloran y se contrañen de rosado con safranina, el segundo colorante de la tinción, por eso como resultado toman un color rosado. Son sensibles frente a las estreptomicinas, gentamicina, etc. (Hernández, 2002)

1.3.1.2.1. Salmonella Typhimurium.

Salmonella es un bacilo gramnegativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles no formadores de esporas. Crecen en los medios de cultivo habituales. (Jurado, Arenas, Doblaz, Rivero, & Torre, 2010)

Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, están presentes en el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos. *S. Typhimurium* es el segundo serotipo más común después de *S. Enteritidis* en muchos países, como principal fuente de contaminación es el ganado vacuno y porcino. (Parra, Durango, Máttar, & De Tema, 2002)

Entre las principales manifestaciones clínicas por salmonella son fiebre entérica o tifoidea, septicemia sin localización, enfermedad focal, gastroenteritis y estado de portador (crónico o transitorio). La manifestación más frecuente es la infección intestinal ocasionada por la ingesta de agua o alimentos contaminados. (Tacchini et al., 2010)

1.3.1.2.2. *Escherichia coli*.

E. coli es un bacilo gramnegativo, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y aerobio facultativo, con flagelos peritricos. (Romero, 2007)

Las infecciones producidas por cepas de *E. coli* patogénicas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicos pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infecciones de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica. (Romero, 2007)

Se considera que el hábitat natural de *E. coli* es el colon de los mamíferos y aves. En consecuencia, las *E. coli* ambientales se interpretan como resultado de contaminación fecal, y se creía que no se podía reproducir en el medio exterior, pero resultados recientes demuestran que las cepas pueden existir en sangre, tracto urogenital y en ambientes secundarios. (Souza et al., 2001)

1.3.1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa, es el principal patógeno de la familia *Pseudomonadaceae*, es un bacilo gramnegativo ligeramente curvado, se desarrolla mejor en aerobiosis, se caracteriza por estar ampliamente distribuida en la naturaleza formando parte de la microbiota del hombre. (Montero, 2012)

Posee la capacidad de sintetizar diferentes pigmentos hidrosolubles, entre los cuales se encuentra el compuesto fluorescente pioverdina, que al ser combinado con el pigmento fenazínico azul piocianina, da como resultado el color verde brillante característico de esta bacteria. (Merino, 2007)

1.3.1.2.4. *Klebsiella pneumoniae*.

K. pneumoniae es una bacteria gramnegativa, que tiene forma bacilar, es anaerobia facultativa, se encuentra inmóvil y usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, de manera considerable se encuentra presente en las superficies mucosas de los mamíferos, en la nasofaringe y tracto gastrointestinal de los humanos. Es necesario destacar que la colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, de forma proporcional a la estancia, y a la función que ejercen los antibióticos. (Echeverri & Cataño, 2010)

1.3.1.2.5. *Proteus vulgaris*.

El género *Proteus* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, está extendido en la naturaleza y forma parte de la flora intestinal. Todas las especies de este género poseen capacidad de producir swarming, aunque en algunas cepas de *P. penneri* está disminuida, y para que se manifieste es necesario reducir la concentración de agar del medio. (Cantón & Sánchez, 2005)

Proteus vulgaris biogrupo 1 o como *P. vulgaris* indol-negativo ahora es denominado *Proteus Penneri*. En cantidades significativas ha sido aislado en muestras del tracto urinario y se ha asociado a infecciones no complicadas, a pielonefritis aguda y cuadros de urolitiasis. En medio agar presenta crecimiento en ondas y colonias, lactosa negativa planas con bordes irregulares en medio McConkey, presenta olor característico derivado de sus productos metabólicos. (Cantón & Sánchez, 2005)

1.4 Actividad Antioxidante.

La propiedad antioxidante de los aceites esenciales se debe a la presencia de fenoles que se encuentran en su estructura. Las investigaciones de la actividad antioxidante de los aceites esenciales se ha priorizado en las industrias con finalidades de mejorar la salud y la conservación de alimentos. (Bernal, 2012)

Los radicales comúnmente utilizados para medir la capacidad de secuestrar los radicales formados en los procesos de peroxidación lipídica son el 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH*) y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6) (ABTS). (Torrenegra, 2014)

Los radicales DPPH y ABTS, presentan excelente estabilidad bajo las condiciones de las evaluaciones y exhiben importantes diferencias en sus respuestas frente a las concentraciones de varios antioxidantes. (Torrenegra, 2014)

1.4.1. Método DPPH.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desaparecido sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517nm. Los resultados son expresados como el valor de la concentración máxima de la medida inhibitoria (IC_{50}), definiendo como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. (Tovar del Rio, 2013)

1.4.2. Método ABTS.

El método ABTS se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $ABTS^+$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)). Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox. Entre las ventajas esta que el $ABTS^+$ es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. (Londoño, 2012)

1.5. Plantas medicinales.

A pesar de que la medicina moderna está desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de profesionales tradicionales, plantas medicinales y medicamentos herbarios para la atención primaria. En los últimos decenios, el interés de las personas en las terapias naturales ha incrementado enormemente en los países industrializados. (M. López, 2012)

Las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, se usan directamente como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. (M. López, 2012)

En el mercado mundial, el 50 % de las plantas son usadas en alimentación humana, el 25 % en cosmética, 20 % en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros. Se estima que en el mundo se utilizan unas 10.000 especies vegetales como medicinales, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional. (Cañigueral, Dellacassa, & Bandoni, 2003)

1.6. Flora Ecuatoriana.

Considerando el tamaño geográfico Ecuador es un país pequeño y, posee una cantidad desproporcionada de riqueza florística. (Cerón, 2005). Ocupa el 0.2% de territorio en el mundo, posee el 10% de plantas que hay en el planeta, por tal motivo es considerado como uno de los países con mayor número de especies por superficie de área, se puede garantizar que hay de 20.000 a 30.000 del total de especies vasculares, por medio de informes de estudios etnobotánicos se considera que de 5.000 a 8.000 son útiles. (Armijos, Lozano, Bracco, Vidari, & Malagón, 2012)

A Ecuador lo reconocen a nivel mundial por ser rico en flora y fauna, la cual está asociada a una serie de variables ambientales como el: bioclima, relieve, suelo, regímenes de inundación, entre otros factores; que se asocian para dar origen a la variedad de paisajes naturales que conviven con varios tipos de vegetación y permanentes amenazas dadas por una constante influencia del ser humano sobre los recursos naturales. (Ministerio del Ambiente de Ecuador, 2012)

La flora de Ecuador siempre ha sido reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles; como resultado de eso se tiene las crónicas de los misioneros que acompañaban a los conquistadores, donde se menciona el uso que los indígenas daban a las plantas que crecían en esos territorios. (Balsev, Navarrete, De la Torre, & Macias, 2008)

1.7. La familia Chenopodiaceae.

Familia de amplia distribución mundial, con alrededor de 14000 especies, reunidas en más o menos 102 géneros, abundantes en sitios xerófitos o salobres. Agrupa especies de uso industrial, hortícola, forrajero y alimenticio, además de especímenes perjudiciales para los cultivos. (Tolaba, 2006)

Tolaba (2006) nos señala las características de las Chenopodiaceae:

- Hierbas anuales o perennes, arbustos, pequeños árboles o plantas rizomatosas
- Hojas a menudo alternas, sin estípulas, a veces carnosas o reducidas a escamas
- Flores pequeñas, verdosas, monoclamídes caliz generalmente herbáceo, de consistencia carnosa, suberosa o raramente leñosa
- Corola nula
- Ovario súpero

- Ovulo único
- Fruto utrículo, raro baya
- Semillas lenticular

1.7.1. El género *Chenopodium*.

El género *Chenopodium* consta de 120 especies, abundantes en las zonas tropicales y cálidas. (Monzote, 2010)

Este género se encuentra en casi todo el mundo, contiene propiedades fungicidas, bacterianas, viricidas, insecticidas, nematocidas, moluscocidas y alelopáticas, siendo *Chenopodium ambrosioides*, *Ch. quinoa* y *Ch. álbum* las especies que presentan mayor control contra diversos fitonematodos. (Fierro K., 2009)

En América, el género *Chenopodium* L. está integrado por distintas especies; algunas son consideradas malezas de campo de cultivo y otras especies como la Quinoa y la Cañahua, representan recursos importantes para la subsistencia de comunidades andinas actuales. (Arias, Aguirre, Luque, & Escola, 2014)

En Argentina, se encuentra representado por 37 especies, que corresponden a plantas herbáceas, anuales, bienales o perennes, que pueden ser leñosas en la base, aromáticas o con olor desagradable o bien inodoras con flores pequeñas dispuestas en glomérulos, reunidas a su vez en espigas o panojas axilares terminales. (Arias et al., 2014)

1.7.1.1. *Chenopodium ambrosioides* L..

Chenopodium proviene del griego χήν (cheén), ganso y πούς (poús), pie, describe en cierto modo la forma que tienen las hojas, debido que tienen 3 lóbulos. *Ambrosioides* proviene del griego Ἀμβροσία, α (a), prefijo de negación y βρότος (brótos), mortal, lo cual mitológicamente es un alimento reservado exclusivamente a los dioses del Olimpo. (Gómez, 2008)

Es conocida en México como espazote o hierba del zorrillo, paico; en Argentina y Perú: hierva de Santa María, mastruz; en Brasil: worm grass, Mexican tea, fi tweed; en EUA: aritasou, Japon; sime Kontwá. (Gómez, 2008)

Chenopodium ambrosioides L. es una planta perteneciente a la familia Chenopodiaceae, es una planta aromática, perenne, más o menos pubescente, con el tallo usualmente postrado, crece en suelos húmedos y bajos, olor fuerte, con alrededor de 40cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y cerradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas

flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con 5 sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras y no mayores que 0,8 mm de longitud. (Jaramillo C, Duarte R, & Delgado, 2012)

1.7.1.2. Taxonomía de *Chenopodium ambrosioides*.

Tabla 1: Características taxonómicas *Chenopodium ambrosioides*.

Nombre Científico	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Género	Chenopodium
Epíteto Específico	Ambrosioides
Autor Epíteto Específico	L.
Determinador	González, M. F.
Fecha determinación	2010

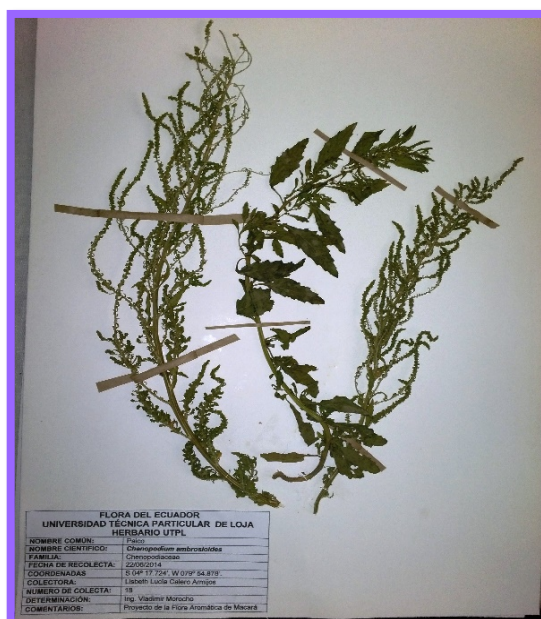


Figura 1: Muestra botánica de *Chenopodium ambrosioides*

Fuente: Science, 2008

Fuente: Herbario U.T.P.L.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología.

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Química y Ciencias Exactas, Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja, y la metodología utilizada es expuesta en el siguiente esquema.



Figura 2: Esquema de los análisis realizados
Fuente: La Autora

2.1.1. Recolección del material vegetal.

Las partes aéreas de la especie *Chenopodium ambrosioides* (figura 3), fueron recolectadas en estado de foliación dentro de su hábitat natural, en la Provincia de Loja, Cantón Loja, Parroquia Sucre, Barrio Ciudad Victoria, se realizó tres recolecciones desde 16 de mayo al 30 de mayo del 2016, con un intervalo de una semana entre cada recolección. La materia vegetal fue recolectada en sacos de lona, para poder ser transportada al laboratorio de Ingeniería de Procesos de la UTPL, donde se realizó el tratamiento post-cosecha, el cual consistió en seleccionar la materia vegetal que se encontraba en buen estado, eliminando impurezas, hojas secas y en estado de descomposición que podrían interferir en resultados posteriores con contaminación.

Se elaboró un mapa en las instalaciones de la UTPL, mediante el programa ArcGis v3.21 utilizando las coordenadas que se obtuvieron en el lugar de recolección.



Figura 3: *Chenopodium ambrosioides* en estado de foliación.

Fuente: La Autora

2.1.2. Extracción del aceite esencial.

La obtención del aceite esencial se realizó por medio de destilación con arrastre de vapor, en un destilador modelo Clevenger (figura 4), de acero inoxidable. Se colocó el agua hasta el límite con la tapa perforada y sobre la tapa fue depositada la materia vegetal troceada. Antes de tapar el tanque se colocó el sello de agua en los bordes del destilador, la tapa fue cerrada herméticamente y se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante. Seguidamente el equipo fue expuesto a una fuente de calor en la parte inferior, al observar la primera gota de agua en el florentino se abrió la llave de agua para que se produzca el proceso de condensación, así el vapor generado circula a través de la materia vegetal y al salir del cuello del cisne se enfría en el condensador donde pasa a estado líquido, este líquido es

recibido en un florentino en el cual se produce la separación de agua y aceite por diferencia de densidades.



Figura 4: Equipo de destilación
Fuente: La Autora

Este proceso dura de 3 a 4 horas, al finalizar el aceite es recogido en una probeta para medir su volumen, luego es envasado en frascos de color ámbar con la finalidad de protegerlo de la luz, al cual se le debe asignar su respectivo código. El código consiste en la inicial de la especie vegetal, número y fecha de recolección, y número de destilación. Para conservar las condiciones del aceite, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a -4°C .

2.1.3 Determinación de las propiedades físicas.

Las propiedades físicas que se determinaron son: la humedad relativa de la planta, densidad relativa según la norma AFNOR NFT75-111, índice de refracción según la norma AFNOR NF 75-112 25 y actividad óptica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

2.1.3.1. Determinación de la humedad relativa de la planta.

Se emplearon las hojas de *Chenopodium ambrosioides* en estado seco, las cuales fueron cortadas en pequeños pedazos con la finalidad de obtener una muestra homogénea; se colocó aproximadamente 1 g de la materia vegetal en recipientes elaborados de aluminio, dicho proceso se realizó por triplicado. Las capsulas con la materia vegetal fueron colocadas en la lámpara ULTRA X durante 45 min, posteriormente se las coloco en el desecador por 5

min, se registró el peso y se expuso nuevamente la capsula en la lámpara por 15 minutos más con el propósito de eliminar el agua que se encuentra presente en la muestra vegetal, este proceso se realizó hasta que el peso se mantenga estable.

Al finalizar el procedimiento se realizó los respectivos cálculos para determinar Humedad (Anexo I)

2.1.3.2. Determinación del rendimiento del aceite esencial.

El rendimiento del aceite se determinó de cada una de las destilaciones. El rendimiento del aceite puede variar de acuerdo al método de extracción. Para determinar el rendimiento se relacionó el volumen obtenido con la cantidad de materia vegetal utilizada, la fórmula empleada es detallada en el Anexo II

2.1.3.3. Densidad relativa del aceite esencial.

Para la determinación de la densidad relativa se utilizó la norma AFNOR NF T 75-111 (Anexo III), como principales materiales se necesitó un picnómetro de vidrio de 2 mL, una balanza y un baño termostático.

Primeramente se necesita conseguir el peso inicial del picnómetro vacío, después el peso del picnómetro con agua y finalmente con el aceite esencial, para ello se necesitó unir las tres muestras de aceite esencial provenientes de la destilación, este procedimiento se realizó a una temperatura de 20°C. Para los valores obtenidos se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

2.1.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.

La determinación del índice de refracción se lo realizó teniendo como base la norma AFNOR NF 75-112 25 (Anexo IV), empleando un refractómetro ABBE, marca BOECO GERMANY.



Figura 5: Refractómetro ABBE
Fuente: La Autora

Para obtener los valores de índice de refracción, se determina un promedio que resulta de la unión de los aceites de las tres destilaciones. En el refractómetro se colocó una gota de aceite esencial y se procedió a la respectiva lectura, finalmente calculando el promedio general y la desviación estándar.

2.1.3.5. Actividad óptica del aceite esencial.

La determinación de la actividad óptica del aceite esencial se determinó mediante la Norma ISO 592-1998 (Anexo 4). Se usó un polarímetro digital Mrc-Automatic Polarimeter P810 (figura 6) y una celda de 1 dm de longitud en el cual se midió la capacidad para desviar la luz polarizada de la muestra.



Figura 6: Polarímetro digital
Fuente: La Autora

2.1.4. Determinación de la composición química del aceite esencial.

La identificación de los compuestos químicos se realizó mediante cromatografía de gases CG-EM y CG-FID

2.1.4.1. Cromatografía de gases.

La identificación de los compuestos químicos del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM y acoplada a un detector de ionización de llama CG-FID, dichas corridas cromatográficas se hicieron en dos columnas, una no polar DB5-MS y otra polar HP-INNOWAX, con el propósito de obtener resultados cualitativos y cuantitativos.

2.1.4.1.1. Preparación de la muestra.

Primeramente se deshidrata las muestras de aceite para eliminar los remanentes de agua que se quedaron al momento de ser envasados en los frascos ámbar, este procedimiento se lo realiza para evitar problemas que puedan ocasionar daño al sistema cromatógrafo.

Para dicho tratamiento se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el cual fue colocado en cantidades equivalentes al agua que contenga la muestra, se dejó reposar durante 30 minutos y nuevamente se trasvasó a un nuevo frasco ámbar con su etiquetado correspondiente.

Cada muestra de análisis se preparó en viales de cromatografía previamente etiquetados, en el cual se colocó 990 μL de diclorometano de grado HPLC y 10 μL de aceite, obteniéndose una disolución al 1% (v/v) de aceite esencial. Posterior a esto se realizó la inyección de hidrocarburos (C_{10} decano a C_{25} -pentacosano), conocidos comercialmente como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, se los inyectó en columna DB5-MS y HP-INNOWAX bajo los mismos parámetros que los aceites, el tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirve como base para la determinación de los índices de Retención e identificación de cada uno de los compuestos.

2.1.4.1.2. Análisis del aceite esencial en CG-EM y CG-FID.

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* por Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas (CG-EM) se hizo mediante un Cromatógrafo de Gases Agilent y la obtención de los espectros de cada

compuesto individual. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB5-MS y HP-INNOWAX.

El equipo que se utilizó para hacer los respectivos análisis fue un Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 Inert; el equipo dispone de un sistema de datos “MSD-Chemstation D.01.00 SP1”, cuenta con un inyector automático Split/splitless serie 7683 y un detector de ionización de llama (FID) provisto de un generador de hidrogeno Gas Generator 9150 Packard” (Figura 7).



Figura 7: Cromatógrafo de gases

Fuente: La Autora

El tamaño de las columnas fue de 30m x 0,25mm x 0,25 μ m. La columna no polar está recubierta internamente de 5%-Fenil-metilpolisiloxano y la columna polar tiene un recubrimiento interno de polietilenglicol.

La temperatura límite para la columna DB5-MS es de 325°C y para la columna HP-INNOWAX la temperatura es de 260°C

2.1.4.1.3. Corrida cromatográfica en la columna DB5-MS acoplada a espectrometría de masas.

Los parámetros utilizados en la inyección cromatográfica de los hidrocarburos y aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* usando la columna no polar DB5-MS se indican en la figura 8.

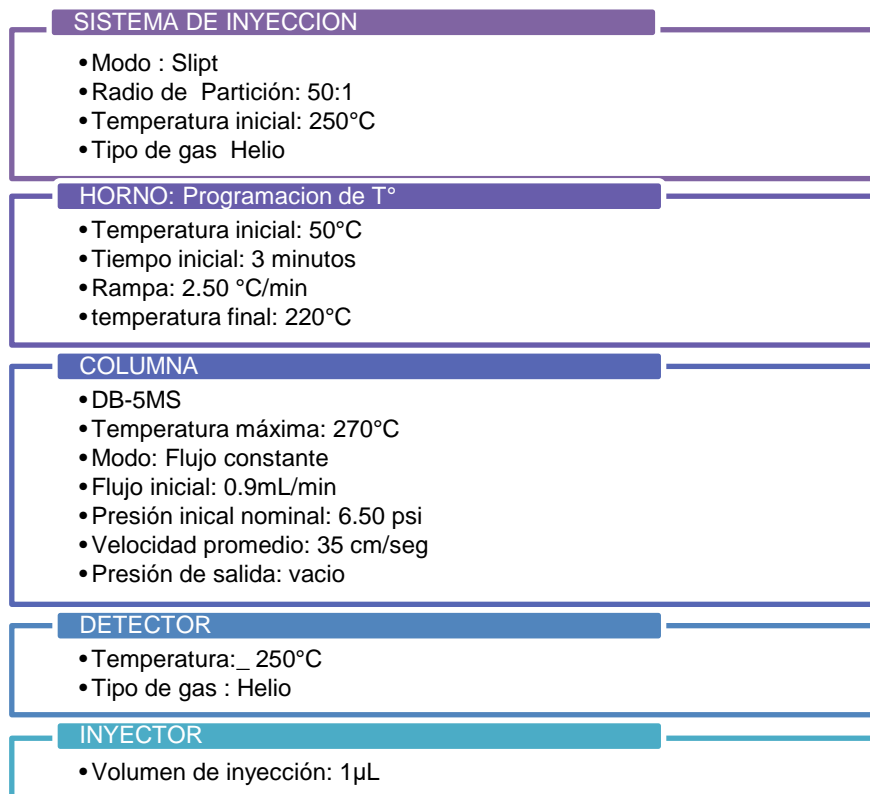


Figura 8: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna DB5-MS.

Fuente: La Autora

2.1.4.1.4. Corrida cromatográfica en la columna HP-INNOWAX acoplada a espectrometría de masas.

En la figura 9, se indica las condiciones operacionales bajo las cuales fueron inyectados los hidrocarburos y las muestras en la columna HP-INNOWAX

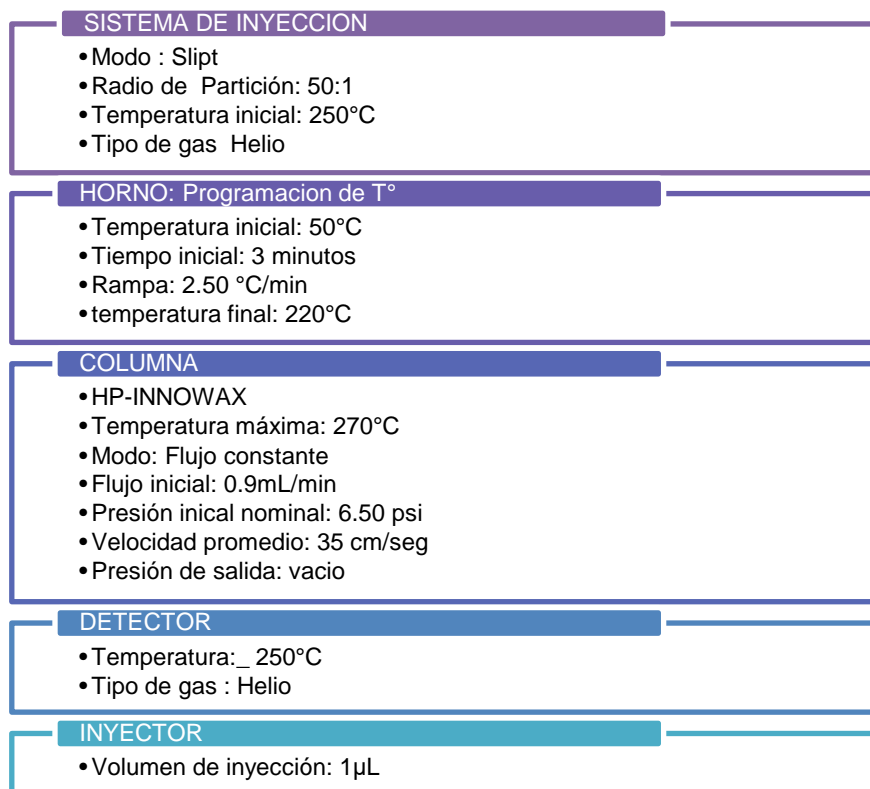


Figura 9: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna HP-INNOWAX

Fuente: La Autora

*2.1.4.1.5. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos químicos del aceite esencial de *C. ambrosioides* L., tanto en la columna polar como en la no polar.*

El cromatograma es una representación gráfica donde se pueden visualizar los compuestos, este cromatograma nos da del resultado de la corrida cromatografía. Para eso se procedió a integrar a los compuestos mediante un sistema de integración Chemstation integratorautoin1, obteniendo así los picos, que nos permite el análisis cuantitativo mediante la concentración del compuesto.

Después de obtener los cromatogramas se procedió a calcular los índices de Retención (IR) de los picos integrados, los cuales se calcularon por comparación de los tiempos de retención de los hidrocarburos (C₁₀-C₂₅) con relación al tiempo de retención de los componentes del aceite esencial aplicando la siguiente ecuación.

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

Dónde:

IR: Índice de Retención de Kovats;

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

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

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

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

La identificación de los compuestos se realizó a partir de los índices de Retención (IR) determinados experimentalmente en las corridas cromatográficas tanto en la columna polar como en la apolar, estos valores fueron comparados con los reportados por Adams (2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en otros artículos científicos. La diferencia entre el IR calculado y el leído debe ser menor a 20 unidades. También se tomó en cuenta parámetros como el número de CAS que presenta cada compuesto de tal modo que facilite la búsqueda y la identificación de los IR de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Además se puede utilizar el espectro de masas que es característico de cada compuesto, que contiene la información estructural de cada analito analizado.

2.1.4.1.6. *Corrida cromatografía en la columna DB5-MS acoplada al detector de ionización en llama (FID).*

El detector de ionización de llama (CG-FID) es un detector especialmente apropiado para medidas cuantitativas.

En la corrida cromatografía se inyectó los hidrocarburos y las muestras del aceite esencial de *C. ambrosioides*. Las condiciones en las cuales fueron inyectadas se muestran en la figura 10.

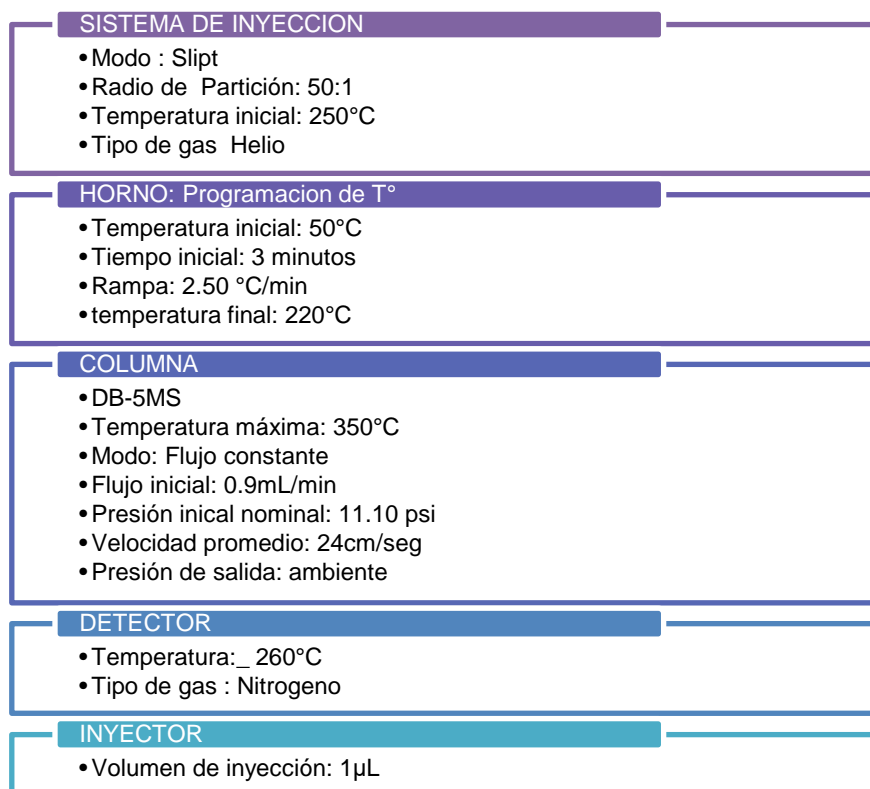


Figura 10: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna no polar DB5-MS acoplada a un detector de ionización (FID).
Fuente: La Autora.

2.1.4.1.7. Corrida cromatografía en la columna HP-INNOWAX acoplada al detector de ionización en llama (FID).

Para la corrida cromatografía por CG-FID, en columna HP-INNOWAX, se inyectaron los hidrocarburos y las muestras de aceite esencial de *C. ambrosioides*, con los parámetros expuestos en la figura 11.

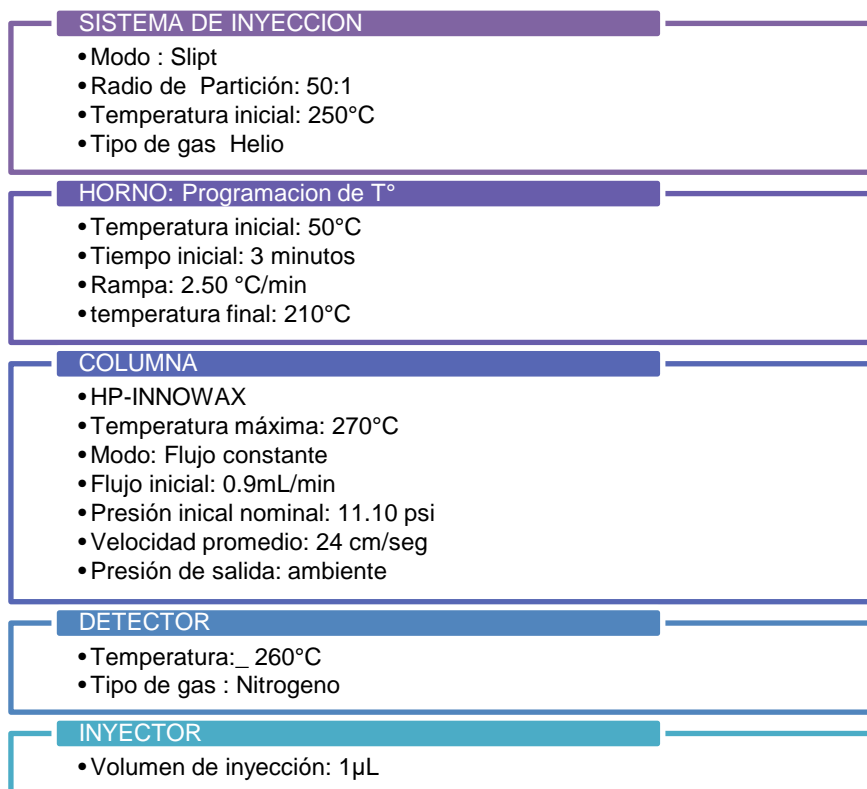


Figura 11: Condiciones operacionales para CG-EM en la columna polar HP-INNOWAX acoplada a un detector de ionización de llama (FID).

Fuente: La Autora.

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

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

2.1.5. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

La actividad biológica del aceite esencial de *C. ambrosioides* se determinó mediante el método de microdilución en caldo que evalúa la concentración mínima inhibitoria (CMI), frente a

diferentes cepas bacterianas. En este método se determina el crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo.

2.1.5.1. Cepas bacterianas empleadas.

Para evaluar la actividad biológica se hizo uso de seis cepas bacterias, estas cepas se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC).

En la tabla 2 se detallan los microorganismos de prueba.

Tabla 2: Microorganismos de prueba

MICROORGANISMOS PATÓGENOS	
CEPAS BACTERIANAS	
<i>Bacterias Gram-negativas</i>	<i>Bacterias Gram-positivas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 • <i>Salmonella typhimurium</i> LT2 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

Fuente: American Type Culture Collection

2.1.5.2. Prueba utilizada para evaluar la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. ambrosioides* se determinó utilizando el método de microdilución en caldo y se reportó como la concentración mínima inhibitoria (CMI), esta se basa en la ausencia de crecimiento bacteriana a una determinada concentración del aceite esencial.

2.1.5.2.1. Método de microdilución en caldo.

En el método de microdilución en caldo se utilizan volúmenes pequeños de la muestra que va a ser analizada. La preparación de la prueba se realiza en microplacas de plástico estéril, de 96 pocillos, que contienen diluciones seriadas.

2.1.5.2.2. Preparación de la muestra.

Para realizar la preparación de la muestra se utilizó 100µL de aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. el cual debe estar diluido en 400µL de Dimetil sulfóxido (DMSO).

2.1.5.2.3. Preparación del cultivo microbiano “Cultivo overnight”

Para la preparación del inóculo bacteriano, se realizó primeramente los caldos de cultivos específicos para cada cepa bacteriana. Para la siembra en el caldo de cultivo específico, se utilizó 30 µL de cada cepa bacteriana, almacenadas en una reserva criogénica a -80°C. Posterior a la siembra de cada cepa se procedió a incubar los medios durante 24 horas a 37 °C, por esta razón el cultivo se denomina overnight.

Las condiciones necesarias para el crecimiento de cada bacteria y los medios de cultivo necesarios se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Medios de cultivo y condiciones de incubación necesarias para las bacterias.

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

Fuente: American Type Culture collection

2.1.5.2.4. Preparación de la suspensión del inóculo bacteriano.

Del cultivo overnight incubado la noche anterior se tomaron 150 a 300 µL 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.

De la suspensión anterior se tomaron 140 μL y se inoculó en un vial 6,86 mL de Caldo Mueller Hinton, ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. De esta solución final se transfirieron 100 μL a la placa de cultivo para completar un volumen final de 200 μL , de forma que en cada pocillo la concentración final fue de 5×10^5 UFC/mL.

2.1.6.2.5. Procedimiento.

Para el análisis del aceite, se utilizó la cabina de seguridad, que previamente estaba limpia y esterilizada para evitar posibles contaminaciones. La prueba se realizó en microplacas de 96 pocillos empleando el procedimiento de dilución doble seriada: del caldo Muller Hinton se transfirió 180 μL a cada pocillo de la primera fila de la placa, en los pocillos restantes se colocaron 100 μL del mismo caldo. A continuación se colocaron 20 μL de la dilución de aceite esencial más Dimetil sulfóxido (DMSO) solo a los pocillos de la primera fila de la placa; excepto a los tres últimos pocillos los cuales van a contener: el primero, 200 μL de caldo Mueller Hinton como control de esterilidad, el segundo, un control negativo con 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de DMSO y finalmente en el tercero un control positivo, que es una mezcla de 180 μL de caldo Muller Hinton + 20 μL de Tetraciclina de 1,953 $\mu\text{g/mL}$ para todas las bacterias, excepto para *Proteus vulgaris* que se utilizó Tetraciclina de 7,813 $\mu\text{g/mL}$ y en *Pseudomonas aeruginosa* que se empleó 15,625 $\mu\text{g/mL}$.

Para obtener una homogenización del medio y la solución de aceite, se hizo un pipeteo de 15 a 20 veces en todos los pocillos, de la primera fila se tomó 100 μL de la solución homogenizada, luego se diluyó con 100 μL del pocillo siguiente y así se continuó este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas; de la última fila se desechan los 100 μL sobrantes, así la concentración final de cada solución de medio de medio y aceite contenida en cada uno de los pocillos de la placa fue de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12). El mismo procedimiento se lo realiza para el control positivo, negativo y de esterilidad.

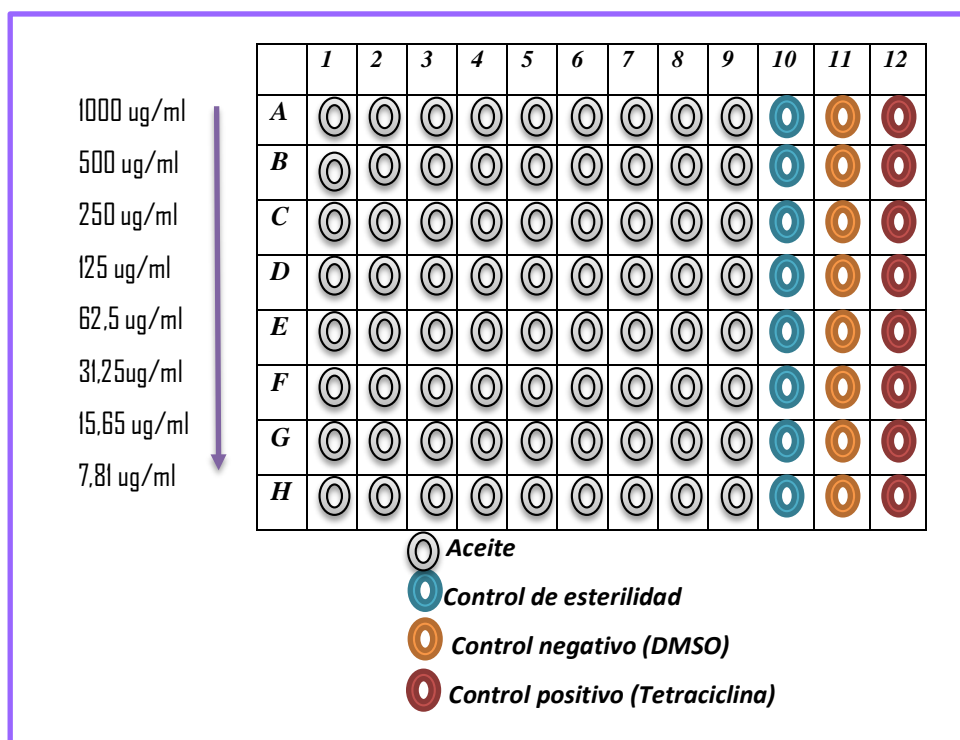


Figura 12: Microplaca TC 96 con las concentraciones del aceite (µg/mL).
Fuente: La autora

Una vez terminada la preparación de la placa de microdilución se procede a inocular todos los pocillos (excepto control de esterilidad) con 100 µL de la suspensión con el inóculo bacteriano. Llegando a tener así un volumen final de 200 µL con una población bacteriana de 5×10^5 UFC/mL, para el control de esterilidad se completó el volumen final con 100 µL de caldo Muller Hinton. Al finalizar la inoculación las placas de microdilución se sellan con parafilm y se incuban a 37°C durante 18-24 horas

2.1.5.2.6. Lectura de las placas de concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana e interpretación de los resultados.

Luego de retirar las placas de microdilución de la incubadora, se analizó minuciosamente cada caja utilizando luz reflejada; principalmente se examina el control de esterilidad y así poder descartar cualquier tipo de contaminación, al existir posible contaminación la prueba no puede ser interpretada y debe ser repetida.

El control negativo nos indicó que si existió un crecimiento adecuado, en la placa de microdilución de las bacterias. El crecimiento en este pocillo se nota como turbidez o un pellet de diámetro mayor a 2 mm.

Por ultimo en el control positivo no se debe evidenciar ningún rastro de crecimiento, por el contrario debe estar claro y sin turbidez. Para determinar en qué punto se encuentra la concentración mínima inhibitoria de una muestra, es decir la concentración más baja a la que puede actuar el aceite como antimicrobiano, se debe leer el pocillo en el cual se distinga turbidez del medio. Es un proceso manual sin ayuda de ningún aparato óptico.

2.1.6 Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, se determinó mediante dos métodos espectrofotométricos; los métodos utilizados son ABTS⁺ y DPPH . En cada método se realizó modificaciones en lo referente al procedimiento en particular a las concentraciones de las muestras y el empleo del estándar de referencia “Trolox” con la finalidad de comparar la actividad antioxidante de las muestras frente a ellos.

La actividad antioxidante se determinó según la variación de la absorbancia de los reactivos ABTS⁺ y DPPH en la presencia del aceite a diferentes concentraciones, para ello se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 333907. Las longitudes de onda empleadas en cada método fueron 734 nm y 515 nm respectivamente.

2.1.6.1. Preparación de las muestra del aceite esencial *Chenopodium ambrosioides*.

Para realizar el análisis del aceite esencial se necesitó 10 mg de muestra, seguidamente se preparó las respectivas diluciones, empezando con una concentración máxima de 10000 ppm, hasta terminar en una concentración mínima de 5 ppm, cabe mencionar que la concentración de 0 ppm solo lleva metanol.

Es necesario tener una gran cantidad de volumen de cada dilución, debido a que el análisis de cada muestra se lo realiza por triplicado. En la tabla 4, se interpretan las diluciones, se puede evidenciar que el volumen final de cada dilución es de 5000 µL.

Tabla 4: Volumen necesario para cada dilución en aceite.

Volumen necesario para cada dilución.	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (10000 ppm)	10 mg de aceite puro
Concentración 2 (1000 ppm)	5000 µL MeOH + 5 mg de aceite esencial
Concentración 3 (500 ppm)	2500 µL MeOH + 2500 µL de concentración 2
Concentración 4 (250 ppm)	2500 µL MeOH + 2500 µL de concentración 3
Concentración 5 (100 ppm)	4000 µL MeOH + 1000 µL de concentración 4
Concentración 6 (50 ppm)	2500 µL MeOH + 2500 µL de concentración 5
Concentración 7 (25 ppm)	2500 µL MeOH + 2500 µL de concentración 6
Concentración 8 (12,5 ppm)	2500 µL MeOH + 2500 µL de concentración 7
Concentración 9 (5 ppm)	3000 µL MeOH + 2000 µL de concentración 8
Concentración 10 (0 ppm)	5000 µL MeOH

Fuente: Investigación Experimental

2.1.6.2. Método de capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺.

El método ABTS⁺ [ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozalin-6 sulfónico)], consiste en formar un radical catiónico ABTS⁺ (verde-azulada) basándose en la acción oxidativa de peroxidasas u oxidadas sobre ABTS⁺ (Barrero. et al., 2004). La coloración se va perdiendo según la capacidad antioxidante del aceite esencial.

El radical ABTS⁺ presentó una absorbancia a una longitud de onda de 734 nm.

2.1.6.2.1. Solución patrón y de trabajo de ABTS⁺.

Para realizar la solución patrón se pesó 0,1015 mg de ABTS⁺ y se aforo a 25 mL con agua destilada. Luego se pesó 7,028 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈), que de igual manera se aforo a 25 mL con agua destilada. A estos reactivos se los mezcló y se dejó reposar por 12 horas protegidos de la luz.

Al haberse cumplido las 12 horas de reposo, se procedió a tomar de esta solución una alícuota de 1mL añadida a 60mL de metanol hasta obtener una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ a 734nm. Si la lectura de la absorbancia es menor al resultado que se desea obtener se debe ir añadiendo más solución de trabajo, si por el contrario la lectura de la absorbancia es mayor a

la esperada se debe añadir metanol. Previo a lectura de la absorbancia de la solución de trabajo se procedió a encerrar el equipo con metanol.

2.1.6.2.2. Estándar Trolox para ABTS⁺.

Para realizar la solución estándar se utilizó Trolox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico, este es un patrón de referencia utilizado para expresar la actividad antioxidante del aceite esencial como Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC que es la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

El estándar Trolox se realizó pesando 0,025 g de reactivo de Trolox y se afora a 100 mL con metanol puro. De esta solución preparada se obtienen alícuotas de 0, 25, 15, 3000, 450, 600, 800 y 1000 μL luego se aforan a 10 mL con metanol.

Se tomó 150 μL de cada alícuota y 2850 μL de la solución de trabajo dejándolo reaccionar durante 2 horas en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se procedió a leer la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de Trolox.

En la tabla 5, se explica cómo se realizó cada dilución, cabe destacar que el volumen final de cada una fue de 5000 μL .

Tabla 5: Volumen necesario para cada dilución en Trolox.

Volumen necesario para cada dilución Trolox	
Concentración	Volumen de cada dilución
Concentración 1 (1000 μM)	5000 μL Trolox
Concentración 2 (800 μM)	1000 μL MeOH + 4000 μL de concentración 1
Concentración 3 (600 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 2
Concentración 4 (450 μM)	1250 μL MeOH + 3750 μL de concentración 3
Concentración 5 (300 μM)	1670 μL MeOH + 3330 μL de concentración 4
Concentración 6 (150 μM)	2500 μL MeOH + 2500 μL de concentración 5
Concentración 7 (25 μM)	4170 μL MeOH + 830 μL de concentración 6
Concentración 8 (0 μM)	5000 μL MeOH

Fuente: Investigación Experimental

2.1.6.2.3. Lectura de las muestras diluidas del aceite esencial.

Para determinar la capacidad antioxidante que tiene el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, debemos ser muy precisos con la evaluación de cada muestra, tanto para cada dilución que se realizó anteriormente del aceite esencial como para cada alícuota de Trolox.

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se tomó 150 μL y se llevó a tubos de ensayo rotulados previamente, donde se le adicionó 2850 μL de la solución ABTS⁺ dando un volumen de 3 mL, se dejó reposar por dos horas en obscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración de aceite esencial



Figura 13: Muestras del aceite esencial *Chenopodium ambrosioides* analizadas mediante método ABTS⁺.

Fuente: La autora

2.1.6.3. Método DPPH.

Se realizó en base a la técnica desarrollada y descrita por Brand-Williams et al. (1995), con modificaciones de Thaipong et al.(2006). El método es útil para medir la capacidad antioxidante de diferentes compuestos por la habilidad para atrapar el radical libre. Este radical tiene una coloración purpura el mismo que se va perdiendo progresivamente cuando la muestra que se añade posee capacidad antioxidante. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realizó, empleando soluciones patrón de Trolox.

2.1.6.3.1. Solución patrón y de trabajo para DPPH.

La solución patrón se realizó pesando 24 mg de reactivo de DPPH y se aforó a 100 mL de metanol la misma fue almacenada a -4°C hasta su uso, de esta solución se tomó 10 mL y se adicionó 45 mL de metanol obteniéndose la solución de trabajo; se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm ajustando hasta obtener una lectura de $1,1 \pm 0,02$. Si la lectura

de la absorbancia es mayor se ajusta añadiendo metanol y si por el contrario es menor se ajusta añadiendo más solución de trabajo.

2.1.6.3.2. Estándar Trolox para DPPH.

Anteriormente ya mencionamos que Trolox fue utilizado como el estándar de referencia para determinar la capacidad antioxidante del aceite esencial para ambos métodos.

2.1.6.3.3. Lectura de muestras diluidas del aceite esencial.

Se idéntico que al realizar la parte experimental del método de ABTS⁺, en este método también se utilizó las mismas soluciones del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* diluidas a diferentes concentraciones tabla 4 y las diferentes concentraciones del estándar Trolox tabla 5.

Se debe mencionar que la parte experimental se realizó por triplicado de cada muestra diluida. De cada muestra se transfirió 150 μ L a un vial color ámbar para protegerlo de la luz. Este vial contiene también 2850 μ L de la solución de trabajo de DPPH. El volumen final de cada vial debe ser de 3 mL, a estos viales se los tiene que dejar reposar durante 24 horas en la oscuridad y posteriormente se lee la absorbancia de cada muestra a 515 nm.



Figura 14: Muestras del aceite esencial *Chenopodium ambrosioides* analizadas mediante el método DPPH.

Fuente: La Autora

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

Las absorbancias determinadas mediante el método ABTS⁺ y DPPH, de cada muestra de aceite esencial evaluada a diferentes concentraciones, permiten calcular el porcentaje de inhibición (% Inh) empleando la fórmula de la figura 15.

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

Figura 15: Fórmula utilizada para calcular porcentaje de inhibición.

Fuente: (Conde. et al., 2012).

Abs. blanco= absorción de solución de trabajo

Abs. muestra= absorción de la muestra de la respectiva solución

Con los valores obtenidos de % Inh, se calcula el valor de la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la muestra. El CI₅₀ de cada aceite se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. Porcentaje de inhibición (% Inh), obteniendo así, una ecuación para la curva y calculando luego la concentración para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para obtener la ecuación necesaria para calcular CI₅₀, se utilizó el programa OriginPro versión 8E.

En ambos métodos (ABTS⁺ y DPPH) se utilizó como estándar el Trolox, cuya capacidad antioxidante se evaluó en las mismas condiciones de trabajo de las muestras.

CAPITULO III

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Recolección de la materia vegetal.

La muestra vegetal de la especie de *Chenopodium ambrosioides* fue recolectada en la Provincia de Loja, al Sur del Ecuador, a una altura de 2215 m s.n.m., con las siguientes coordenadas 3°59'S y 79°14'O. En la figura 16 se puede evidenciar la ubicación geográfica de recolección dicha especie.

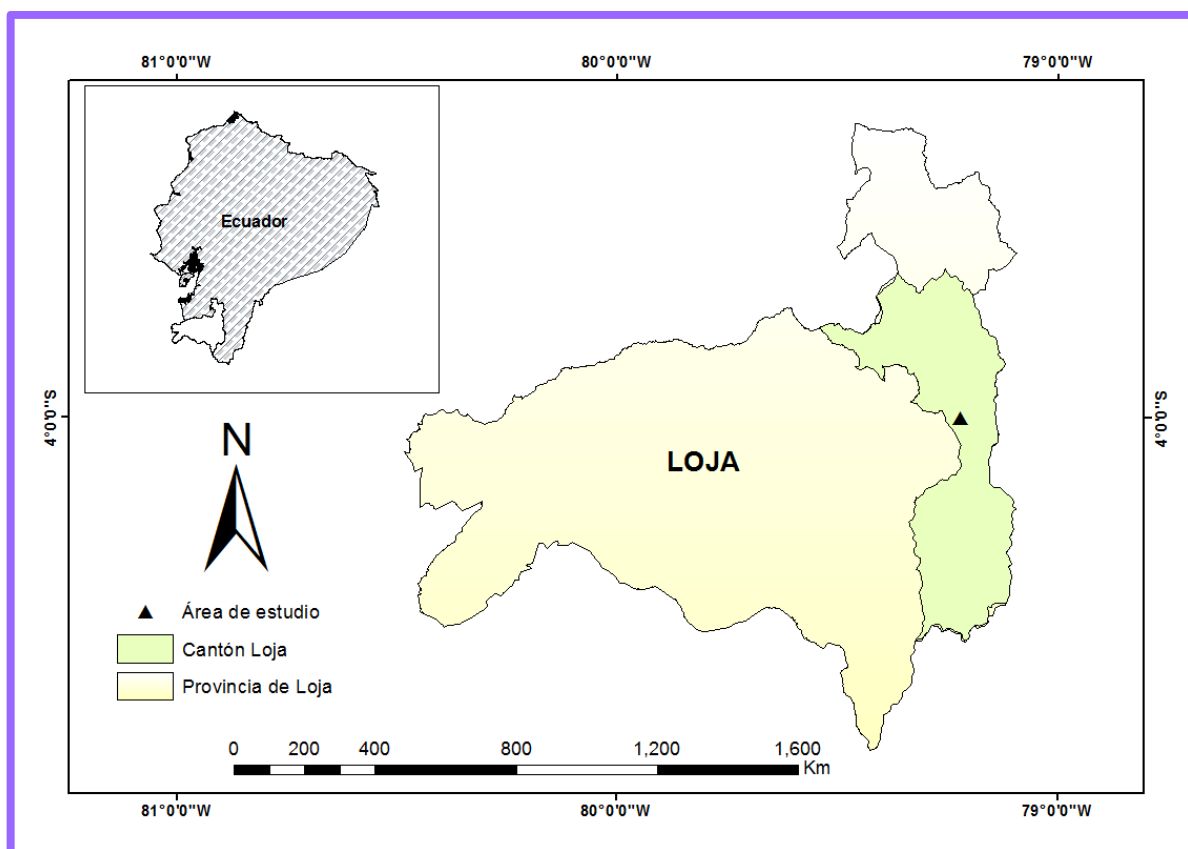


Figura 16: Área de recolección de la especie *Chenopodium ambrosioides*.

Elaboración: Mgtr. Ángel Benitez.(2017), Laboratorio de Manejo y gestión de recursos naturales de la UTPL

En la tabla 6 se encuentra detallado el peso y fecha de cada recolección de la especie *Chenopodium ambrosioides*.

Tabla 6: Peso obtenido de la recolección de la muestra vegetal

Recolección	Peso (g)	Fecha de recolección
CA 1	13098 g	16 de mayo del 2016
CA 2	13705 g	23 de mayo del 2016
CA 3	13566 g	30 de mayo del 2016

CA: *Chenopodium ambrosioides*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
Peso (g): peso de cada recolección

3.2. Extracción del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

En la tabla 7 se puede evidenciar los valores del peso de cada destilación y la cantidad de aceite extraído.

Tabla 7: Cantidad (mL) de aceite esencial extraído de cada recolección de *C. ambrosioides*.

Recolección	Peso (g)	Extracción (mL)
CA 1	13098 g	16 mL
CA 2	13705 g	22 mL
CA 3	13566 g	17 mL

CA: *Chenopodium ambrosioides*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección
Peso (g): peso de cada recolección
Extracción (mL): valor obtenido de aceite esencial de cada destilación

La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo, como desventaja tiene el requerimiento de largos periodos de tiempo y rendimientos bajos en comparación para otros métodos. (Peredo-Luna et al., 2009)

3.3. Propiedades Físicas.

Para determinar la calidad del aceite esencial de la especie *Chenopodium ambrosioides* se realizaron las pruebas de las siguientes constantes físicas: Humedad de la planta, densidad, rendimiento, índice de refracción y actividad óptica del aceite esencial obtenido.

El aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* obtenido presento un color ligeramente amarillo y un olor penetrante.

3.3.1 Determinación del Porcentaje de Humedad de la materia vegetal.

El porcentaje de humedad de la materia vegetal se expone en la tabla 8 en esta se especifica el valor de la media de cada uno de los porcentajes de humedad del material vegetal por destilación con su respectiva desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 8: Porcentaje de humedad de la materia vegetal.

Destilación	H (%)	\bar{x}	σ
CA 1	66,65	62,19	± 3,91
CA 2	60,54		
CA 3	59,38		

CA: *Chenopodium ambrosioides*: 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación
H (%): Humedad de la destilación
 \bar{x} : Media aritmética correspondiente a las tres destilaciones.
 σ : Desviación estándar

Como se puede apreciar en los resultados las tres destilaciones tienen valores muy variables y el porcentaje de humedad mayoritario corresponde a la primera destilación (66,65 %).

La media de las tres destilaciones presentan un valor de contenido de humedad en *Chenopodium ambrosioides* de 62,19 % y según la investigación de León Romani, (2009) sobre “Estudio de la extracción y determinación de la composición química del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*)” es de 72 %, se puede evidenciar una pequeña diferencia. Según la publicación de Ibarra & Paredes (2013) estos valores pueden diferir debido a varios factores físicos, ambientales y biológicos que afectaron la zona de desarrollo donde crecieron las muestras a ser analizadas.

3.3.2 Rendimiento del aceite esencial.

En la tabla 9 se explican los valores obtenidos de las tres destilaciones, el resultado de la media y su respectiva desviación estándar.

Tabla 9: Porcentaje de rendimiento de la materia vegetal.

Destilación	R (%)	\bar{x}	σ
CA 1	0,12	0,14	± 0,02
CA 2	0,16		
CA 3	0,13		

CA: *Chenopodium ambrosioides*: 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación
R (%): Rendimiento de la destilación
 \bar{x} : Media aritmética correspondiente a las tres destilaciones
 σ : Desviación estándar

De los porcentajes expuestos en la tabla anterior, el rendimiento más alto 0,16 % se obtuvo a partir de 13705 g de materia vegetal con un volumen de 22 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido fue de 0,12% a partir de 13098 g con 16 mL de aceite.

En la extracción del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* hubo un rendimiento de 0,14 %, teniendo como referente el estudio de Ibarra & Paredes,(2013) en el que se señala un rendimiento de extracción del 0,14 %, esto nos demuestra que no existe diferencia alguna. Según Stashenko, (2009) indica que de planta a planta, el rendimiento de un aceite puede variar desde 0,01 %. El rendimiento del aceite es una característica transcendental desde el punto de vista económico y de rentabilidad del proceso de su obtención.

Comparando nuestro resultado con el trabajo de investigación de León Romaní, (2009) que obtuvo un rendimiento del 0,35 % podemos apreciar una gran diferencia. León Romaní, (2009) nos dice que el rendimiento del aceite esencial, las constantes físico-químicas y la composición química del aceite esencial de paico, varían de una muestra a otra, por factores como el clima, humedad relativa del ambiente, intensidad de la luz solar que inciden en la fotosíntesis de las plantas.

3.3.3 Densidad relativa del aceite esencial.

En la tabla 10 se detallan los valores de la densidad promedio de las tres destilaciones, obteniendo un promedio final de 0,9494 g/cm³.

Tabla 10: Densidad relativa del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Destilación	Densidad (g/cm ³)	\bar{x}	σ
CA 1	0,9484	0,9494	0,006
CA 2	0,9561		
CA 3	0,9436		

CA: *Chenopodium ambrosioides*: 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación
 \bar{x} : Media aritmética correspondiente a las tres destilaciones

Según Ortuño (2006) la densidad de los aceites nos permite distinguir la autenticidad. La mayoría de los aceites esenciales tienen una densidad menor que al agua (1 g/cm³), pero hay algunos aceites esenciales con densidad mayor, como los de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo de olor.

La densidad de las esencias varía entre 0,8 y 1,2 g/cm³: la mayoría de ella son más ligeras que el agua, con una densidad de 0,85 a 0,98. La densidad de una misma esencia varía dependiendo de su edad y modo de extracción; las esencias viejas son más pesadas que las frescas. (Vintage, 2010). El valor obtenido en el aceite es de 0,9494 g/cm³ y comparado con la literatura se encuentra dentro de los valores de referencia.

3.3.4. Índice de refracción del aceite esencial.

Los índices de refracción se detallan en la tabla 11, estos valores corresponden a la media de las tres destilaciones realizadas. Se puede evidenciar que el valor más alto corresponde a la primera destilación con un índice de refracción de 1,4837, mientras que la segunda y tercera destilación coincide con un mismo valor de 1,4828.

Tabla 11: Índice de refracción del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Destilación	Índice de Refracción (nD)	\bar{x} :	σ
CA 1	1,4837		
CA 2	1,4828	1,4828	0,0005
CA 3	1,4828		

CA: *C. ambrosioides*: 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación
 \bar{x} : Media aritmética correspondiente a las tres destilaciones
 σ :Desviación estándar

El índice de refracción que se encontró en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* es de 1,4828 comparando nuestro resultado con el valor de Ibarra & Paredes (2013) es de 1,472 y (León Romaní, 2009) es de 1,476, estos valores demuestran que la diferencia existente con nuestro resultado no es muy distante.

Peredo et al. (2009) nos señala que el índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial que nos indica la adulteración y cambia cuando este se diluye o mezcla con otras sustancias.

3.3.5. Actividad óptica.

En la tabla 12 se muestra el valor promedio del índice de refracción obtenido en las tres destilaciones

Tabla 12: Actividad óptica específica del aceite esencial.

Destilación	Actividad óptica	\bar{x}	σ
CA 1	-75,96	-75,98	0,85
CA 2	-74,94		
CA 3	-77,04		

CA: *C. ambrosioides*: 1 Primera destilación; 2 Segunda destilación; 3 Tercera destilación
 \bar{x} : Media aritmética correspondiente a las tres destilaciones
 σ : Desviación estándar

Como se puede evidenciar en la tabla 12, el valor promedio de la actividad óptica es de -75,98, dicha actividad es levógira, porque rota la luz polarizada en sentido contrario a las agujas del reloj, es decir es una sustancia ópticamente activa y no posee adulteración alguna.

El conocimiento de la pureza óptica específica, definida como la relación entre la rotación óptica específica medida y la del enantiómero puro, permite determinar distintos tipos de adulteraciones, tales como adición de compuestos sintéticos o componentes de diferentes orígenes botánicos, los cuales podrían dañar drásticamente las propiedades biológicas u olfatorias, íntimamente relacionadas con la pureza estereoquímica de los mismos. (Zambón, Chamorro, & Casuscelli, 2015)

3.4. Composición Química del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

La composición química del aceite esencial obtenido de la especie *C. ambrosioides* fue analizado en la columna DB5-MS y HP-Innowax.

3.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo.

En la figura 17, se muestran los perfiles cromatográficos del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* obtenidos en la columna no polar (DB5-MS) y en la columna polar (HP-Innowax) mediante la técnica de CG-EM.

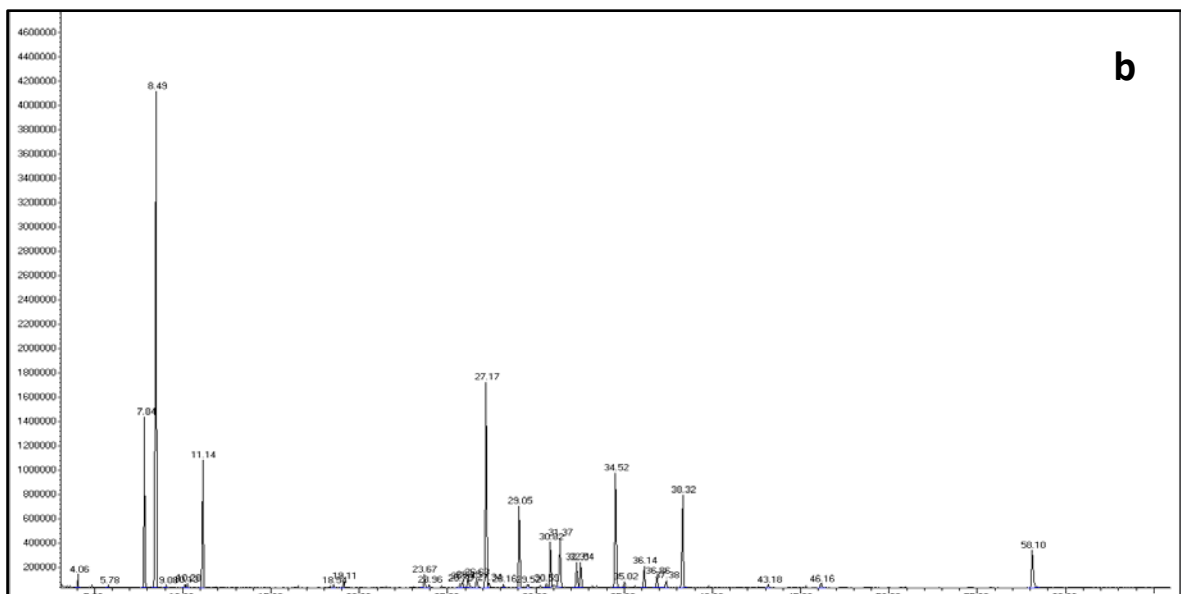
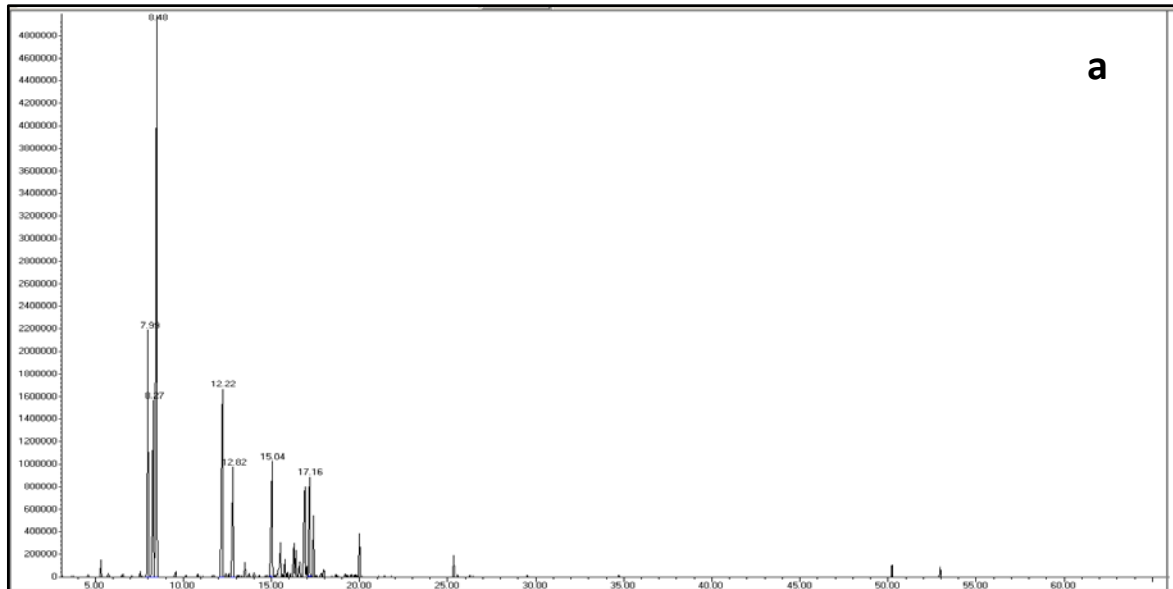


Figura 17: Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* (a) columna no polar (DB5-MS); (b) columna polar (HP-Innowax)

En los cromatogramas figura 17, se puede observar los picos integrados y cada uno de estos representa un compuesto de área proporcional a su concentración.

En la tabla 13, se encuentra detallada la composición química del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* en las columnas DB5-MS y HP-INNOWAX; estos compuestos se encuentran detallados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS, se puede evidenciar que los compuestos con mayor área se encuentran resaltados, así mismo se indican los índices de Retención experimentales y los reportados en la literatura; junto a la

cantidad relativa que corresponde al porcentaje de participación de cada compuesto para la primera (CA1), segunda destilación, (CA2) y tercera destilación (CA3), y la desviación estándar.

Tabla 13: Composición química de *Chenopodium ambrosioides*.

Nº	COMPUESTOS	DB5MS-EM							HP-Innowax						
		IR ^{cal}	IR ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	σ	IR ^{cal}	IR ^{ref}	% de Cantidad Relativa			\bar{x}	σ
				CA1	CA2	CA3					CA1	CA2	CA3		
1	α-Pinene	912	932 ^b	0,52	0,40	1,07	0,67	0,36	1030	1033 ^l	0,39	0,26	0,67	0,44	0,21
2	Camphene	929	946 ^b	0,13	0,11	0,30	0,18	0,10	1066	1076 ^c	0,67
3	β-Pinene	962	974 ^b	0,19	1106	1096 ⁱ	0,14
4	o-Cymene	1000	1022 ^b	0,22	0,21	0,75	0,39	0,31	1216	1187 ^h	0,12	0,42	0,27	0,21
5	α-Terpinene	1011	1014 ^b	9,93	12,22	4,34	8,83	4,05	1177	1182 ^l	7,70	9,33	2,35	6,46	3,65
6	p-Cymene	1018	1020 ^b	8,15	13,55	5,07	8,92	4,29	1270	1269 ^j	6,79	11,67	2,90	7,12	4,40
7	Limonene	1024	1024 ^b	30,52	17,70	40,98	29,73	11,66	1200	1202 ^l	29,33	16,52	33,51	26,45	8,85
8	γ-Terpinene	1051	1054 ^b	0,21	0,21	0,16	0,19	0,03	1259	1253 ^l	0,15	0,16	0,15	0,01
9	p-Cymenene	1082	1060 ^b	0,13	0,17	0,15	0,02
10	trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1116	1119 ^b	11,51	8,79	12,27	10,86	1,83	1631	1654 ^j	14,06	11,52	17,13	14,24	2,81
11	cis-Limonene oxide	1124	1032 ^b	0,15	0,11	0,23	0,17	0,06	1441	1458 ^d	0,21
12	cis-p-Mentha-2,8-dien-1-ol	1129	1133 ^b	5,33	4,03	5,18	4,85	0,71	1673	1439 ⁱ	5,59	4,48	5,88	5,32	0,74
13	trans-Limone oxide	1145	1137 ^b	0,67	0,45	0,76	0,63	0,16	1454	1445 ^d	0,42	0,57	0,49	0,10
14	Pinocarvone	1151	1160 ^b	0,15	0,13	0,20	0,16	0,04	1660	1665 ^l	0,20	0,24	0,22	0,03
15	Isopulegol	1157	1145 ^b	0,19	0,19	0,44	0,27	0,15	1554	1572 ^m	0,94	0,87	0,82	0,88	0,06
16	trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1180	1187 ^b	7,28	6,15	7,27	6,90	0,65	1892	1868 ^l	6,75	6,60	9,43	7,59	1,59
17	cis-Dihidro carvone	1189	1191 ^b	0,41	0,29	0,35	0,09	1601	1608 ⁱ	0,52	0,36	0,40	0,42	0,08
18	Verbanol	1191	1197 ^b	1,95	2,01	1,45	1,80	0,31
19	Pulegone	1197	1233 ^b	0,82	0,63	0,67	0,70	0,10	1608	1646 ^l	0,82	0,55	0,72	0,70	0,13
20	Myrtenal	1204	1195 ^b	0,14	0,13	0,14	0,01	1684	1648 ^d	0,37	0,50	0,43	0,09
21	Cis-Piperitol	1208	1195 ^b	1,57	1,13	0,90	1,20	0,34	1754	1733 ^j	1,91	1,55	1,25	1,57	0,33
22	Trans-Carveol	1211	1215 ^b	1,30	1,12	1,42	1,28	0,15	1839	1818 ^l	1,51	1,43	2,04	1,66	0,33
23	Verbenone	1216	1204 ^b	0,72	0,63	1,21	0,85	0,31
24	cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1222	1227 ^b	5,48	4,71	6,31	5,50	0,80	1800	1779 ⁱ	8,71	7,98	9,71	8,80	0,87
25	cis-Carveol	1225	1226 ^b	0,45	0,50	0,48	0,04	1870	1847 ⁱ	0,51	0,45	0,67	0,54	0,11
26	Ascaridole	1228	1234 ^b	5,32	16,11	3,11	8,18	6,96	1857	1889 ^c	0,91	2,02	0,78	1,24	0,68

27	Carvone	1234	1239 ^b	2,86	2,15	2,33	2,44	0,37	1726	1732 ^l	4,25	3,01	3,60	3,62	0,62	
28	cis-Piperitone epoxide	1243	1250 ^b	0,14	0,24	0,19	0,07	1754	1733 ^k	1,88	1,92	1,48	1,76	0,24	
29	Bornyl acetate	1275	1284 ^b	0,12	
30	Thymol	1287	1284 ^b	0,17	2199	2198 ⁿ	0,65	
31	Isobornyl acetate	1293	1283 ^b	2,10	4,81	1,07	2,66	1,93	
32	Isobornyl propanoate	1419	1376 ^b	0,96	0,78	0,87	0,13	
33	Verbenol								1635	1613 ^m	0,39	0,39	0,33	0,37	0,03	
34	trans-Pinocarveol	1653	1664 ⁿ	0,31	0,25	0,30	0,29	0,03	
35	α-Humulene	1700	1662 ^l	0,33	
36	Neral	1708	1692 ^l	0,35	0,50	0,43	0,11	
37	γ-Terpineol	1714	1685 ⁿ	2,79	13,97	1,15	5,97	6,97	
38	Citronellol	1812	1772 ^f	0,40	0,36	0,38	0,03	
39	Viridiflorol	2016	2065 ^g	0,26	0,33	0,26	0,28	0,04	
TOTAL IDENTIFICADO									92,86		TOTAL IDENTIFICADO				90,38	

a=% promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-ms y HP-Innowax respectivamente.

*****= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

CA1=Aceite de la primera destilación; **CA2**= Aceite de la segunda destilación; **CA3**= Aceite de la tercera destilación

\bar{X} = Promedio

σ = Desviación estándar

IR^{cal}= Índice de Retención calculado

IR^{ref}= Índice de Retención reportado en la literatura: ^bref.: (Adams, 2009); ^cref.: (Baser, Tümen, Tabanca, & Demirci, 2001); ^dref.: (Chalchat, Maksimovic, Petrovic, & Gorunovic, 2004);

^eref.: (Demirci, Can, Yıldız, & Bahçecioglu, 2003); ^fref.: (El-Olemy et al., 2005); ^gref.: (Hachicha, Skanji, Barrek, Zarrouk, & Zeineb, 2007); ^href.: (Hua, Wang, & Lei, 2011); ⁱref.: (Hüsñü, Aytac, & Duman, 2000); ^jref.: (Hüsñü, Demirci, Tabanca, Ozek, & Nezhun, 2001); ^kref.: (Mancini et al., 2009); ^lref.: (Pino, Rodríguez, Beldarraín, & Blandariz, 2014); ^mref.: (E. E. Stashenko, Jaramillo, & Martínez, 2003); ⁿref.: (Young, Chao, Casablanca, Bertrand, & Minga, 2007).

En la figura 18, se detallan los compuestos con mayor porcentaje del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* de la columna BD5-MS, entre estos se encuentran: Limonene (29,73%), trans-p-Mentha-2,8-dien-1-ol (10,86%), p-Cymene (8,92%), α -Terpinene (8,83%), trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol (6,90%), cis-p-Mentha-28-dien-2-ol (4,85%), Carveol (1,28%), cis-Piperitol (1,20%).

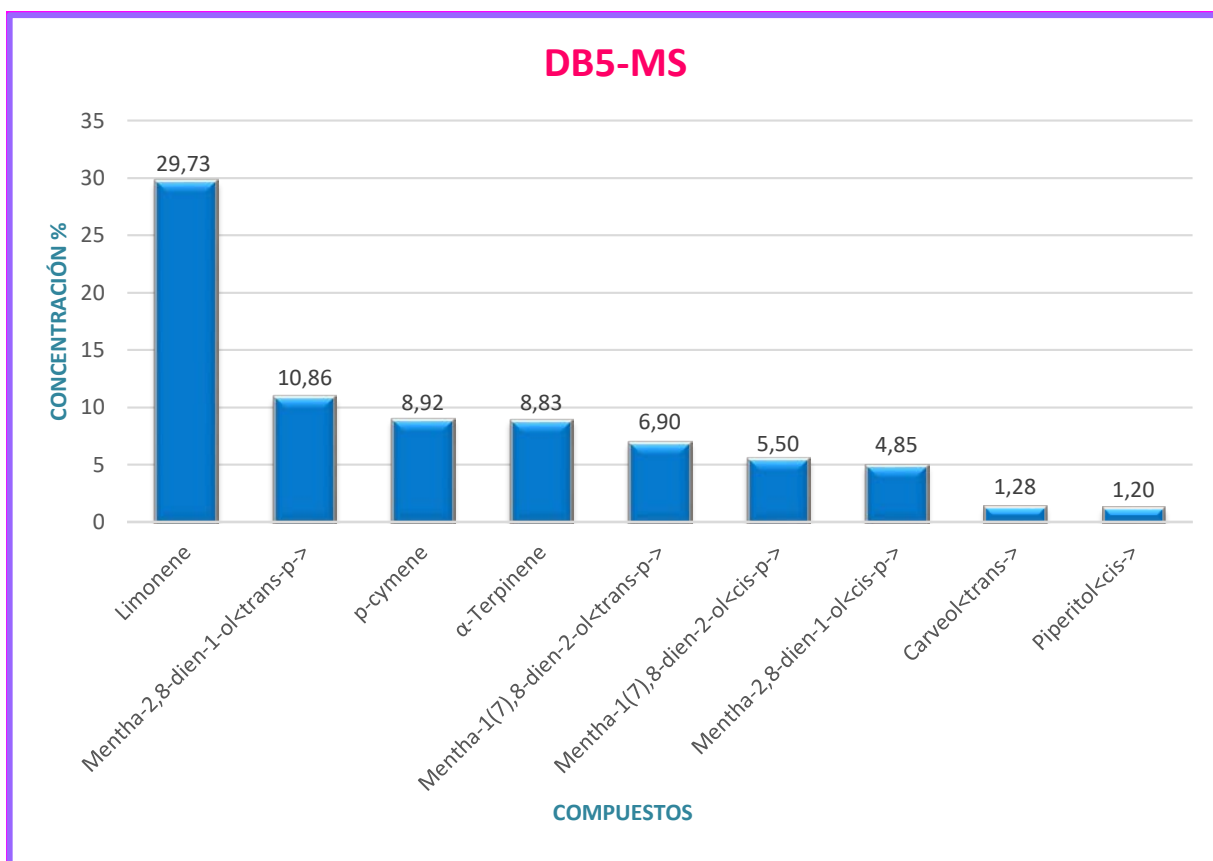


Figura 18: Compuestos mayoritarios en la columna no polar (DB5-MS)

A continuación describimos algunas características de los compuestos mayoritarios.

Limonene: es uno de los terpenos más comunes en la naturaleza, es utilizado como agente aromatizante y puede encontrarse en alimentos comunes como zumos de fruta, refrescos, productos horneados, helados y budines. En humanos, el d-limonene ha demostrado una baja toxicidad en dosis única. (Sun, 2007)

p-Cymene: es un compuesto orgánico aromático natural. Es insoluble en agua, pero miscible con etanol y éter. Cymene es un componente de una serie de aceites esenciales, utilizado en productos ambientales. (NCBI, 2017)

α -Terpinene: es un terpeno constituyente de muchos aceites esenciales, es utilizado como agente aromatizante. (NCBI, 2017)

Carveol: pertenece a la familia de monoterpenos monocíclicos. Carveol es un aromatizante que es utilizado como una fragancia en los cosméticos y como un aditivo de sabor en la industria alimentaria. (NCBI, 2017)

Piperitol: pertenece a la familia de monoterpenos monocíclicos. Es un material de sabor con un sabor picante. (NCBI, 2017)

Los porcentajes de los compuestos mayoritarios obtenidos en la columna HP-Innowax se pueden evidenciar en la tabla 19, entre estos compuestos tenemos:

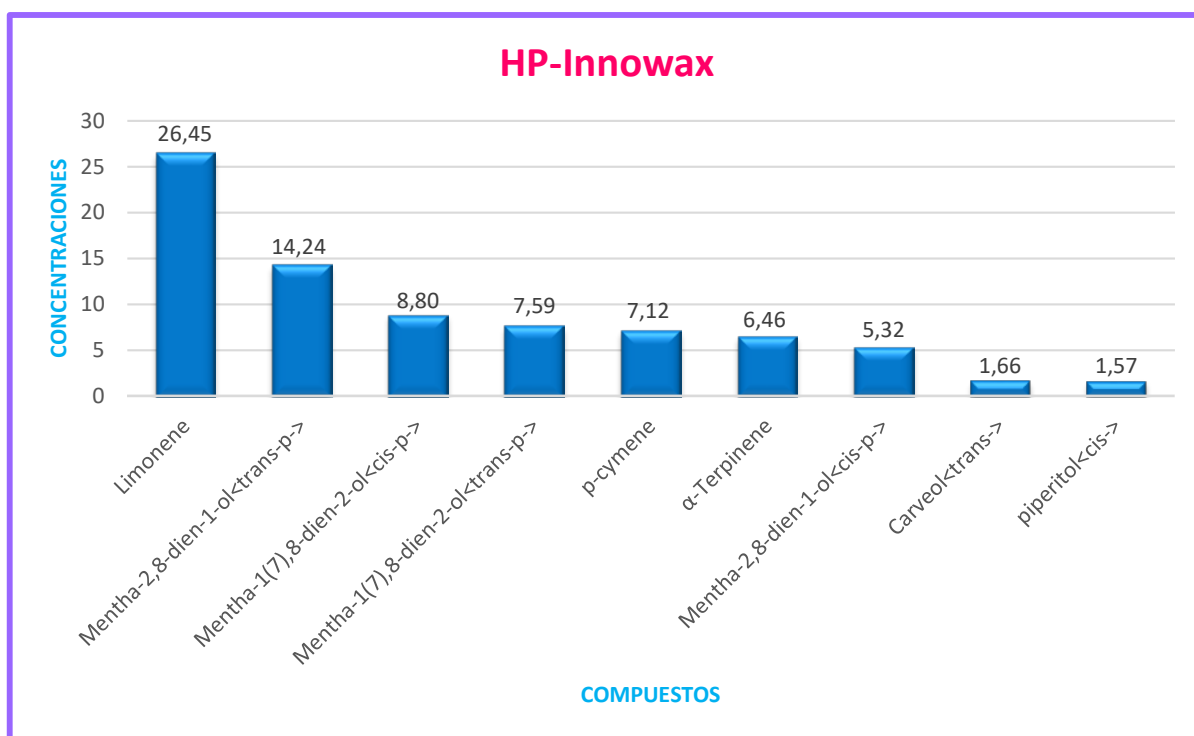


Figura 19: Compuestos mayoritarios en la columna polar (HP-Innowax)

Tabla14: Comparación de la cantidad relativa (%) de los compuestos químicos del aceite esencial por CG-EM y CG-FID.

Nº	COMPUESTOS	DB5MS-EM										HP-Innowax											
		% de Cantidad Relativa						\bar{x}		σ		% de Cantidad Relativa						\bar{x}		σ			
		CA1		CA2		CA3		MS	FID	MS	FID	MS	FID	CA1		CA2		CA3		MS	FID	MS	FID
		MS	FID	MS	FID	MS	FID							MS	FID	MS	FID	MS	FID				
1	α -Pinene	0,52	0,6	0,40	0,37	1,07	1,04	0,67	0,67	0,36	0,34	0,39	0,32	0,26	0,25	0,67	0,68	0,44	0,42	0,21	0,23		
2	Camphene	0,13	0,13	0,11	0,13	0,30	0,28	0,18	0,18	0,10	0,09	0,16	0,18		
3	β -Pinene	0,19	0,18	0,19	0,18	0,14	0,15		
4	<i>o</i> -Cymene	0,22	0,24	0,21	0,23	0,75	0,61	0,39	0,36	0,31	0,22	0,12	0,13	0,42	0,39	0,27	0,26	0,21	0,18		
5	α -Terpinene	9,93	8,44	12,22	12,02	4,34	4,16	8,83	8,21	4,05	3,93	7,70	7,94	9,33	9,10	2,35	2,61	6,46	6,55	3,65	3,46		
6	<i>p</i> -Cymene	8,15	8,09	13,55	12,65	5,07	5,01	8,92	8,58	4,29	3,84	6,79	6,9	11,67	11,9	2,90	2,65	7,12	7,16	4,4	4,65		
7	Limonene	30,5	29,3	17,70	17,57	40,98	39,46	29,73	28,78	11,66	10,95	29,33	29,00	16,52	16,80	33,51	35,95	26,45	27,3	8,85	9,69		
8	γ -Terpinene	0,21	0,19	0,21	0,27	0,16	0,17	0,19	0,21	0,03	0,05	0,15	0,17	0,16	0,15	0,15	0,16	0,01	0,01		
9	<i>p</i> -Cymenene	0,13	0,17	0,17	0,16	0,15	0,17	0,02	0,00		
10	trans- <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	11,5	11,2	8,79	7,53	12,27	12,03	10,86	10,24	1,83	2,39	14,06	14,58	11,52	11,53	17,13	17,09	14,24	14,4	2,81	2,78		
11	cis-Limonene oxide	0,15	0,16	0,11	0,14	0,23	0,26	0,17	0,19	0,06	0,07	0,21	0,22		
12	cis- <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	5,33	5,47	4,03	4,01	5,18	5,63	4,85	5,04	0,71	0,89	5,59	0,42	4,48	4,95	5,88	5,6	5,32	3,66	0,74	2,82		
13	trans-Limonene oxide	0,67	0,71	0,45	0,44	0,76	0,76	0,63	0,64	0,16	0,17	0,42	0,42	0,25	0,15	0,57	0,60	0,41	0,39	0,16	0,23		
14	Pinocarvone	0,15	0,2	0,13	0,15	0,20	0,21	0,16	0,19	0,04	0,04	0,20	0,23	0,24	0,29	0,22	0,26	0,03	0,04		
15	Isopulegol	0,19	0,19	0,19	0,18	0,44	0,41	0,27	0,26	0,15	0,13	0,94	0,78	0,87	0,9	0,82	0,83	0,88	0,83	0,06	0,06		
16	trans- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	7,28	7,18	6,15	6,68	7,27	7,54	6,90	7,13	0,65	0,43	6,75	6,67	6,60	6,22	9,43	9,19	7,59	7,36	1,59	1,6		
17	cis-Dihidro carvone	0,41	0,43	0,29	0,29	0,35	0,36	0,09	0,10	0,52	0,57	0,36	0,35	0,40	0,37	0,42	0,43	0,08	0,12		
18	Verbanol	1,95	1,71	2,01	2,02	1,45	1,73	1,80	1,82	0,31	0,17		
19	Pulegone	0,82	0,74	0,63	0,85	0,67	0,60	0,70	0,73	0,10	0,12	0,82	0,78	0,55	0,55	0,72	0,76	0,70	0,69	0,13	0,13		
20	Myrtenal	0,14	0,16	0,13	0,47	0,14	0,31	0,01	0,22	0,37	0,39	0,50	0,32	0,43	0,36	0,09	0,05		
21	cis-Piperitol	1,57	1,7	1,13	1,17	0,90	0,92	1,20	1,27	0,34	0,40	1,91	1,91	1,55	1,61	1,25	1,34	1,57	1,62	0,33	0,28		
22	trans-Carveol	1,3	1,61	1,12	1,17	1,42	1,87	1,28	1,55	0,15	0,36	1,51	1,42	1,43	2,04	2,04	2,16	1,66	1,87	0,33	0,4		
23	Verbenone	0,72	0,81	0,63	0,86	1,21	1,29	0,85	0,99	0,31	0,26		
24	cis- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	5,48	6,04	4,71	4,57	6,31	6,87	5,50	5,83	0,80	1,17	8,71	8,40	7,98	7,55	9,71	9,34	8,80	8,43	0,87	0,9		
25	cis-Carveol	0,45	0,76	0,50	0,57	0,48	0,66	0,04	0,13	0,51	0,55	0,45	0,48	0,67	0,61	0,54	0,55	0,11	0,06		

26	Ascaridole	5,32	5,42	16,11	16,66	3,11	2,98	8,18	8,35	6,96	7,30	0,91	0,94	2,02	2,04	0,78	0,79	1,24	1,26	0,68	0,68
27	Carvone	2,86	2,99	2,15	2,26	2,33	2,00	2,44	2,42	0,37	0,52	4,25	4,36	3,01	3,29	3,60	3,31	3,62	3,65	0,62	0,62
28	cis-Piperitone epoxide	0,14	0,16	0,24	0,37	0,19	0,27	0,07	0,15	1,88	1,8	1,92	2,12	1,48	1,54	1,76	1,82	0,24	0,29
29	Bornyl acetate	0,12	1,23	0,12	1,23
30	Thymol	0,17	0,22	0,17	0,22	0,65	0,68
31	Isobornyl acetate	2,1	2,35	4,81	4,57	1,07	1,15	2,66	2,69	1,93	1,73
32	Isobornyl propanoate	0,96	0,96	0,78	0,94	0,87	0,95	0,13	0,02
33	Verbenol											0,39	0,41	0,39	0,40	0,33	0,32	0,37	0,38	0,03	0,05
34	trans-Pinocarveol											0,31	0,29	0,25	0,28	0,30	0,31	0,29	0,29	0,03	0,02
35	α -Humulene											0,33	0,32
36	Neral											0,35	0,37	0,50	0,45	0,43	0,41	0,11	0,05
37	γ -Terpineol											2,79	2,95	13,97	13,82	1,15	1,19	5,97	5,99	6,97	6,84
38	Citronellol											0,40	0,41	0,36	0,25	0,38	0,33	0,03	0,11
39	Viridiflorol											0,26	0,24	0,33	0,33	0,26	0,59	0,28	0,39	0,04	0,18
*TOTAL IDENTIFICADO									92,86	92,05		**TOTAL IDENTIFICADO						90,30	89,37		

Compuestos según el orden de elución de la columna DB5-ms

*= Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB5-ms-Masas y DB5-ms_Fid

**= sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-Innowax-Masas y HP-Innowax-FID

CA1=Aceite de la primera destilación; **CA2**= Aceite de la segunda destilación; **CA3**= Aceite de la tercera destilación

\bar{x} = Promedio

La determinación química del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* permitió identificar 22 compuestos químicos; mediante la columna no polar (DB5-MS) se identificaron 32 compuestos con un porcentaje de identificación de 92,86 % y en la columna polar (HP-Innowax) se pudo identificar 33 compuestos químicos con un porcentaje de 90,30 % de identificación.

Según Gómez, (2008) los principales compuestos del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* son productos de naturaleza monoterpénica (C10) y sesquiterpénica (C15) principalmente el ascaridol que puede llegar a tener una concentración del 70 %, así mismo se puede llegar a encontrar limoneno, transpinocarveol, aritosona, β - pineno, mirceno, felandreno, alcanfor y α -terpineol.

Los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *C. ambrosioides* son similares a los reportados por otros investigadores, en el estudio que realizo (Torres, Ricciardi, Agrelo de Nassiff, & Ricciardi, 1997) se encontraron α -pineno (13,5%), β -pineno (5%), α -terpineno (3,5%), limoneno(4 %), trans-pinocarveol (1,42%) p-cimeno(1,7%), ascaridol (8,6%), timol (0,7%), mientras que en los resultados de (Jaramillo C et al., 2012) se evidencian con mayor porcentaje los siguientes compuestos: β -pineno (0,11%) , α -Terpineno (60,29), Limoneno (1,10%), Timol (1,02%), Trans-ascaridol (1,91%) y α -Humulene (0,22%).

Los resultados respecto a la composición química de los aceites esenciales difieren en el tipo o proporción de los compuestos encontrados; esto puede ser debido a las condiciones geobotánicas del medio, al método de cultivo, a la técnica de extracción, el estado vegetativo de la especie utilizada, a la época de recolección, entre otras. (Jaramillo C et al., 2012)

Torres et al., (1997) nos menciona que cuando un compuesto no se evidencia en una columna cromatográfica esto se puede atribuir a una deficiencia instrumental, ya que el alto voltaje de ionización posiblemente implique la fragmentación inmediata del componente.

3.5. Actividad biológica del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permitieron medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos determinando la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal y la concentración de la droga en el organismo humano.

3.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana.

En la siguiente tabla se observa la CMI antibacteriana de los aceites obtenidos en cada recolección frente a 5 cepas bacterianas Gram-negativas y 1 cepa Gram-positiva.

Tabla 15: CMI antibacteriana ($\mu\text{g/ml}$) del aceite esencial frente a 6 cepas bacterianas.

Concentración mínima inhibitoria de <i>Chenopodium ambrosioides</i> mg/ml						
	Gram negativas					Gram Negativa
Aceite esencial	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 mg/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 9997 mg/mL	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC842 7 mg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 mg/mL	<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2) mg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mg/mL
CA 1	5	5	5	10	5	10
CA 2	1,25	1,25	2,5	10	5	10
CA 3	0,625	0,625	1,25	10	2,5	5
Antibiótico Tetraciclina $\mu\text{g/ml}$	1,953	1,953	7,813	15,625	1,953	1,953

Fuente: La Autora

En la tabla 15 se encuentran detallados los resultados adquiridos para las bacterias del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L, se puede apreciar que la bacteria Gram-positiva no presentó actividad frente a ninguna concentración, no siendo así para algunas bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* que presentan CMI de 0,625 mg/mL en la tercera destilación.

Holetz et al., (2002) nos clasifica los parámetros de la actividad antimicrobiana:

Buena: CMI < 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 mg/ml)

Moderada: CMI < 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$ (0,1-0,5 mg/ml)

Débil: CMI < 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (0,5-1 mg/ml)

Inactiva: CMI < más de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1 mg/ml)

De acuerdo a esta clasificación podemos mencionar que el aceite en estudio presenta una CMI débil frente a las dos bacterias Gram-negativas (*E. Coli* y *Klebsiella pneumoniae*).

En varias literaturas se encuentra reportado al ascaridol como el principio activo de esta planta por poseer un mecanismo de acción paralizante y narcótica sobre los *ascaris*. A *Chenopodium ambrosioides* se le atribuye propiedades antihelmínticas, antipalúdicas, antiinflamatorias, analgésicas, purgante. A mediados del ciclo XX este remedio era bastante utilizado contra parásitos intestinales, pero después ha sido reemplazado por otras hierbas menos tóxicas.

En ciertos estudios sobre *E. coli* se ha demostrado que el timol destruye la integridad y afecta al potencial eléctrico de la membrana plasmática de la célula bacteriana, lo que conduce finalmente a la lisis celular. Esto ocurre en los siguientes cinco minutos a la adición del timol.

Es importante mencionar que la efectividad frente a bacterias de los aceites esenciales que contienen compuestos fenólicos, especialmente timol y carvacrol, se suele atribuir a la presencia de dichos compuestos. Estos provocan la inhibición del crecimiento de los microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, dañando la integridad de la membrana plasmática, afectando al pH y al equilibrio de iones inorgánicos. (Martínez, 2008).

3.6. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* se realizó mediante dos métodos espectrofotométricos: ABTS⁺ y DPPH.

3.6.1. Método ABTS⁺.

El radical ABTS⁺ se genera a partir de su precursor [ácido 2,2-anizobis-(3-etilbenzotiozalin-6 sulfónico)], el radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable. (Agudo, 2002)

3.6.1.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.

Al evaluar la capacidad antioxidante de la muestra de aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, mediante el método de ABTS⁺ a diferentes concentraciones del estándar de

referencia como: Trolox con la que se trabajó en el equipo de espectrofotometría, arrojaron datos de absorbancia, los cuales se reemplazaron con la fórmula de porcentaje de inhibición que se encuentra en la figura 16, en el capítulo de metodología. Los resultados que se obtuvieron tras realizar estos cálculos se expresan en la tabla 16 que indica los valores de porcentaje de disminución respectivos para cada concentración.

Tabla 16: Datos del método ABTS+ para el estándar TROLOX.

DATOS ABTS+		
TROLOX		
Concentración (μM)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0	100
800	0	100
600	0,095	91,5
450	0,339	69,68
300	0,594	46,87
150	0,809	27,64
25	0,995	11
0	1,026	8,23
Absorbancia de solución de trabajo de 1,118		

3.6.1.2. Lectura de las muestras del aceite esencial.

Se determinó la actividad antioxidante del aceite esencial *Chenopodium ambrosioides* a diferentes concentraciones como se puede observar en la siguiente tabla. Comprobando a la vez el porcentaje de disminución.

Tabla 17: Datos del método ABTS+ para el aceite esencial.

Aceite <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)		
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
10000	0,202	81,93
1000	0,874	21,82
500	0,932	16,64
250	0,981	12,25
100	1,005	10,11
50	1,012	9,48
25	1,018	8,94
12,5	1,015	9,21
5	1,004	10,2
0	1,019	8,86

Absorbancia de solución de trabajo de 1,118

Los resultados obtenidos en la tabla 17 nos permiten evidenciar la actividad antioxidante que presenta el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* en su mayor concentración (10000 ppm) con un porcentaje de disminución de 81,93% y en la concentración de 1000 ppm presenta un porcentaje de disminución de 21,82% que comparada a los valores frente al radical ABTS donde se emplearon estándares de referencia y su concentración máxima (1000 ppm) fue de 100%. Los aceites esenciales necesitan un porcentaje igual o mayor al 50% de disminución para poder especificar que presentan actividad antioxidante.

Jaramillo et al., (2012), menciona que la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *C. ambrosioides* puede ser atribuida a diversas razones, como son: la presencia de compuestos fenólicos como el estragol, timol y carvacrol, que aunque están en pequeñas proporciones en el AE pueden ejercer una actividad antioxidante como captadores de radicales y por los hidrocarburos de naturaleza monoterpénica o sesquiterpénica, que puedan actuar de forma similar al terpineno; es por esta razón que los aceites esenciales que no contienen compuestos fenólicos en su composición, pueden actuar como antioxidantes.

3.6.2. Método DPPH.

El método DPPH, es el más rápido, simple y de menos costo en comparación con otros métodos, se leyó a una absorbancia de 734nm, sus resultados son expresados como porcentaje de disminución.

3.6.2.1. Lectura de las muestras del estándar de referencia TROLOX.

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

En la tabla 18 se indican las concentraciones utilizadas, los valores de absorbancia para cada concentración y los porcentajes de disminución de DPPH calculados para cada concentración establecida

Tabla 18: Datos del método DPPH para el estándar TROLOX.

ATOS DPPH		
TROLOX		
Concentración (μM)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
1000	0,044	96,07
800	0,187	83,29
600	0,38	66,04
450	0,555	50,4
300	0,726	35,12
150	0,899	19,66
25	1	8,67
0	1,002	10,46

Absorbancia de solución de trabajo de 1,119

3.6.2.2. Lectura de las muestras del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Se determinó la actividad antioxidante del aceite esencial *Chenopodium ambrosioides* a diferentes concentraciones como se puede observar en la tabla. Comprobando a la vez el porcentaje de disminución.

Tabla 19: Datos del método DPPH para el aceite esencial.

Aceite <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Paico)		
Concentración (ppm)	Absorbancia determinada	Porcentaje de disminución (%)
10000	0,904	19,21
1000	0,972	13,17
500	1,014	9,38
250	1,017	9,12
100	1,019	8,94
50	1,021	8,75
25	1,033	7,69
12,5	1,037	7,69
5	1,042	6,88
0	1,043	6,79

Absorbancia de solución de trabajo de 1,119

Los datos observados en la tabla 19 método DPPH, nos permite observar que el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* no presentó un valor de disminución superior al 50 % en su mayor concentración (10000 ppm), presentando un porcentaje de 19,21 %.

Se puede decir que las muestras evaluadas no contienen compuestos que atrapen radicales libres.

Se reporta que el aceite esencial del apazote es cancerígeno en ratas a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal (Vizoso Parra et al., 2000)

CONCLUSIONES

- Los valores obtenidos en las propiedades físicas fueron: densidad relativa: 0,9494 g/cm³ ; valor medio de índice de refracción: 1,4828; y actividad óptica: -75,98°
- Mediante composición química se identificaron 22 compuestos, en la columna no polar (DB5-ms) se identificaron 32 compuestos con un porcentaje de identificación de 92,86 % y en la columna polar (HP-Innowax) se pudo identificar 33 compuestos químicos con un porcentaje de 90,30 % de identificación.
- Entre los compuestos del aceite esencial *C. ambrosioides* con mayor porcentaje se pudieron identificar 9, detallados a continuación con su respectivo porcentaje: Limonene (29,73 %), Mentha-2,8-dien-1-ol<trans-p-> (10,86 %), p-Cymene (8,92 %), α-Terpinene (8,83 %), Mentha-1(7),8-dien-2-ol<trans-p-> (6,90 %), Mentha-2,8-dien-2-ol<cis-p-> (4,85 %), Carveol (1,28 %), Piperitol <cis-> (1,20 %).
- Los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial presento una actividad débil frente a *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (0,625 mg/mL) en la tercera, mientras que para las cepas de *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Typhimurium* fue inactivo, frente a las concentraciones evaluadas.
- El aceite esencial obtenido presentó actividad antioxidante solo para el método ABTS⁺ a una concentración de 10000 ppm con un porcentaje de disminución de 81,93% y en la concentración de 1000 ppm presenta un porcentaje de disminución de 21,82%.

RECOMENDACIONES

- Es importante tener en cuenta la abundancia de la materia vegetal en el lugar de recolección para evitar futuros inconvenientes con la recolecta.
- Es necesario retirar impurezas o residuos ajenos a la materia vegetal recolectada antes de procederá destilar, así podremos evitar complicaciones con la determinación química de la especie
- Integrar más microorganismos de estudio de interés en salud humana, para la evaluación antimicrobiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. (2009). *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4th Ed.). U.S.A.: Allured Business Media.
- Agudo, L. (2002). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. *Autodidacta*, 27–34.
- Arias, M. E., Aguirre, M. G., Luque, A. C., & Escola, P. (2014). Caracterización anatómica de tallos de *Chenopodium* (Chenopodiaceae). Aportes al estudio de restos arqueológicos. *Intersecciones en Antropología*, 15(1), 265–276.
- Armijos, C., Lozano, A., bracco, F., Vidari, G., & Malagón, omar. (2012). *Plantas sagradas y psicoactivas usadas por los saraguros en la reiión sur del Ecuador*. Ediloja.
- Balsev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., & Macias, M. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, 1, 1–3.
- Baser, K., Tümen, G., Tabanca, N., & Demirci, F. (2001). Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana* (Lallem.) Velen. *Zeitschrift fur Naturforsch C.*, 56(9–10), 731–8.
- Bernal, C. (2012). Extracción del aceite esencial de la cáscara de naranja: caracterización y estudio de potencial industria en el Ecuador. *Universidad San Francisco Quito*.
- Cantón, R., & Sánchez, M. P. (2005). *Proteus penneri*. *Programa de Control Externo de Calidad SEIMC*, 1–11.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandoni, A. L. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Acta Farmacéutica Bonaerene*, 22, 265–278.
- Cerón, C. (2005). *Manual de Botánica: Sistemática, Etnobotánica y Métodos de estudio en el Ecuador*. Quito: Universitaria.
- Chalchat, J., Maksimovic, Z. A., Petrovic, S. D., & Gorunovic, M. S. (2004). Essential Oil of *Acinos hungaricus* (Simonkai) Silic , Lamiaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 38–39.
- Demirci, B., Can, K. H., Yıldız, B., & Bahçecioglu, Z. (2003). Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp . from Turkey #. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 116–121.
- Echeverri, L., & Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3), 240–249.
- El-Olemy, M. . M., Al-Rehaily, A. J., Albishi, O. A., Mossa, J. S., Demirci, B., & Can Baser, H. (2005). Composition of the Essential Oil of *Helichrysum* Composition of the Essential Oil of *Helichrysum forsskahlii* (Gmel) Hilliard et Burt. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 112–116.
- Fierro K., A. M. (2009). *Efecto sobre Meloidogyne hapla Chitwood, 1949 de extractos acuosos de ruda (Ruta graveolens L.), menta (Mentha x piperita L.) y paico (Chenopodium*

- ambrosioides L.*). Universidad Austral de Chile.
- Gil, M. (2000). Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infecciones*, 17(2), 145–152.
- Gómez, J. (2008). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas , actividad farmacológica , y biogénesis de su principal principio activo , ascaridol . *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 7(1), 3–9.
- Granados, R., & Vilaverde, C. (2003). *Microbiología*. España: Paraninfo S.A.
- Hachicha, S. F., Skanji, T., Barrek, S., Zarrouk, H., & Zeineb, G. (2007). Chemical Composition of *Teucrium alopecurus* Essential Oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 19(5), 413–415.
- Hernández, F. (2002). *Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica*. San José - Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Garcia, D., Nakamura, C., & Prado, B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–1031.
- Hua, C. X., Wang, G. R., & Lei, Y. (2011). Evaluation of essential oil composition and DNA diversity of mint resources from China. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16740–16745.
- Hüsnü, K., Aytac, N., & Duman, H. (2000). Composition of the essential oil of *Micromeria dolichodon* P. H. Davis. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(4), 289–291.
- Hüsnü, K., Demirci, B., Tabanca, N., Ozek, T., & Nezhun, G. (2001). Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC .) Schultz Bip ., *T . balsamita* L ., *T . chiliophyllum* (Fisch . & Mey .) Schultz Bip . var . *chiliophyllum* and *T . haradjani* (Rech . fil .) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 195–200.
- Ibarra, M., & Paredes, E. (2013). Eficacia antibacterina in vitro de MARCO (*Ambrosia arborescens*) Y PAICO (*Chenopodium ambrosioides L.*) EN UNA FORMULA COSMÉTICA. *Universidad Politécnica Salesiana. Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales*.
- Jaramillo C, B. E., Duarte R, E., & Delgado, W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* Colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 54–64.
- Jurado, R., Arenas, C., Doblaz, A., Rivero, A., & Torre, J. (2010). *Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas*. *Medicine* (Vol. 10).
- León Romani, Z. (2009). ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE PAICO (*Chenopodium*

- ambrosioides L.). *Ciencia y Tecnología*, 12, 465–2325.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. (pp. 1129–162).
- López, M. (2012). *Manual de plantas medicinales para guinea Ecuatorial*. Fundación de religiosos para la salud.
- López, M. T. (2004). Los aceites esenciales: Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Offarm*, 23(7), 88–91.
- Mancini, E., Apostolides, N., De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Rigano, D., & Senatore, F. (2009). Chemical Composition and Phytotoxic Effects of Essential Oils of *Salvia hierosolymitana* Boiss. and *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. Growing Wild in Lebanon. *Molecules*, 14, 4725–4736.
- Martinez, R. (2008). *Influencia del riego sobre el rendimiento en cultivo de tres especies del género Thymus. Estudio de la variabilidad intraespecífica (Tesis Doctoral)*. Universidad de Murcia.
- Merino, L. A. (2007). *Pseudomonas aeruginosa: una bacteria con personalidades múltiples. Revista Argentina de Microbiología*, 39(3), 143.
- Meza, K., & Vargas, G. (2013). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA in vitro DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA (Cymbopogon citratus (DC) STAPF), POACEAE EN UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA CON FINALIDAD ANTIACNEÍCA.(Tesis de Pregrado)*. Tesis. Recuperado a partir de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Ministerio del Ambiente de Ecuador. (2012). *Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador continental*. Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos (Tesis Doctoral)*. Unniversidad Autónoma de Barcelona.
- Montoya, S., & Pàez, C. (2012). *Documentación de la técnica de cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales (Tesis de grado)*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Monzote, L. (2010). *Potencial terapéutico del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides y algunos de sus componentes frente a Leishmania (Tesis de grado)*. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=121719, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/121719> (accessed Mar. 23, 2017).
- Olguìn, L., & Rodríguez, H. (2004). *Métodos en Biotecnología: Cromatografía de gases (Tesis de pregrado)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Oliva M. (2011). **ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES: SU APLICACIÓN COMO FITOFÁRMACO.**

- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. (Aiyana, Ed.) (Español).
- Osorio, E. (2014). *Farmacognosia*. Universidad de Antioquia.
- Parra, M., Durango, J., Máttar, S., & De Tema, R. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *MVZ-CÓRDOBA*, 7(2), 187–200.
- Peredo-Luna, H. A., Palou-García, E., & López-Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24–32.
- Pino, J. A., Rodríguez, D. K., Beldarraín, T., & Blandariz, S. R. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Nectandra antillana* Meisn . leaves from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 26(5), 359–362.
- Plazas, E. (2011). Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción. *Jardín Botánico de Bogotá (JJB)*, 26.
- Rodríguez, M., Alcaez, L., & Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz, Baja California sur, Mexico*.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México: Medica Panamericana.
- Rosales, V. (2014). *Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de Sarcorrhachis sydowii Trel. de la provincia de Zamora Chinchipe. (Tesis de Pregrado)*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. E. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*, 26(10), 513–517.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales* (1era Edici). Bucaramanga-Santander: Centro Nacional de Investigaciones para la de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales - CENIVAM.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante IN VITRO de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 27(105), 579–597.
- Sun, J. (2007). D-Limonene : Safety and Clinical Applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3), 259–264.
- Tacchini, M., Caraffini, A., Montamat, M., Spitale, N., Bosio, Y., Minguez, A., ... Servicio de Clínica Médica, M. (2010). Empiema causado por *Salmonella typhimurium*. *Revista Chilena Enfermedades Respiratorias*, 26, 91–94.
- Tolaba, J. (2006). Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta - Ser. FLora.*, 7(18), 49.

- Torrenegra, M. (2014). *Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de oregano (Origanum vulgare), oregano "Borde blanco" (Origanum vulgare ssp) y oreganito (Lippia alba mill) cultivado en la zona norte del departamento (Tesi. Universidad Nacional de Colombia.*
- Torres, A. M., Ricciardi, G., Agrelo de Nassiff, A., & Ricciardi, A. (1997). Aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L., (paico macho). *Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura-UNNE*, (3400), 1–4.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Tovar del Rio, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera (Tesis de Grado)*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Vintage, Lady. (2010, noviembre). Las esencias o aceites esenciales. *Química de los perfumes*. Recuperado a partir de <http://shimmu.blogspot.com/2010/11/las-esencias-o-aceites-esenciales.html>
- Vizoso Parra, Á., García López, A., Ramos Ruiz, A., Piloto Ferrer, J., Pavón González, V., & Penichet, M. (2000). Evaluación mutagénica de un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70 % de *Telexys ambrosioides* L. Weber (apasote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(3), 102–105.
- Young, D. G., Chao, S., Casablanca, H., Bertrand, M., & Minga, D. (2007). Essential Oil of *Bursera graveolens* (Kunth) Triana et Planch from Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 525–526.
- Zambón, S. N., Chamorro, E. R., & Casuscelli, S. C. (2015). Estudio de la pureza óptica de citronelal presente en los aceites esenciales obtenidos de citronela y de eucalipto citriodora. *Informacion Tecnologica*, 26(4), 29–36.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

PRINCIPIO:

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

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gr de la muestra; seguidamente colocarla durante 45 minutos en la lámpara ULTRA X a 37 °C.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 5 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 15 minutos, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante.

CÁLCULO:

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

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

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

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

ANEXO II

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:

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

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

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

ANEXO III

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

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

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°C ± 0.2°C.

- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

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

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

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

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

Dónde:

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

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO IV

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 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

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

APARATOS:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

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

Dónde:
$$n_D^t = n_D^{20} + 0.0004 (t' - t)$$

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

F = factor de corrección (0.0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ± 0.0002

ANEXO V

Determinación de la actividad óptica específica

PRINCIPIO:

Siempre que se trabaje con aceites sólidos o parcialmente sólidos, aceites de alta viscosidad en un rango de temperatura, o aceites de colores fuertes, la determinación transcurre en una solución del aceite.

DEFINICIONES:

Rotación óptica de un aceite esencial: $\alpha'D$

Ángulo expresado en mili radianes y/o grados del ángulo descrito por la polarización plana de una radiación luminosa cuya longitud de onda es $589.3\text{nm} \pm 0.3\text{nm}$, correspondiente a las D líneas de sodio, cuando el trayecto de luz atraviesa 100nm del espesor de un aceite esencial, a ciertas temperaturas. Nota: Cuando la determinación ocurre con diferentes espesores el valor de la rotación óptica deberá ser computado en relación al espesor de 100nm . También la medida acordada por el Faraday magneto – óptico en principio es posible. El espesor de la muestra en este caso es de 10nm .

Rotación de un aceite esencial en solución (rotación específica α).

La rotación óptica de una solución de aceite esencial dividida para la masa de aceite esencial por unidad de volumen

REACTIVOS:

Los reactivos deben ser de grado analítico. Use agua destilada o de equivalente pureza.

SOLVENTE:

(Solo para aceites esenciales que necesiten ensayarse en solución). Se utilizará preferiblemente etanol al 95% en volumen, es necesario considerar la rotación óptica del mismo

APARATOS:

Polarímetro: Con una precisión no menor de $\pm 0.5\text{mrad}$ ($\pm 0.03^\circ$) y ajustado de 0° a 180° con agua.

El polarímetro constará de un plato de cuarzo de rotación óptica conocida, si esto es inaccesible, con una solución acuosa con un contenido de 26g de sacarosa anhidra pura por 100ml de solución. La rotación óptica de esta solución es de $+604\text{ mrad}$ en 200mm de pasta a una temperatura de 20°C . El instrumento deberá ser usado en la oscuridad.

La fuente de luz: Comprende un dispositivo a una longitud de onda de $589.3\text{nm} \pm 0.5\text{nm}$ con una lámpara de vapor de sodio.

Tubos polarimétricos: Usualmente de $100\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos $200\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$, tubos de $50\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ o $10\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$ o menos si es necesario para muestras fuertemente coloreadas. En la determinación se debe trabajar a 20°C o anotar la temperatura específica, utilice un tubo de ensayo de pared gruesa, equipado con un termómetro, asegurar la circulación del agua a la temperatura requerida. Para la determinación de la temperatura

ambiente ver el tipo de tubo de ensayo que se debe utilizar, si bien es aconsejable utilizar los descritos en la parte anterior.

Termómetro: Graduado en 0.2°C o 0.1°C permitiendo la determinación de temperaturas entre 10°C y 30°C

PROCEDIMIENTO:

Es necesario mantener la temperatura de la muestra a 20°C ± 0.2°C o especificar la temperatura, para la muestra que va en el tubo polarimétrico apropiado. Mantener el agua que está circulando con un control termostático, mantener la temperatura especificada durante la determinación. Llenar el tubo con la muestra y asegurarse de la ausencia de burbujas. Coloque el tubo en el polarímetro y lea la dextro rotación (+) o la levo rotación (-) del aceite que en la escala muestra el instrumento.

RESULTADOS:

Cálculos y fórmulas

La rotación óptica expresada en miliradianes o en grados del ángulo está dada por la ecuación.

$$\alpha'D = A/I *$$

A = es el valor del ángulo de rotación en mrad o grados del ángulo.

I = es la longitud del tubo usado en mm.

Marque como (+) la rotación hacia la derecha en el sentido de las manecillas del reloj y como (-), en el sentido contrario a las manecillas del reloj. Cuando por los tubos de pared gruesa la circulación de agua no es correcta, es necesario aplicar factores de corrección apropiados o de acuerdo al aceite ensayado (para aceites esenciales de cítricos y para otros se conocen factores de corrección específicos).

Nota: Los factores de corrección deberán ser dados en las especificaciones para cada aceite.

Rotación óptica de un aceite en solución, “Rotación específica”

La rotación específica expresada en mili radianes o grados del ángulo está dada por la ecuación.

$$[\alpha] = \alpha'D/C$$

Dónde:

$\alpha'D$ = es la rotación óptica del aceite en solución.

C = concentración de la solución del aceite, en gramos de aceite por ml de solución.

Con el valor de la actividad óptica leída en el equipo se aplica la fórmula que se muestra a continuación para obtener la actividad óptica calculada.

$$\alpha = \left(\frac{\alpha l}{l * c} \right) - \alpha s$$

Dónde:

α = Actividad óptica calculada

αl = Actividad óptica leída

l = Dimensión del tubo (dm)=1

αs = Actividad óptica del solvente=0,00 o Z

c = Concentración muestra (gr/ml)