



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

**“Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis latifolia* (Asteraceae) de la Provincia de Loja”**

Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.

AUTOR:

*Marco Rodrigo Rosillo Suárez*

DIRECTOR:

*Ing. Segundo Vladimir Morocho Zaragocin*

LOJA - ECUADOR

2012

## **CESIÓN DE DERECHOS**

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

Loja, Marzo del 2012

f).....

Marco R. Rosillo Suárez

## CERTIFICACIÓN

Ing.

Vladimir Morocho.

**DIRECTOR DE TESIS DE GRADO**

CERTIFICO:

Haber dirigido la investigación y la elaboración de la tesis: “**DETERMINACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Baccharis latifolia* (ASTERACEAE) DE LA PROVINCIA DE LOJA**” la misma que ha sido revisada durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

f).....

Ing. Vladimir Morocho

**DIRECTOR DE TESIS**

## **AUTORÍA**

La presentación, procedimientos y conceptos, así como, los resultados y conclusiones vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta del autor.

f).....

Marco R. Rosillo Suárez

## AGRADECIMIENTO

*A Dios por haberme dado la vida, y que por su gracia infinita he conseguido día a día realizar el presente trabajo, y superar los retos que se me han presentado durante su realización.*

*Al Instituto de Química Aplicada por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta Investigación, y brindarme todos los medios a su disposición para la culminación de la misma, a todo el personal que labora en este Instituto por brindarme su ayuda incondicional, y en especial al Ing. Vladimir Morocho, quien en calidad de Director de Tesis ha sabido guiarme y prestado su ayuda en todo momento.*

*A toda mi familia por su apoyo en todo lo que estuvo a su alcance, y en especial a mi hijo David quien ha sido mi inspiración para culminar con mi carrera y superar todos los inconvenientes que se presentaron.*

*Marco Rodrigo*

# DEDICATORIA

*A mis padres por su esfuerzo y sacrificio diario, porque gracias a ellos y a mi Dios he sabido seguir adelante, y a mi hijo David porque con su existencia ha sabido darme las fuerzas suficientes para superar los obstáculos de mi vida.*

*Marco Rodrigo*

## CONTENIDO

CESIÓN DE DERECHOS.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
ARTÍCULO.....	vii
<b>I PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO</b>	
1.1. Fin del proyecto.....	2
1.2. Propósito del proyecto.....	2
1.3. Componentes del proyecto.....	2
<b>II INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	
2.1. Introducción.....	5
2.2. Antecedentes.....	8
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Recolección y manejo pos cosecha del material vegetal.....	21
3.1.1. Recolección de la materia vegetal.....	21
3.1.2. Tratamiento pos cosecha del materia vegetal.....	22
3.1.3. Extracción del aceite esencial.....	23
3.2 Determinación de las propiedades físicas.....	25
3.2.1. Determinación de la densidad.....	25
3.2.2. Índice de refracción.....	26
3.3. Identificación de componentes químicos.....	28
3.3.1. Cromatografía de Gases (CG).....	28
3.3.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-MS).....	29

3.3.2.1. Preparación de las muestras.....	31
3.3.2.2. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna DB-5MS..	31
3.3.2.3. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna HP-INNOWAX.....	33
3.3.2.4. Obtención de cromatogramas.....	34
3.3.2.5. Determinación de los Índices de Kóvats.....	34
3.3.2.6. Análisis de los Espectros de Masas.....	35
3.3.2.7. Identificación cualitativa de los componentes químicos del aceite esencial con base en los Índices de Kóvats y los Espectros de Masas.....	35
3.3.3 Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de Llama (CG-FID).....	36
3.3.3.1. Corrida Cromatográfica en la columna HP-INNOWAX.....	37
3.3.3.2. Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS.....	39
3.3.4. Comparación de los cromatogramas obtenidos en CG-MS con los obtenidos en CG-FID.....	40
3.3.5. Determinación de los componentes químicos del aceite esencial de <i>Baccharis latifolia</i> .....	40
3.4. Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de <i>Baccharis latifolia</i> .....	40
3.4.1. Microorganismos de prueba.....	40
3.5. Pruebas Antimicrobianas.....	41
3.5.1. Métodos de Microdilución en Caldo.....	41
3.5.1.1. Preparación del aceite.....	41
3.5.1.2. Preparación del cultivo bacteriano (overnight).....	41
3.5.1.3 Preparación de la suspensión de los inóculos.....	42
3.5.1.4. Procedimiento.....	43

#### **IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Determinación de humedad.....	45
4.2. Determinación del rendimiento.....	45
4.3. Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial.....	47
4.3.1. Determinación de la densidad.....	47



4.3.2. Determinación del índice de refracción.....	47
4.4. Compuestos químicos del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	48
4.5. Proporción relativa de los componentes del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	55
4.6. Espectros de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	57
4.7. Pruebas Antimicrobianas.....	61
4.7.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para bacterias.....	61
4.7.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para hongos.....	62
<b>V CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>VI RECOMENDACIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>VII ANEXOS</b> .....	<b>70</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las columnas capilares.....	29
<b>Tabla 2.</b> Medios de cultivo y condiciones de incubación para las bacterias utilizadas.	41
<b>Tabla 3.</b> Medios de cultivo y condiciones de incubación para los hongos utilizados...	42
<b>Tabla 4.</b> Promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $\sigma$ ), y coeficiente de variación (CV) para el porcentaje de humedad (% Humedad).....	45
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento en % (p/v) de las tres destilaciones hechas para cada recolección.....	46
<b>Tabla 6.</b> Promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $\sigma$ ), y coeficiente de variación (CV) para los porcentajes de rendimiento (% R).....	46
<b>Tabla 7.</b> Densidad relativa de la unión de los tres aceites de cada recolección.....	47
<b>Tabla 8.</b> Promedio ( $\bar{x}$ ) del Índice de refracción de las tres aceites obtenidos de cada recolección.....	47
<b>Tabla 9.</b> Composición química del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	49
<b>Tabla 10.</b> Comparación entre los porcentajes de los compuestos identificados en la columna DB-5MS y los detectados en DB-FID.....	56
<b>Tabla 11.</b> Comparación entre los porcentajes de los compuestos identificados en la columna HPINNOWAX-MS y los detectados en HPINNOWAX-FID.....	57
<b>Tabla 12.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos.....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Parámetros desarrollados en la presente investigación.....	3
<b>Figura 2.</b> A) <i>S. aureus</i> , B) <i>E. fecalis</i> .....	15
<b>Figura 3.</b> A) <i>E. coli</i> , B) <i>P. vulgaris</i> C) <i>K. pneumoniae</i> , D) <i>P. aeruginosa</i> , E) <i>S. typhi</i> ..	17
<b>Figura 4.</b> Microfotografía y esquema la producción de conidios de: A) <i>T. rubrum</i> y B) <i>T. mentagrophytes</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema del desarrollo de la investigación.....	20
<b>Figura 6.</b> Zona de estudio de la especie <i>B. latifolia</i> .....	21
<b>Figura 7.</b> Esquema para la identificación de los componentes químicos del aceite esencial.....	30
<b>Figura 8.</b> Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS.....	32
<b>Figura 9.</b> Condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX.....	33
<b>Figura 10.</b> Cromatograma típico del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	34
<b>Figura 11.</b> Detector de Ionización de llama (FID).....	36
<b>Figura 12.</b> Condiciones de operación del CG-FID en la columna HP-INNOWAX.....	38
<b>Figura 13.</b> Condiciones de operación del CG-FID en la columna DB-5MS.....	39
<b>Figura 14.</b> Comparación de los cromatogramas en CG – MS de acuerdo a las tres destilaciones de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131.....	52
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de la especie <i>B. latifolia</i> en la columna DB-5MS-MS de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131.....	54
<b>Figura 16.</b> Compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Espectros de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	60

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b> <i>B. latifolia</i> .....	11
<b>Fotografía 2.</b> Recolección de la especie.....	22
<b>Fotografía 3.</b> Tratamiento post cosecha del material vegetal.....	23
<b>Fotografía 4.</b> Extracción del aceite esencial.....	24
<b>Fotografía 5.</b> Recolección y almacenamiento del aceite esencial.....	25
<b>Fotografía 6.</b> Determinación de la densidad relativa. A) Picnómetro con agua; B) Picnómetro con aceite.....	26
<b>Fotografía 7.</b> Determinación del índice de refracción. A) Muestra del aceite; B) Lectura.....	27
<b>Fotografía 8.</b> Cromatógrafo de Gases.....	28
<b>Fotografía 9.</b> Preparación de la muestras de los aceites para las inyecciones cromatográficas.....	31

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b> DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	70
<b>Anexo II.</b> DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL.....	72
<b>Anexo III.</b> DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20 °C.....	73
<b>Anexo IV.</b> DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN.....	75
<b>Anexo V.</b> CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV).....	76
<b>Anexo VI.</b> CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR ( $\sigma$ ).....	77
<b>Anexo VII.</b> BIBLIOGRAFÍA DE LOS ÍNDICES DE KÓVATS REPORTADOS EN LA LITERATURA.....	78

## RESUMEN

Se determinó la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Baccharis latifolia* recolectada en Calvas-Loja (Ecuador) mediante CG-MS y CG-FID. El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos. Se determinaron un total de 28 compuestos, correspondiendo el 93,53% y al 91,08% en la columna DB5-MS y HP-INNOWAX, respectivamente. Los componentes mayoritarios son: limonene (38.71%); sabinene (10.28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8.81%);  $\beta$ -pinene (6.99%);  $\gamma$ -curcumene (6.43%);  $\alpha$ -pinene (5.44%). La actividad biológica se determinó mediante el método de microdilución en caldo. El aceite esencial de *B. latifolia* inhibió el crecimiento de *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) pero este fue inactivo contra las bacterias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), y las bacterias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



**PHYSICOCHEMICAL DETERMINATION AND EVALUATION OF THE  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Baccharis latifolia*  
Kunth (ASTERACEAE) FROM LOJA, ECUADOR**

Marco Rosillo<sup>1</sup>; Eduardo Valarezo<sup>2</sup>; Luis Cartuche<sup>2</sup>; Vladimir Morocho<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup> Instituto de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja  
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja - Ecuador.

AUTHOR ADDRESS: mrrosillo@utpl.edu.ec; svmorocho@utpl.edu.ec

---

**ABSTRACT**

The chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Baccharis latifolia* (Asteraceae) recollected at Calvas-Loja (Ecuador) was determined by CG/MS and CG/FID. Twenty eight compounds were determined. The main compounds are limonene (38.71%); sabinene (10.28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8.81%);  $\beta$ -pinene (6.99%);  $\gamma$ -curcumene (6.43%);  $\alpha$ -pinene (5.44%). The biological activity was determined by the broth microdilution method. *B. latifolia* oil inhibited the growth of *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) but it was inactive against the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), and Gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

**Key words:** *Baccharis latifolia*, Astereaceae, limonene, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*

**INTRODUCTION**

*Baccharis* has about 400 species inside the Asteraceae family, of which more than 90% are found in Sudamérica [1]. Some of these species report antibacterial [2], antifungal, cytotoxic [3], and anti-inflammatory activity [4].

*B. latifolia* commonly called "Chilca larga" is traditionally used inside from Loja and Zamora Chinchipe, like anti-inflammatory agent for stomach pain, hepatic pain,

fractures, gangrene, rheumatism, liver, and kidney problems [5]. Previous investigations of the essential oil of different species of *Baccharis* have reported a variety of compounds, such as sabinene, limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, (E)-nerodiol,  $\alpha$ -muurolol, isocaryophyllene,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide,  $\beta$ -selinene, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -tuyene, sphaulenol, cubenol, germacrene-D and carvacrol. [6]. There are studies on the chemical



composition of the essential oil of *B. latifolia* in Bolivia and Venezuela [7-8], but not in Ecuador.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The aerial parts of *B. latifolia* in flowering stage were collected in "Las Totoras" of the Province of Loja; with coordinates (660798E, 9530079N, 2048m). The vegetable material was distilled in three different occasions with a 15 days interval. The specie was identified by one of the authors (V.M). A Voucher sample is conserved at UTPL (Universidad Técnica Particular de Loja), with the identification number PPN-007.

### Isolation of essential oil

The essential oil was obtained of 2880 g. from the fresh aerial by hydro-distillation for 3 hours using Clevenger-type apparatus

### Gas chromatography

The analysis of the chemical composition of the essential oils was done using a gas chromatograph (Agilent 6890 Series) coupled to mass spectrometer (Agilent 5973 inert series) equipped with a polar HP-INNOWAX column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu$ m) a nonpolar column DB5-MS (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25  $\mu$ m), and a automatic split/splitless injector (7683 series), provided with a computerized system MSD-Chemstation D.01.00 SP1 and a Flame Ionization detector. The dilution of oil was made using 10  $\mu$ L of the essential oil concentrated, diluted in 990  $\mu$ L dichloromethane and injected under the following parameters: carrier gas Helium

0.9 ml/min; split ratio 50:1; temperature of the injector 210<sup>o</sup>C; temperature of the detector 250<sup>o</sup>C; temperature of the oven 50<sup>o</sup>C-210<sup>o</sup>C with a ramp of 2.5 ml/min

### Identification and Quantification

The essential oil constituents were identified on the basis of their Kovats indices (KI) on both columns. KI were determined with reference to a homologous series of aliphatic hydrocarbons (C<sub>10</sub>-C<sub>25</sub>). Mass spectra were compared with the spectra of the data base Wiley 7n.1 of the team. The quantification of the components was made on the basis of their GC peak areas on the two columns.

### Physical properties

The essential oil density was determined according to the standard ANFOR NF T 75-111, and the refraction index was determined using a refractometer (model ABBE), according to the standard ANFOR NF T 75-112.

### Determination of the biological activity

The oil were tested with Gram-negative bacterium, *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), two Gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), and two fungus *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185). The broth microdilution method was used to determine the biological activity. All tests were performed in Muller Hinton broth, with the exception of the fungus which employed Sabouraud



dextrose broth. The oils were diluted using 20  $\mu\text{L}$  of the essential oil concentrated, diluted in 980  $\mu\text{L}$  Dimetil sulfoxide (DMSO).

For evaluate the biological activity for the bacterium the microorganism were grown overnight at 36°C incubated for 24 hours, of this cultivation were took of 150-300  $\mu\text{L}$  in 7 mL of NaCl solution, adjusting the inoculum to an equivalent concentration to 0.5 in the scale of McFarland, of this suspension we took 140  $\mu\text{L}$  and we inoculated in 6.86 mL broth Muller Hinton adjusting to a bacterial population of  $2 \times 10^6$  CFU/mL; 100  $\mu\text{L}$  of this suspension are used to complete to 200  $\mu\text{L}$  the final volume of the cultivation dish, in this way it adjusts the bacterial population to  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Finally the plates were incubated at 37°C for 18 to 24 h. Antibiotics solutions (1 mg/mL) of ampicillin, gentamicin, and the DMSO as negative control.

MIC values were determined using a final concentration of  $5 \times 10^4$  espores/mL of *Trichophyton Mentagrophytes* (ATCC 28185) and *Trichophyton rubrum*. (ATCC 28188) The MIC was defined as the lowest concentration of substance that prevented growth, which was determined by the appearance of mycelial growth after 96 hours of incubation. Itraconazole was used as positive control (1 mg/mL), and the DMSO as negative control [9-10].

## RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil of *B. latifolia* is a viscous liquid at room temperature and under refrigeration, has a yellowish color and citrus-sweet smell.

Table 1: Humidity, yield and physical properties

C*	Hm (%)	R (%)	d <sup>20</sup>	n <sup>20</sup>
1	62,67	0,25	0,918	1,480
2	62,63	0,23	0,949	1,490
3	61,63	0,22	0,927	1,490

C\* = collections

Hm= relative humidity

R= yield of essential oil

d<sup>20</sup>= relative density of the essential oil

n<sup>20</sup>= index of refraction of the essential oil

The humidity values, yield and physical properties of the essential oil in the three collections, are shown in the table 1.

The results of the qualitative and quantitative analysis of the oil are shown in Table 2 in order of elution from the DB5-MS column.

The essential oil was mainly composed by monoterpenes and sesquiterpenes. A total of 28 compounds were determined, corresponding to the 93,53% and to the 91,08% in the columns DB5-MS and HP-INNOWAX respectively; 10 compounds were determined in both columns. The main compounds are limonene (38.71%); sabinene (10.28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8.81%);  $\beta$ -pinene (6.99%);  $\gamma$ -curcumene (6.43%);  $\alpha$ -pinene (5.44%).





Table 2. Chemical composition of the essential oil of *Baccharis latifolia*

Compound	Retention indices				% Relative amount <sup>b</sup>	
	RI A <sup>a</sup>	RI A <sup>ref</sup>	RI P	RI P <sup>ref</sup>	DB5-MS	HP-INNOWAX
α-thujene	937	931 <sup>d</sup>	-	-	0,31	-
α-pinene	942	939 <sup>d</sup>	1015	1034 <sup>f</sup>	<b>5,44</b>	6,28
sabinene	974	976 <sup>e</sup>	1154	1123 <sup>g</sup>	<b>10,28</b>	19,48
β-pinene	977	990 <sup>e</sup>	1018	1008 <sup>g</sup>	<b>6,99</b>	8,44
myrcene	988	994 <sup>e</sup>	1115	1161 <sup>g</sup>	1,44	2,04
lmonene	1026	1039 <sup>f</sup>	1146	1178 <sup>n</sup>	<b>38,71</b>	25,42
trans- β-ocymene	1043	1050 <sup>e</sup>	-	-	0,28	-
aromadendrene	1468	1458 <sup>g</sup>	1462	1458 <sup>g</sup>	0,70	1,13
Y-terpinene	1054	1059 <sup>f</sup>	-	-	0,27	-
α-terpinolene	1080	1088 <sup>e</sup>	-	-	0,23	-
terpinen-4-ol	1176	1177 <sup>e</sup>	1260	1272 <sup>p</sup>	0,32	0,62
β-elemene	1382	1391 <sup>h</sup>	-	-	0,54	-
β -caryophyllene	1409	1419 <sup>e</sup>	1591	1594 <sup>g</sup>	1,64	2,91
α-curcumene	1474	1483 <sup>e</sup>	-	-	0,81	-
Y-curcumene	1471	1480 <sup>i</sup>	-	-	<b>6,43</b>	-
bicyclogermacrene	1485	1517 <sup>j</sup>	-	-	0,41	-
β-bisabolene	1501	1509 <sup>e</sup>	1726	1714 <sup>g</sup>	0,27	1,21
β - dihydroagarofuran	1525	1504 <sup>k</sup>	-	-	<b>8,81</b>	-
δ-cadinene	1509	1524 <sup>e</sup>	1764	1749 <sup>g</sup>	0,61	6,75
α-bisabolol	1680	1701 <sup>l</sup>	-	-	0,45	-
chromolaenin	1721	1728 <sup>m</sup>	-	-	0,79	-
NI	1654	-	2019	-	5,36	4,16
azulen-2-ol,1,4-dimetil-	1760	1767 <sup>n</sup>	-	-	2,44	-
germacrene D	-	-	1673	1705 <sup>g</sup>	-	0,66
caryophyllene oxide	-	-	2080	2068 <sup>g</sup>	-	0,67
NI	-	-	1793	-	-	5,46
NI	-	-	2080	-	-	5,27
p-cymene	-	-	1174	1214 <sup>q</sup>	-	0,58
			<b>Total*</b>		93,53	91,08

RI A, RI P, retention indices in the polar column (DB5-MS) and in the polar column (HP-INNOWAX) respectively

a= compounds ordered according to the elution order in the column DB5-MS

b= average percentage calculated based on the % of area of the peaks reported in the column DB5-MS and HP-INNOWAX

RI Ref., references: <sup>d</sup>ref, <sup>e</sup>ref, <sup>f</sup>ref, <sup>g</sup>ref, <sup>h</sup>ref, <sup>i</sup>ref, <sup>j</sup>ref, <sup>k</sup>ref, <sup>l</sup>ref, <sup>m</sup>ref, <sup>n</sup>ref, <sup>p</sup>ref, <sup>q</sup>ref.

\*= Sum of compounds identified in both columns

NI: not identified



Chemical components of the essential oil of *B. latifolia* reported in previous investigations differ about the percentage with the reported in this study. In some studies report to the  $\gamma$ -curcumene (12.2%) [7] or to the germacrone (41,3%) [8] as majority components in comparison with the obtained results in present investigation in which, the majority compound is the limonene (38.71%). The variability can be attributed to the different physical or phenology stage in which the plant is distilled, to the harvest period of and to the vegetative cycle. Other factors that affect directly the chemical composition are the altitude of the plant or to different environmental conditions of the habitat as supply of water, light or temperature [11-12] besides can be consider that it be different isotypes.

**Table 3. Minimal inhibitory concentration (MIC) for the evaluated fungi**

Minimal Inhibitory concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Oils	Tm	Tr
BL 111	125	31,25
BL 112	125	31,25
BL 113	62,5	31,25
BL 121	125	31,25
BL 122	125	31,25
BL 123	125	31,25
BL 131	62,5	31,25
L 133	125	31,25
Itraconazole; positive controls		100% inhibition (7,81 $\mu\text{g/mL}$ )

Tm: *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185)

Tr: *T. rubrum* (ATCC 28188)

MIC values Gram-positive bacterium and Gram-negative bacterium is of 1000  $\mu\text{g/ml}$ . The obtained results of the antifungal CMI are shown on the table 3. The CMI for oils BL 113 and BL 131, for the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) is of 62.5  $\mu\text{g/ml}$ ; unlike the rest oils that inhibit the growth of the same microorganism to a concentration of 125  $\mu\text{g/ml}$ . The CMI for *T. rubrum* (ATCC 28188) is of 31.25  $\mu\text{g/ml}$  in all the oils. According to Holetz classification [13] the concentration that oil inhibits the growth to is good. It has reported antifungal activity of essential oil of *B. latifolia* against *A. fumigatus* (ATCC 204305) (157.4  $\mu\text{g/ml}$ ) [3] but has not been possible to find investigations with the strains evaluated in this study, and these are responsible for various superficial mycoses worldwide [14].

## CONCLUSIONS

A total of 28 compounds were indentified, 10 of them were identified in both columns, the majority component is the limonene (38.71%); the oil did not show activity with the bacterium evaluated, but it showed activity with the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) and *T. rubrum* (ATCC 28188), this finding is important given that these fungi are responsible for various superficial mycoses therefore a possible application of this oil could be this level.

## ACKNOWLEDGEMENT

To the Instituto de Química Aplicada of the Universidad Técnica Particular de Loja for funding this research, all staff working in this Institute.



## REFERENCES

1. Giuliano D. A. (2001) Clasificación infragenérica de las especies de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, Vol: 39 (1-2): 131-154.
2. Abad M. J, Bermejo P. (2007) *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, (VII): 76-96
3. Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur L, Mesa A (2010), Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family, *Revista Iberoamericana Micología*, Vol: 27(2): 101-103.
4. Abad M, Bessa A, Ballarin B, Aragón O, González E, Bermejo P, (2006) Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae), *Journal of Ethnopharmacology*, Vol: 103: 338-344
5. Tene, et al (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador, *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 63–81
6. Malizia R, Cardell D, Molli J, González S, Guerra P, Grau, R. (2005) Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part I: *B. racemosa* (Ruiz et Pav.) DC and *B. linearis* (Ruiz et Pav.) Pers. Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research* Vol: 17: 103-106
7. Loayza I, Abujder D, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Jean F. (1995) Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, Vol: 38: 381-389.
8. Rojas J, Velasco J, Rojas L, Díaz T, Carmona J, Morales A (2007), Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H. B. &K. (Asteraceae), *Natural Product Communications* Vol: 2 (12) 200.
9. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2002) *Methods M 27-A2*, Vol. 22 (15): 1-29 and *M 38-A*, Vol. 22 (16): 1-27. Wayne Ed.
10. Rex, J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., Chaturvedi, V., Espinel-ingroff, A. N. A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., et al. (2001). Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clinical Microbiological Reviews*, Vol: 14(4), 643-658. doi:10.1128/CMR.14.4.643.
11. A Burbott, Loomis D (1967). Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiol.*, Vol:42, 20-28
12. H El-Seedi, A Khattab, A Gaara, N Hassan, El-Kattan A (2005); Essential oil analysis of *Micromeria nubigena* H.B.K. and antimicrobial activity. *J Essent Oil* Vol: 20: 452-456
13. Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol: 97: 1027–1031.



**UTPL**  
**UNIVERSIDAD TÉCNICA**  
**PARTICULAR DE LOJA**

---

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

---

- 14.** Santos P, Córdova S, Roberto L, Carrillo A, Lopardo H (2010), Tineacapitis. Experiencia de 2 años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina, Rev. Iberoam Micol. Vol: 27(2): 104-105

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



## I. FIN, PROPÓSITO, Y COMPONENTES DEL PROYECTO

### 1.1 Fin del Proyecto

La presente investigación aportará al estudio del aceite esencial de *Baccharis latifolia*, de esta manera se contribuye al estudio de la flora aromática de la Zona Sur del Ecuador.

### 1.2 Propósito del Proyecto

Determinar las propiedades fisicoquímicas y evaluar la actividad biológica del aceite esencial de *B. latifolia* de la Provincia de Loja.

### 1.3 Componentes del Proyecto

1. Obtener el aceite esencial de *B. latifolia*
2. Determinar los porcentajes de humedad y de rendimiento de la especie en estudio.
3. Determinar las propiedades físicas del aceite esencial: densidad e índice de refracción.
4. Identificar la composición química mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS) y acoplada al Detector de Ionización de Llama (CG-FID).
5. Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica usando métodos de microdilución.

### 1.4 Hipótesis del proyecto

#### 1.4.1 Actividad biológica

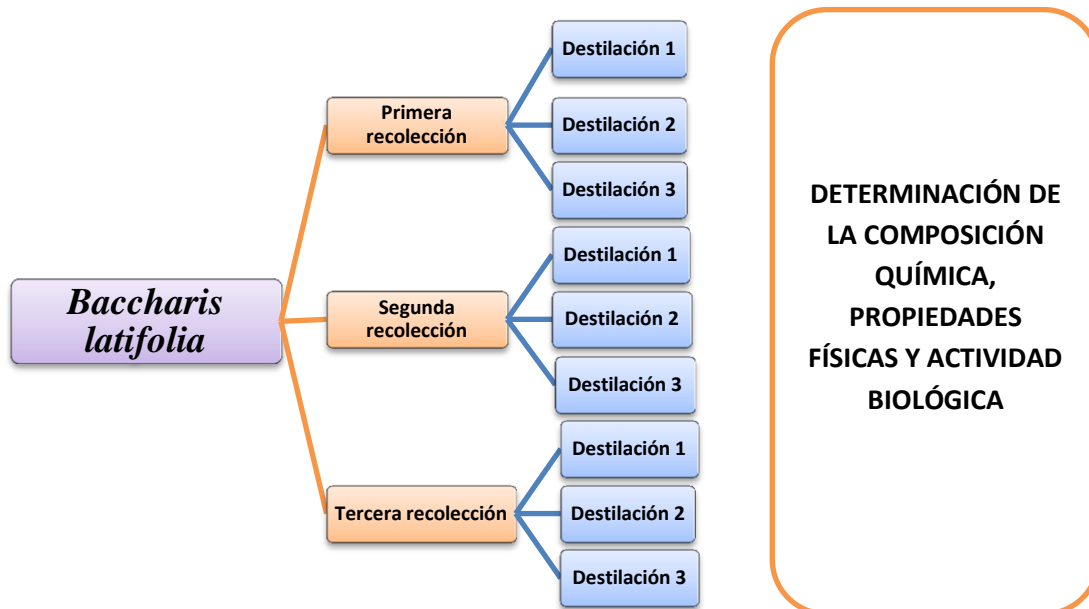
**H<sub>1</sub>**: Los aceites esenciales presentan actividad antibacteriana y antifúngica.

**H<sub>0</sub>**: Los aceites no presentan actividad antibacteriana y antifúngica



## 1.5 Diseño Estadístico

Debido a que el objetivo central del proyecto es contribuir al conocimiento y comparación de los datos, se realizó un diseño estadístico de las tres destilaciones de cada recolección de la especie, así para los datos de humedad, de rendimiento y cromatografía se calculó la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, los mismos cálculos se realizaron para los datos obtenidos de las propiedades físicas.



**Figura 1.** Parámetros desarrollados en la presente investigación  
**Elaboración:** El Autor

## ***II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES***





## II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

### 2.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen un recurso invaluable por su potencialidad farmacológica que hace necesario estudiarlas ante la demanda de nuevos fármacos.<sup>1</sup> Actualmente la medicina tradicional está siendo en muchos aspectos complementada por la medicina natural existiendo una gran demanda de este tipo de plantas, de los aceites esenciales y de otros productos procedentes de las mismas.<sup>2</sup> En el Ecuador existen alrededor de 3118 especies pertenecientes a 206 familias usadas con fines medicinales y se sabe que el 75% de ellas son plantas nativas. La familia Asteraceae es una de las cinco familias que presenta un mayor número de especies usadas en el Ecuador con fines medicinales.<sup>3</sup> Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o Etnomedicina.<sup>4</sup>

Se define a un aceite esencial o esencia como una mezcla de sustancias orgánicas volátiles, pertenecientes a diferentes clases de compuestos, como: hidrocarburos, ésteres, aldehídos, alcoholes, fenoles y sus derivados, lactonas; todos son productos de largas cadenas, los llamados metabolitos secundarios de las plantas como resultado del metabolismo vegetal. Los compuestos de un aceite esencial no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta, sino que forman parte de su metabolismo secundario.<sup>5-6</sup>

<sup>1</sup>Soejarto D, Gyllenhaal Ch (1997). Información etnomédica en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico. Libro de Resúmenes VI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina. Guatemala: Sociedad Italo-latinoamericana de Etnomedicina.

<sup>2</sup>Schroeder, M.A., López A.E. y Martínez G.C. (2004). "Resultados Preliminares del Análisis Foliar de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Pluchea Sagittalis* (Lamb) cab., *Petiveria alliace* L. y *Ocimum Selloi* Benth". En Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, A-035.

<sup>3</sup>De la Torre, L; Navarrete, H; Muriel, P; Macía, M; Balsle, H (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus, p.p. 105–114.

<sup>4</sup>Albado E, Saez G, Ataucusi G, (2001), Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano); *Rev Med Hered* 12 (1).

<sup>5</sup>Minami, K. (1999). "Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal-II: manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas". Universidad de São Paulo, Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Producción Vegetal.

<sup>6</sup>Bandoni, A (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias, p.p. 29-43, 94- 96, 149-171, 197-232.



La composición química de una esencia puede variar en la época de recolección, el lugar geográfico, o pequeños cambios genéticos. Aparentemente estas sustancias no parecen tener una función directa sobre el crecimiento y desarrollo de la planta pero se sabe que si ejercen la función de autodefensa, atracción de polinizadores, y regulan los procesos de evaporación de agua.<sup>7</sup>

Todos los órganos de una planta pueden contener esencia, tales como hojas, tallos, flores y frutos, así como también en diferentes órganos celulares. Es así como los aceites de menta y lavanda se localizan en pelos glandulares, mientras que el aceite de la pimienta se ubica en las células modificadas del parénquima. De igual forma, el aceite de rosa y jazmín se encuentra en las flores; el aceite de menta y eucalipto en las hojas; el alcanfor en los leños; el de los cítricos en los frutos; etc.<sup>8</sup>

Los aceites esenciales poseen algunas propiedades fisicoquímicas muy destacables entre ellas están: la volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de agentes oxidantes y reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición. Otra propiedad de los constituyentes de una esencia son sus variabilidades estructurales, lo que permite generar por semisíntesis estructuras novedosas. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética. También se destaca la propiedad de refractar la luz polarizada, que es aprovechada para su control de pureza, ya que cada aceite presenta un índice de refracción característico. También los aceites esenciales presentan un poder rotatorio particular, debido a que algunos de sus compuestos

---

<sup>7</sup>Taiz, L, Zeiger, E. Plant Physiology. 3ª Ed. Sinauer Associates Inc, Publisers: Massachusetts 2002, pp.: 171-192, 285-291.

<sup>8</sup>Dudareva N; Pichersky E; Biology of Floral Scent. Taylor & Francis Group: New York: 2006, pp.: 55-71



químicos son ópticamente activos. En cuanto a la densidad, se caracterizan por ser menos densos que el agua, excepto algunas esencias, como la de clavo.<sup>9</sup>

Los aceites esenciales se utilizan en la industria farmacéutica para la obtención de diversos principios activos (anetol, eugenol) o como excipientes y aromatizantes en la preparación de jarabes, suspensiones, elixires y otras formas farmacéuticas. Así mismo, en la industria de la alimentación, licorería y confitería se suelen utilizar como aromatizantes. En perfumería y cosmética los aceites esenciales son utilizados ampliamente. El empleo en perfumería es muy importante debido, evidentemente, a las cualidades olfativas de los aceites esenciales. Ello implica que sean incorporados en un sin número de composiciones: desde perfumes para aguas de colonia hasta fragancias para detergentes de ropa. En cuanto a su empleo en cosmética es, así mismo, importante y se basa en las funciones específicas que algunas esencias presentan sobre la piel, además del uso como aromatizante en diferentes preparaciones cosméticas. En relación directa con los aceites esenciales ha surgido la denominada aromaterapia, que es una disciplina dentro de la medicina natural que emplea básicamente aceites esenciales en sus tratamientos.<sup>10</sup>

Es conocida la actividad antibacteriana, antifúngica, antiséptica, antioxidante y como relajante del sistema nervioso central de algunos aceites esenciales, de ahí las posibles aplicaciones industriales de estas sustancias.<sup>11</sup>

Muchos compuestos presentes en aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas, tales como: fenoles, flavonoides y otros polifenoles actúan contra reconocidas bacterias patógenas. Los estudios farmacológicos de los aceites esenciales están basados en las propiedades antioxidantes, antiinflamatoria,

<sup>9</sup>Chemat F, Lucchesi M; Faureto L; Colnaghi G; Visioni F (2006). Microwave-accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally approach. *Appl. Catal., A*, Vol: 555, pp.:157-160.

<sup>10</sup>López L (2004), Los aceites esenciales, Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimenticias, Vol: 23, Num: 7, pp.: 88-89.

<sup>11</sup>Acevedo, A; Castañeda, M; Blanco, K; Cárdenas, C; Reyes, J; Kouznetsov, V; Stashenko, E (2007). "Composición y Actividad Antioxidante de Especies



antifúngica y antimicrobiana, a través de pruebas específicas como las pruebas de actividad biológica.<sup>12</sup>

A las especies que contienen flavonoides se les atribuye varias propiedades farmacológicas, y el uso medicinal extendido de la familia Asteraceae, muy probablemente se encuentre vinculado a la presencia y actividad biológica de estos compuestos y otros compuestos fenólicos, que normalmente suelen poseer. Los estudios farmacológicos realizados sobre parte de los componentes químicos, o bien sobre los exudados completos, de algunas plantas de la familia Asteraceae han demostrado principalmente, actividad anti-inflamatoria, antioxidante, anti-microbiana y anti-fúngica, además de las digestivas, hepáticas y renales más conocidas.<sup>13</sup>

## 2.2. ANTECEDENTES

Desde la antigüedad hasta hoy en día se viene haciendo uso de la medicina tradicional con la finalidad de suplir las necesidades médicas y de salud con una cifra no menor al 80% según la OMS a nivel mundial. Este hecho es muy claro sobre todo en países en vía de desarrollo, y Ecuador no es una excepción.<sup>14</sup>

El Ecuador cuenta con centenares de plantas medicinales, aquellas que nuestros pueblos aborígenes utilizan con fines médicos. Durante siglos estas plantas han sido empleadas en forma empírica y en la actualidad han llamado la atención de los investigadores a fin de descubrir los posibles principios activos que justifiquen los usos terapéuticos. Si bien la flora del Ecuador ha sido estudiada desde hace tiempo, la investigación fitoquímica es más bien escasa. Ecuador hoy en día es uno de los países con una amplia biodiversidad,

---

<sup>12</sup>Baratta M (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential oils research*; Vol.: 16: 618-627.

<sup>13</sup>Abad, M; Bermejo P (2008); *Baccharis* (Compositae).A review update, *Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense*.

<sup>14</sup>Chaudhury R, ( 1992). *Herbal Medicine for Human Health*. World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, pp.: 87



existiendo aún grupos indígenas que aún mantienen sus prácticas ancestrales.<sup>15</sup>

La región sur del Ecuador dentro de la cual se encuentra ubicada la provincia de Loja posee una gran variedad de plantas aromáticas, y muchas de ellas pertenecen a la familia Asteraceae, que es una de las familias que presenta un mayor número de especies usadas en el Ecuador con fines medicinales.<sup>3</sup>

Las plantas de la familia Asteraceae llaman la atención de los investigadores no sólo por su gran diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por sus variables usos medicinales; es así que muchas de estas especies han sido utilizadas para el tratamiento de algunas dolencias como la reducción de la flema, el alivio de la tos, energizante, circulación de la sangre, parar el dolor, la inducción de la diuresis, como antihelmíntico, antiinflamatorio, agentes estomacales.<sup>16</sup>

*B. latifolia* se utiliza en forma de decocciones de hojas y forma parte de la medicina tradicional de América del Sur para el tratamiento del reumatismo, enfermedades del hígado, heridas y úlceras. Esta especie presenta un amplio uso medicinal dentro de las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. A la especie en estudio se la conoce con el nombre local de chilca larga.<sup>17-18</sup>

Dentro de las diversas líneas de investigación del IQA (Instituto de Química Aplicada), de la Universidad Técnica Particular de Loja, se encuentra desarrollando algunos estudios en aceites esenciales dentro del proyecto: “Evaluación de la flora aromática del Sur del Ecuador”. Con la finalidad de contribuir a tales estudios se ha venido desarrollando la presente investigación:

---

<sup>15</sup> Naranjo, P., Escaleras, R., (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Corporación Editora Nacional, Quito, pp.: 192

<sup>3</sup> De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balsle H (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus, pp.: 105-114.

<sup>16</sup> Martínez M, Bessa A, Bermejo P, 2007, Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol.: 30; pp.: 703

<sup>17</sup> Cavender A, Albánz M (2009). The use of magical plants by curanderos in the Ecuador highlands. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Ciencias de la Salud, Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador.

<sup>18</sup> Tene, et al (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador, *Journal of Ethnopharmacology* pp.: 63-81



“Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis latifolia* (Asteraceae) de la provincia de Loja”.

Muchos estudios en el mundo se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus o parásitos, en alimentos, en aguas residuales, o también para ser utilizados como medicamentos.<sup>19-20</sup>

En esta investigación se realizó un estudio fisicoquímico del aceite extraído de la especie; también se llegó a evaluar la actividad biológica de este producto frente a cepas bacterianas y fúngicas usando el método de microdilución en placa. Con en el desarrollo de este estudio se pretende contribuir al fortalecimiento de la Industria de los aceites esenciales en Ecuador y abrir las puertas para los diferentes usos industriales que se le puede dar al aceite.

---

<sup>19</sup>Delaquis P; Stanich K; Girard B; Mazza E (2002). G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology Vol.: 74: pp.: 101-109.

<sup>20</sup>Benkeblia N (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) Lebensm.-Wiss. U.-Technol. Vol.: 37: pp.: 263-268



## ***Baccharis latifolia***



Fotografía 1. *Baccharis latifolia*  
Fuente: Herbario "PPN-UTPL"

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Sub clase:** Asteridae

**Orden:** Asterales

**Familia:** Asteraceae

**Género:** *Baccharis*

**Especie:** *Baccharis latifolia*



### **Sinónimos**

Molina latifolia Ruiz & Pav., *Baccharis floribunda* Kunth, *Baccharis polyantha* Kunth, *Baccharis riparia* Kunth, *Baccharis polyantha* fo. Genuina Hieron., *Baccharis polyanthavar.* Macrophylla Hieron., *Vernonia tavalensis* Gilli.

### **Altitud**

1000- 4000 m

### **Distribución**

Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Sucumbíos Tungurahua.

### **Descripción botánica**

Arbusto leñoso que alcanza 3 m de alto, hojas alternas láminas lanceoladas de 9-12 cm x 2-3.5 cm. Inflorescencia cimosa en capítulos. Fruto aquenio con abundante papus apical de color crema.<sup>21</sup>

### **Usos terapéuticos**

Esta especie es utilizada en forma de infusiones en la medicina tradicional de América del Sur para el tratamiento de reumatismo, dolores hepáticos, heridas y úlceras.<sup>18</sup>

---

<sup>21</sup>Jorgensen P, León S, Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador, 1999, St. Louis, Missouri, pg: 269

<sup>18</sup>Tene, et al (2007).An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador, Journal of Ethnopharmacology p.p. 63–81





## **Enfermedades Infecciosas**

La enfermedad infecciosa es un estado patológico, que surge como consecuencia de una agresión de patógenos al organismo humano y la respuesta inmune del mismo fundamentalmente relacionada con las características genéticas, propias del sujeto y del agente.

Las enfermedades infecciosas están determinadas por agresiones de microorganismos, que se multiplican en el sujeto y mecanismos inmunológicos que tratan de controlarlos. El organismo que es agredido reconoce y organiza su respuesta, actuando con todos sus mecanismos, para eliminar las noxas. Los agentes patógenos pueden ser reunidos, por sus características comunes y/o especiales en grupos y los mismos interactúan con el sujeto de diversas maneras.

Las bacterias, son células con vida independiente y con capacidad de reproducirse, que se caracterizan por presentar en su estructura los dos ácidos nucleicos. Poseen enzimas y proteínas complejas, estructuras especializadas así como una membrana celular que los separa del mundo circundante. Provocan cuando infectan al hombre lesiones localizadas o generalizadas de tipo inflamatorio acompañadas de destrucción parenquimatosa.

Los hongos son seres unicelulares levaduras o pluricelulares, cuyos tejidos se agrupan en filamentos, formados por conjuntos de hifas llamados micelios. Tienen paredes celulares rígidas y absorben los nutrientes del hospedador, transmiten su material genético en reproducción sexual o asexual y pueden dividirse en compartimentos especiales.

Tienen gran capacidad de adaptarse a los cambios, como saprófitos colonizan al hombre o actúan como patógenos oportunistas. En los inmunocompetentes las lesiones se autolimitan. El uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y corticoides los favorece<sup>22</sup>

---

<sup>22</sup>Antoni S, Raimondo O (2005). Clínica de enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina de la UNT, Tucumán Argentina.



La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos.<sup>23</sup>

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos. También en los últimos años se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos. La creciente demanda de alternativa a los antibióticos, junto a la aparición de algunas enfermedades ligadas a infecciones bacterianas, ha puesto de relieve el potencial de los extractos vegetales y en especial de algunos de sus aceites esenciales como agentes antibióticos.<sup>24</sup>

### **Bacterias Gram Positivas**

***Staphylococcus aureus*** es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. *S. aureus* forma parte de la familia Micrococcaceae, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. Es un coco gram-positivo, no móvil. *S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes.<sup>25</sup>

<sup>23</sup> Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A(2007), La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, Colombia Medica; Vol.: 38: 149-158

<sup>24</sup> Zekaria D (2007). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos, Laboratorios Calier.

<sup>25</sup> Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad, Revista Biomédica, Vol.: 17: 287-305



La mayoría de las especies de **Enterococcus** son miembros importantes de la flora normal del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino, **Enterococcus faecalis**, puede ser un patógeno oportunista y causar vaginosis bacteriana. En los últimos años se ha desarrollado un interés creciente por el género *Enterococcus*, debido a la mayor incidencia de infecciones hospitalarias graves que provoca, así como la resistencia a diversos agentes microbianos.<sup>26</sup>

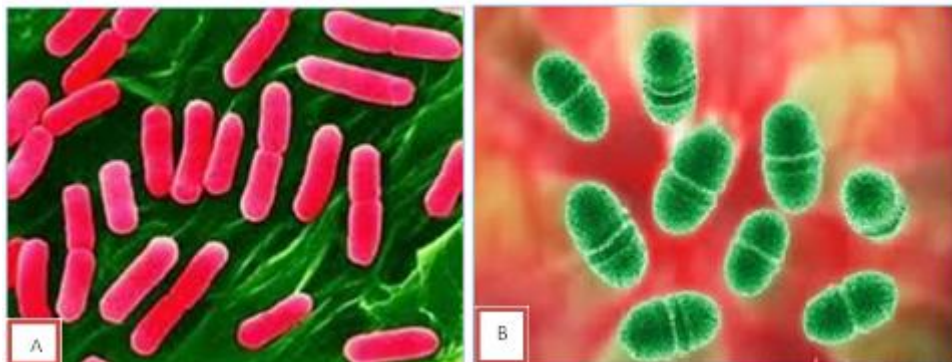


Figura 2. A) *S. aureus*, B) *E. faecalis*  
Fuente: Tortora, 2007

## Bacterias Gram Negativas

**Escherichia coli** es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.<sup>27</sup>

El género **Proteus** pertenece a la tribu Proteaeus de la familia Enterobacteriaceae. **P. vulgaris** es una especie perteneciente a este género y que junto a **P. penneri** han sido reconocidos como agentes etiológicos de distintos procesos infecciosos, tales como infección urinaria, infección quirúrgica, neumonías, bacteriemias, septicemias e infecciones óticas. Así

<sup>26</sup>Guevara J, Cásares A, Valencia E. (2000). Significado clínico de la presencia de *Enterococcus* en secreción vaginal, Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos, Vol.: 2000, N° 3: 223-226

<sup>27</sup>Rodriguez G, Angeles M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, Revista de Salud pública de México, Vol.: 44, N°5.



mismo, varios estudios mostraron la creciente implicancia del género en infecciones nosocomiales. *P. vulgaris* presenta resistencia a ampicilina y cefalotina.<sup>28</sup>

***Klebsiella pneumoniae*** es un microorganismo patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. Usualmente las manos contaminadas del personal son el vehículo responsable de brotes epidémicos. Esta bacteria es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias.<sup>29</sup>

***Pseudomona aeruginosa*** es un microorganismo causante de diferentes tipos de infecciones nosocomiales y constituye un serio problema en las instituciones de salud, causando cuadros muy graves que incluyen bacteriemia, endocarditis, neumonía, meningitis, infecciones del tracto genitourinario y otras. Esta bacteria presenta una resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos: algunos  $\beta$  lactámicos, aminoglucósidos, y más recientemente a algunas quinolonas como la cilostina.<sup>30</sup>

El género ***Salmonella*** está constituido por bacilos cortos gram-negativos no esporoformadores, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia Enterobacteriaceae. Las bacterias pertenecientes a este género son causantes de un amplio número de manifestaciones clínicas en los seres humanos como son fiebres entéricas, gastroenteritis, bacteriemia, infecciones localizadas, y estado de portador crónico.<sup>31</sup>

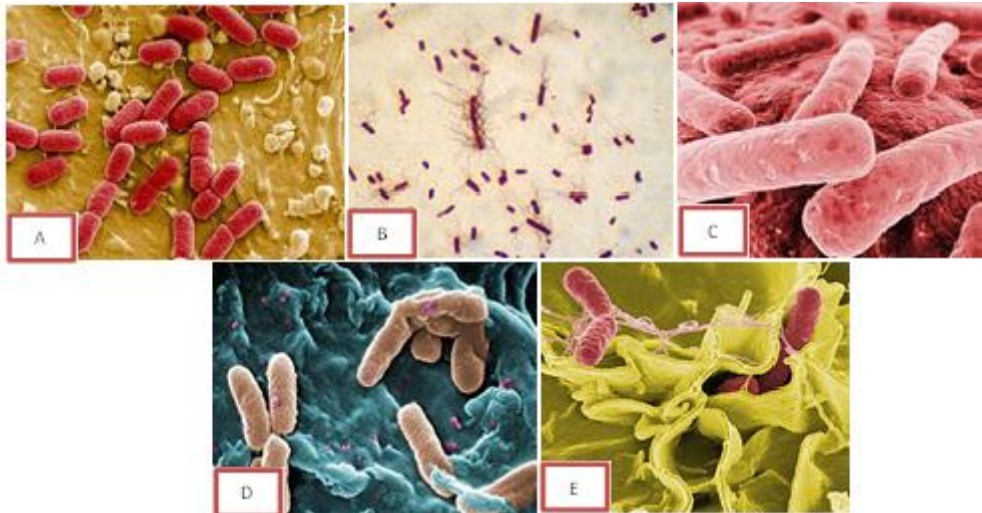
---

<sup>28</sup> Castro S, et al (2006). Comparación de diferentes métodos para identificar las especies del género *Proteus*, Revista Argentina de Microbiología. Vol.:38: 119-124

<sup>29</sup> Andrade V, Silva J (2004). Caracterización de *Klebsiella Pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-en una unidad de cuidados intensivos, Revista de Salud Pública México, Vol.: 46, N. 6

<sup>30</sup> Battle María, et al (2005). Meningitis bacteriana y *Pseudomonas aeruginosa*: a propósito de un caso, Revista Cuvana Médica; Vol.: 57: 3

<sup>31</sup> Uribe C, Suárez M. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar, Colombia Médica; Vol.: 37: 151-158



**Figura 3.** A) *E. coli*, B) *P. vulgaris*, C) *K. pneumoniae*, D) *P. aeruginosa*, E) *S. typhi*  
**Fuente:** Tortora, 2007

### **Dermatofitosis**

Las dermatofitosis son micosis superficiales causadas por hongos que tienen la capacidad de invadir tejido queratinizado como la piel, el pelo y las uñas del hombre y algunos animales. Las dermatofitosis son las micosis más comunes a nivel mundial. Las dermatofitosis son también llamadas “tiñas”, y según la topografía se clasifican en tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña de la mano, tiña de los pies, tiña de la ingle, tiña del área del pañal y tiña de las uñas.

Las dermatofitosis por *Trichophyllum rubrum* se consideran las micosis superficiales más frecuentes en el mundo occidental. *T. rubrum* es un dermatofito antropófilo que ha sido frecuentemente encontrado en infecciones de pie, ingle y uñas principalmente.

Se han descrito dos cepas diferentes de *T. rubrum*. La cepa granular se caracteriza por colonias planas que carecen de micelio aéreo, y semejan polvo de azúcar. La cepa aterciopelada es la más común, con micelio aéreo algodonoso, blanco o beige, como “colas de conejo”. El reverso de la colonia suele tener un color rosado-rojo, pero en ocasiones puede ser amarillo-marrón, rojo-vino o violeta e, incluso, pueden carecer de pigmento.

*Trichophyllum mentagrophytes* es otro de los agentes causales de dermatofitosis más frecuente. Se caracteriza por presentar un crecimiento



relativamente rápido. Presentan dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. Las variantes algodonosas son inicialmente blancas, pero pueden tornarse de color crema o acre con la madurez. Las variantes granulares producen colonias planas que se diseminan con una superficie granular gruesa. Al comienzo las colonias son blancas o amarillo intensas, pero después se tornan de color acre o castaño.<sup>32-33</sup>



**Figura 4.** Microfotografía y esquema la producción de conidios de: A) *T. rubrum* y B) *T. mentagrophytes*  
**Fuente:** Koneman, 2008

<sup>32</sup>Hernández A, Carbajal P, Fernández R, Arenas R (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México, Rev. Iberoamericana de Micología, Vol: 24: 122-123

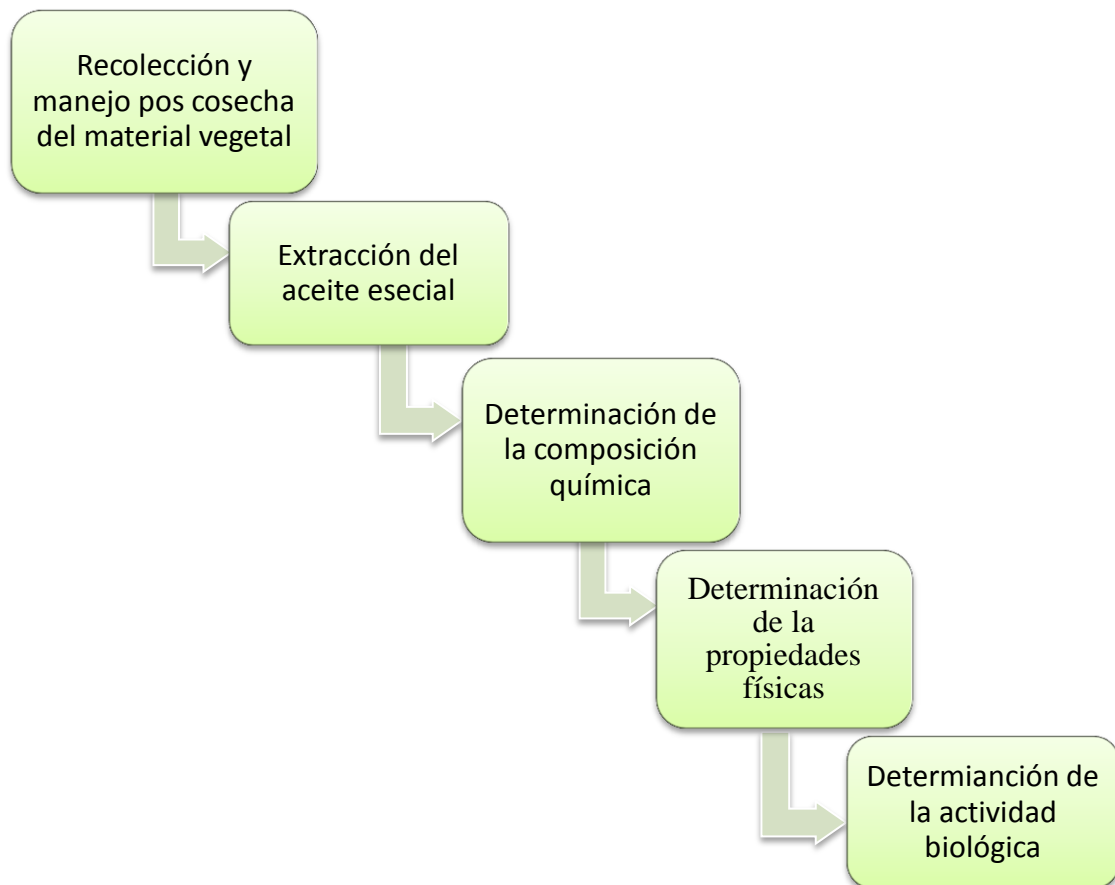
<sup>33</sup>Winn, Allen. Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods, Diagnóstico Microbiológico, Sexta edición, Editorial Médica Panamericana, 2008, pp.: 1140-141.

### ***III. MATERIALES Y MÉTODOS***



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente Investigación se desarrolló bajo el siguiente esquema:



**Figura 5.** Esquema del desarrollo de la Investigación.  
**Elaboración:** El autor.





### 3.1. Recolección y manejo pos cosecha del material vegetal

#### 3.1.1. Recolección de la materia vegetal

Se llevó a cabo la recolección del material fresco de la partes aéreas de *B. latifolia* en el sector de “Las Totoras” barrio perteneciente al Cantón Calvas de la Provincia de Loja. Para la identificación taxonómica de la especie se tomó como referencia el Herbario de la U.T.P.L. La planta fue identificada por el Ing. Vladimir Morocho.

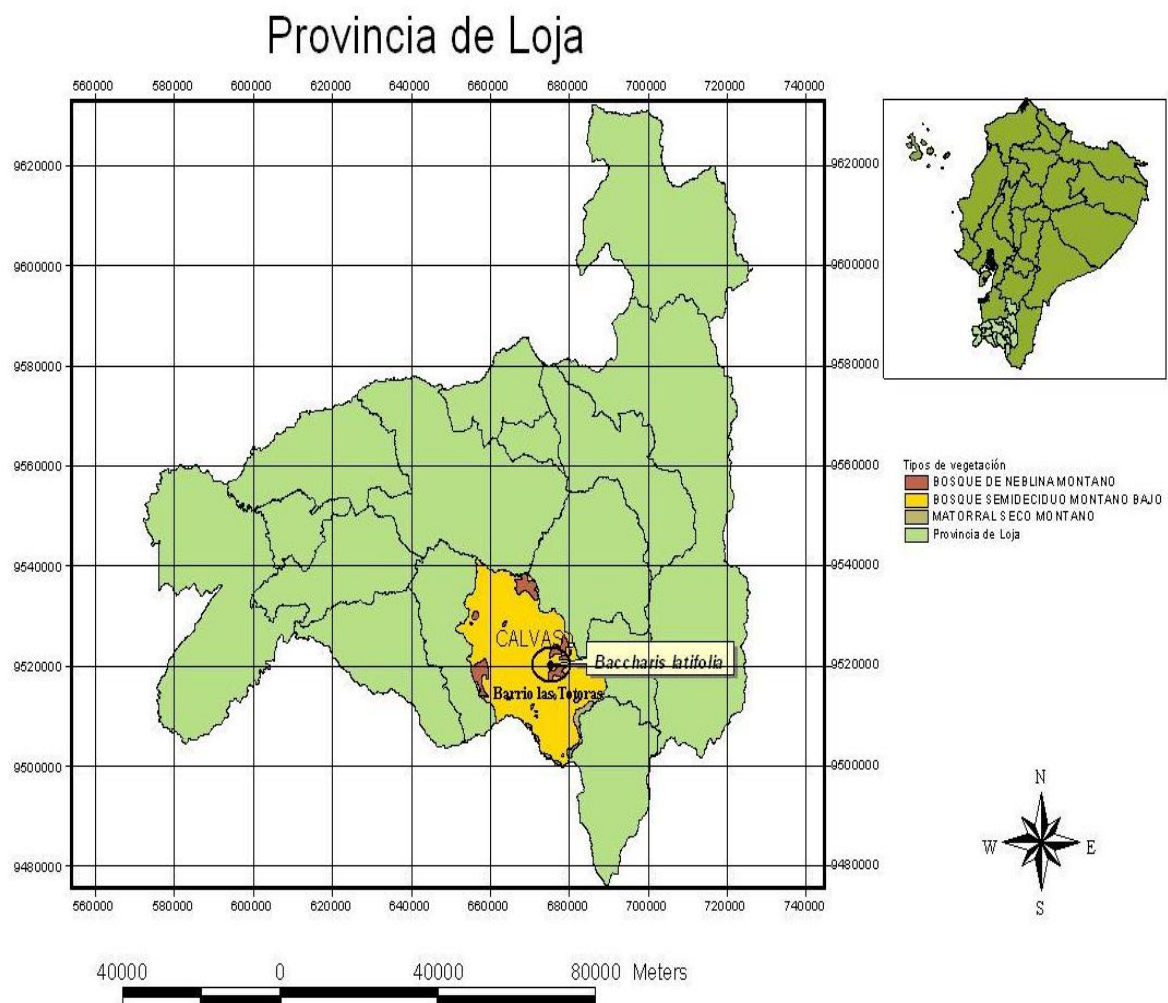


Figura 6: Zona de estudio de la especie *B. latifolia*  
Elaboración: El autor



La especie fue colectada en estado de floración y una vez colectada se le traslado hasta el laboratorio de Ingeniería de Procesos para su tratamiento pos cosecha y posterior destilación. Se realizaron en total 3 recolecciones distintas con un intervalo de tiempo de 15 días entre una y otra recolección.



**Fotografía 2.** Recolección de la especie  
**Elaboración:** El autor.

### **3.1.2. Tratamiento pos cosecha del material vegetal**

El tratamiento pos cosecha del material recolectado se llevó a cabo con la finalidad de eliminar impurezas, materia de la planta que se encuentre deteriorada ya sea que esté putrefacta o seca y que podría interferir en nuestros resultados, posteriormente procedimos a cortar la materia vegetal con el fin de lograr pequeñas partes de la misma y hacer que la superficie de contacto con el vapor en el momento de la destilación sea mayor, esto nos permitirá obtener un mayor rendimiento.



**Fotografía 3.** Tratamiento pos cosecha del material vegetal  
**Elaboración:** El autor.

### 3.1.3 Extracción del aceite esencial

Para hacer las destilaciones correspondientes se realizaron tres recolecciones distintas, con un intervalo de 15 días entre una recolección y otra; de cada recolección se hicieron tres destilaciones distintas; se determinó los rendimientos y la humedad de cada destilación para posteriormente tener datos comparativos entre una destilación y otra. (Ver anexo I).

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de 2800 g., de las partes aéreas de la especie. La extracción se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo Clevenger; estos equipos tienen en su parte interna una placa perforada donde se coloca el material vegetal a destilar, por debajo de esta placa se coloca agua que una vez que llegue al punto de ebullición el vapor circula por el material vegetal y va arrastrando los componentes volátiles que forman parte del aceite esencial de la planta. El vapor formado pasa por un condensador donde es condensado y la mezcla de aceite y agua es recolectada en un florentino, donde se separan por diferencia de densidades, de esta manera se obtiene el aceite esencial.



**Fotografía 4.** Extracción del aceite esencial  
**Elaboración:** El autor.

Una vez hecha la destilación procedimos a recoger el aceite en probetas y se mide el volumen exacto del aceite esencial obtenido. Culminado este paso se almacenó el aceite en frascos ámbar herméticamente cerrados y debidamente etiquetados conjuntamente con el volumen y fecha de destilación. Posteriormente los aceites se almacenaron en refrigeración a menos 4 grados centígrados para evitar la degradación del aceite por parte de la luz ya que sus componentes son muy volátiles.





**Fotografía 5.** Recolección y almacenamiento del aceite esencial  
**Elaboración:** El autor.

### **3.2 Determinación de las propiedades físicas**

Se determinaron las siguientes propiedades:

#### **3.2.1. Determinación de la densidad**

Una de las características físicas que se puede determinar es la densidad del aceite esencial. En cuanto a ello se sabe que los aceites esenciales se caracterizan por ser menos densos que el agua, excepto algunas esencias como la del clavo.<sup>6</sup>

La determinación de la densidad permite algunas veces, hacer ciertas deducciones acerca de la composición de las esencias. Así, los aceites esenciales que presentan densidades menores de 0.9 g/cm son ricos en hidrocarburos, alcoholes, ésteres y cetonas, algunos ejemplos son los aceites

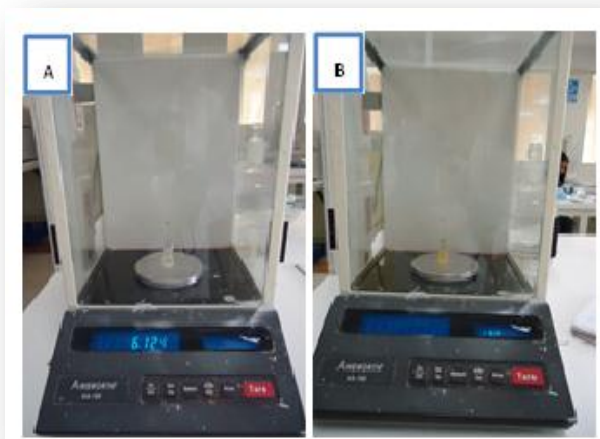
---

<sup>6</sup>Bandoni, A (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias, pp.: 29-43, 94- 96, 149-171, 197-232.



esenciales de naranja, limón, romero, trementina y coriandro, entre otros. Por otra parte, aquellos aceites que tienen densidades mayores de 1.0 g/cm<sup>3</sup> contienen principalmente fenoles o sus derivados y ciertos ésteres aromáticos. La densidad de un aceite esencial no es constante porque depende de la planta de la cual se obtuvo, del método de extracción, purificación, tiempo y modo de almacenamiento.<sup>34</sup>

La determinación de la densidad del aceite esencial se realizó según la norma ANFOR NF T 75 – 111 (ver anexo III), para lo cual se hizo uso de un picnómetro de 1ml, un termómetro y una balanza analítica.



**Fotografía 6.** Determinación de la Densidad Relativa. A) Picnómetro con agua; B) Picnómetro con aceite  
**Elaboración:** El autor

### 3.2.2. Índice de refracción

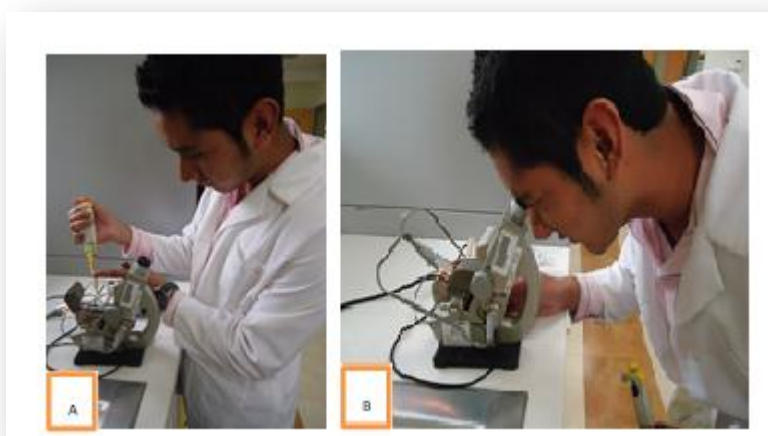
La propiedad que tienen los aceites de refractar la luz polarizada es una característica particular aprovechada para su control de pureza, ya que cada aceite presenta un índice de refracción característico. De la misma manera los aceites esenciales presentan un poder rotatorio particular, debido a que algunos de sus compuestos químicos son ópticamente activos.<sup>6</sup>

<sup>34</sup> GÜENTHER, E. The Essential Oils. Volumen I: History – Origin in plants production – Analysis, Litton Educational, New York, 1948, pp.: 241–244

<sup>6</sup> Bandoni, A (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias, p.p. 29-43, 94- 96, 149-171, 197-232



El valor del índice de refracción para la mayoría de aceites esenciales varía entre 1.43 y 1.61 a 20°C. La mayoría presentan índices de refracción menores de 1.47, poseen un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Por el contrario, un índice de refracción mayor de 1.47, indica la posible presencia de compuestos alifáticos oxigenados.<sup>34</sup> La determinación del índice de refracción se hizo utilizando un refractómetro ABBE según la norma AFNOR NF T 75 – 112 (ver anexo IV).



**Fotografía 7.** Determinación del índice de refracción. A) Muestra del aceite; B) Lectura  
**Elaboración:** El autor

### 3.3. Identificación de componentes químicos

La respectiva identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *B. latifolia* se hizo mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas CG-MS y al Detector de Ionización de Llama CG-FID.

<sup>34</sup> GÜENTHER, E. The Essential Oils. Volume I: History – Origin in plants production – Analysis, Litton Educational, New York, 1948, pp.: 241–244



### 3.3.1 Cromatografía de Gases (CG)

### 3.3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-MS)

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *B. latifolia* por Cromatografía de Gases acoplado a la Espectrometría de Masas (CG-MS) 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 DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano) y HP-INOWAX.

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, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1, cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683, y acoplado a un detector de ionización de llama.



**Fotografía 8.** Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N  
Elaboración: El autor





En la tabla 1 se detallan las características de las columnas capilares que se usaron para las inyecciones cromatográficas

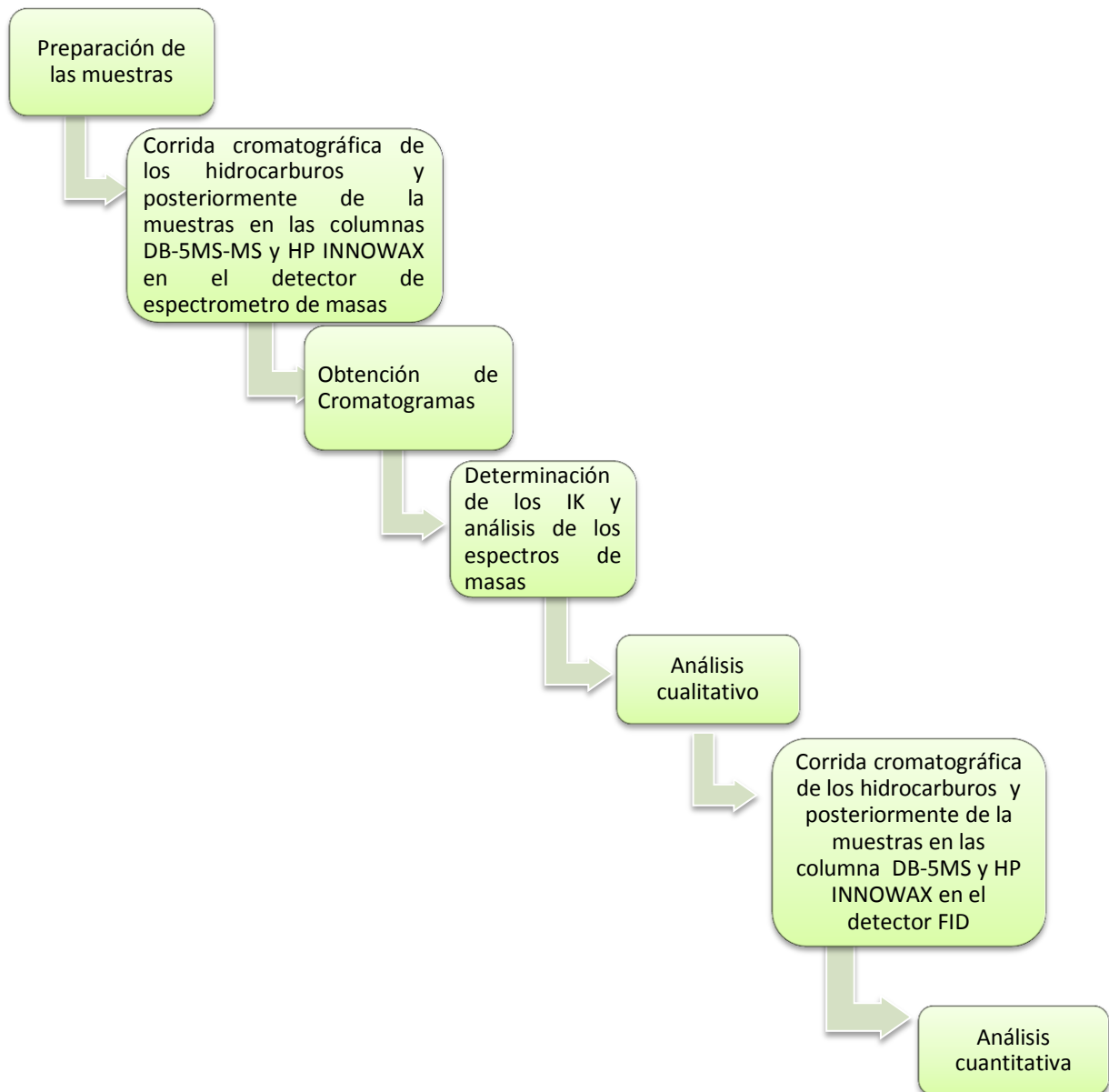
**Tabla 1.**Características de las columnas capilares

<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS COLUMNAS CAPILARES</b>				
<b>Columna</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Película(μm)</b>	<b>Diámetro Interno (mm)</b>	<b>Longitud(m)</b>
DB-5MS	325	0,25	0,25	30
HP-INOWAX	260	0,25	0,35	30

**Fuente:** Proveedores

**Elaboración:** El autor

La identificación de los componentes químicos presentes en las muestras del aceite esencial de *B. latifolia* en el CG-MS y CG-FID se desarrolló bajo el siguiente esquema:



**Figura 7.** Esquema para la identificación de los componentes químicos del aceite esencial.  
**Elaboración:** El autor



### 3.3.2.1 Preparación de las muestras

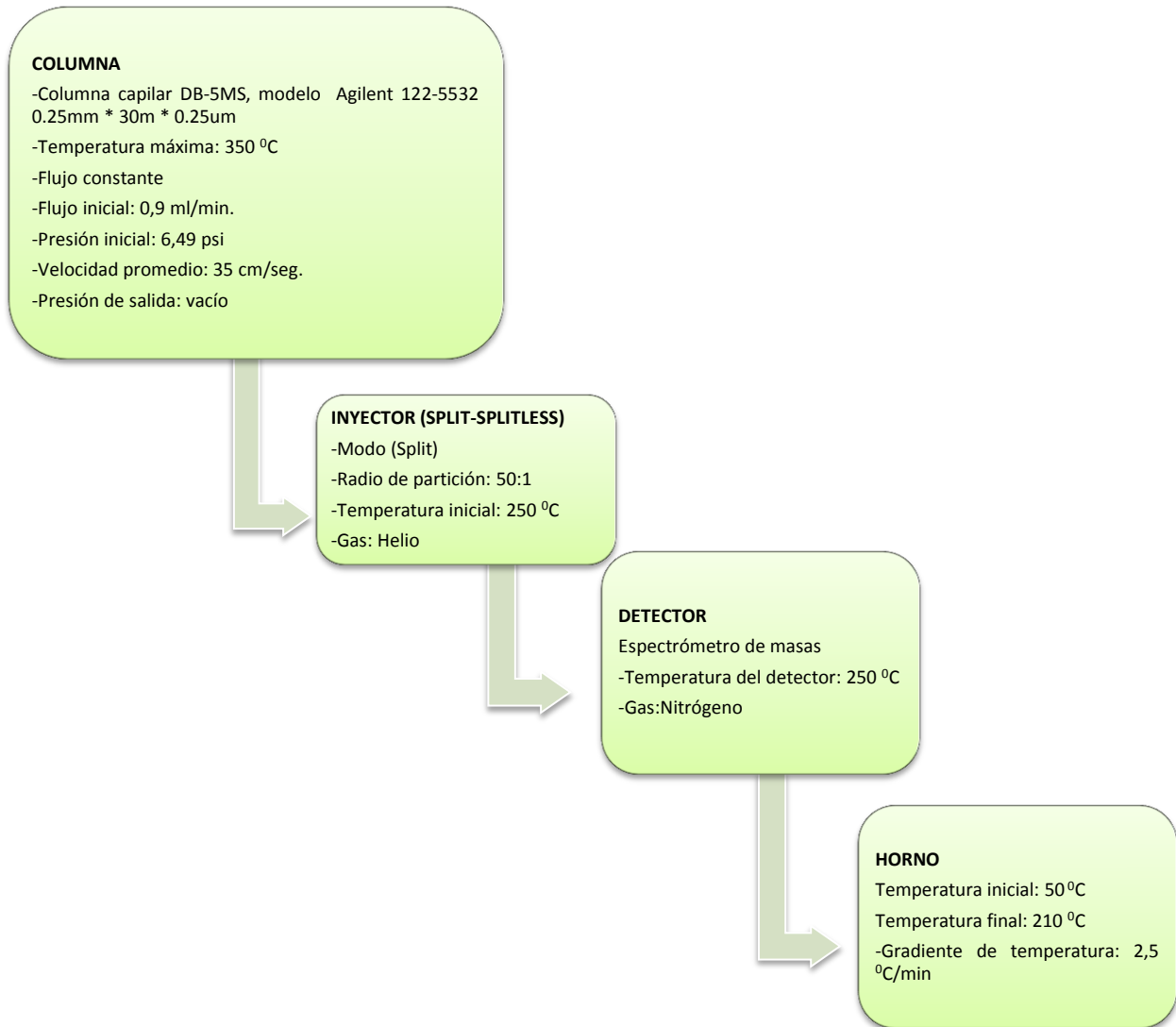
Para la preparación de los aceites esenciales para las inyecciones cromatográficas se realizó una disolución de 990  $\mu\text{l}$  de diclorometano grado HPLC y 10  $\mu\text{l}$  de aceite en un vial, se prepararon 9 disoluciones con los 9 aceites obtenidos y se hicieron las respectivas corridas cromatográficas.



**Fotografía 9.** Preparación de la muestras de los aceites esenciales para las inyecciones cromatográficas  
**Elaboración:** El autor

### 3.3.2.2 Corrida cromatográfica de las muestras en la columna DB-5MS.

Para realizar las respectivas corridas cromatográficas se usaron algunos parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras del aceite esencial de *B. latifolia* (figura 8). También se realizó la inyección de una muestra de hidrocarburos de C10 (decano) a C25 (pentacosano), comercialmente conocido como TPH-6RPM de CHEM SERVICE bajo los mismos parámetros operacionales en los que se inyectaron los aceites, éstos se utilizarán posteriormente para realizar el cálculo de los índices de Kóvats.

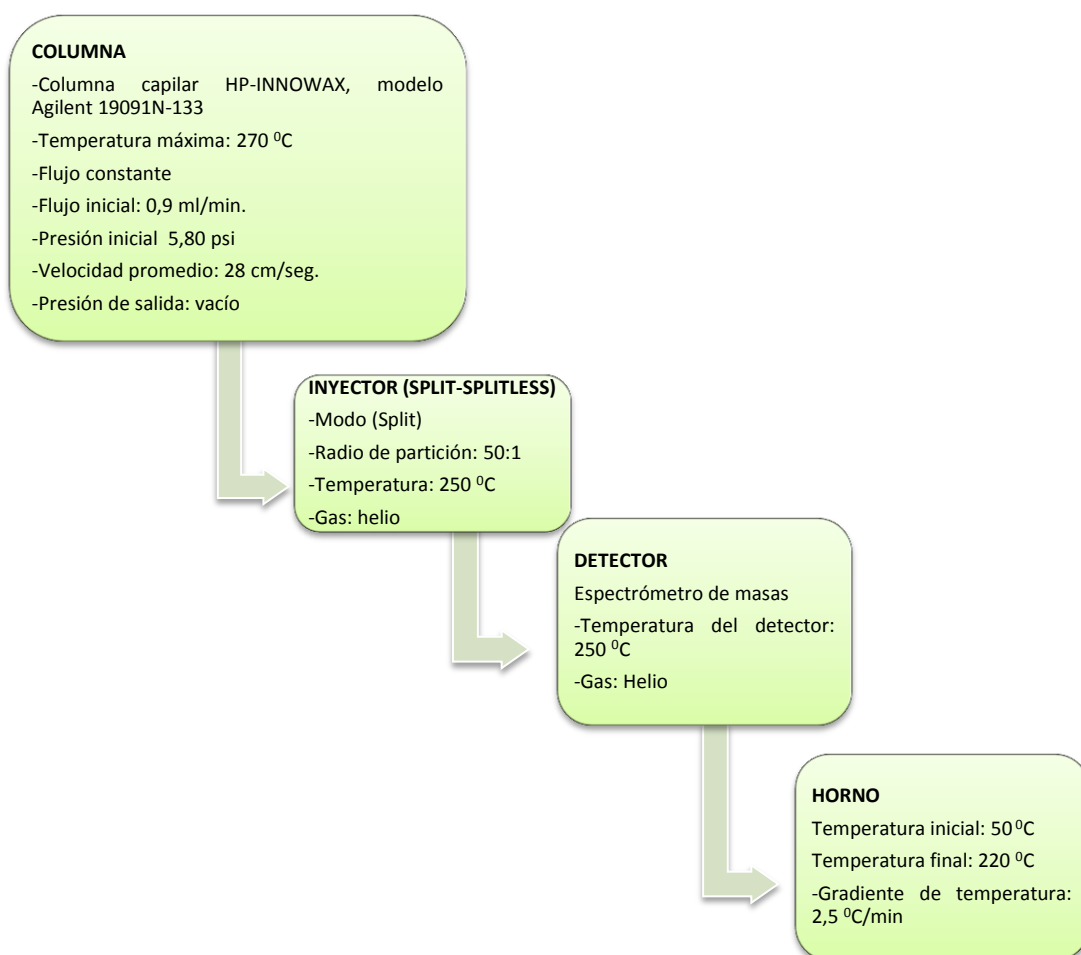


**Figura 8.** Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS.  
**Elaboración:** El autor



### 3.3.2.3. Corrida cromatográfica de las muestras en la columna HP-INNOWAX

Para realizar las respectivas corridas por cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas CG-MS usando la columna polar (HP-INNOWAX) se trabajó bajo las condiciones operacionales que se indican en la figura (9), además se hizo la inyección de hidrocarburos de C10 (decano) a C25 (pentacosano), bajo los mismos parámetros operacionales en los que se inyectaron los aceites, éstos se utilizarán posteriormente para realizar el cálculo de los índices de Kovats.



**Figura 9.** Condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX.  
**Elaboración:** El autor



### 3.3.2.4 Obtención de cromatogramas

El cromatograma muestra el tiempo que eluyó cada soluto con solventes y las áreas de los picos señalan cuánto hay de cada componente. La identidad del soluto que produce cada pico puede determinarse al comparar su ubicación con una base de datos de compuestos conocidos.<sup>35</sup>

Para la obtención de los cromatogramas se realizó el análisis del aceite esencial de *B. latifolia* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

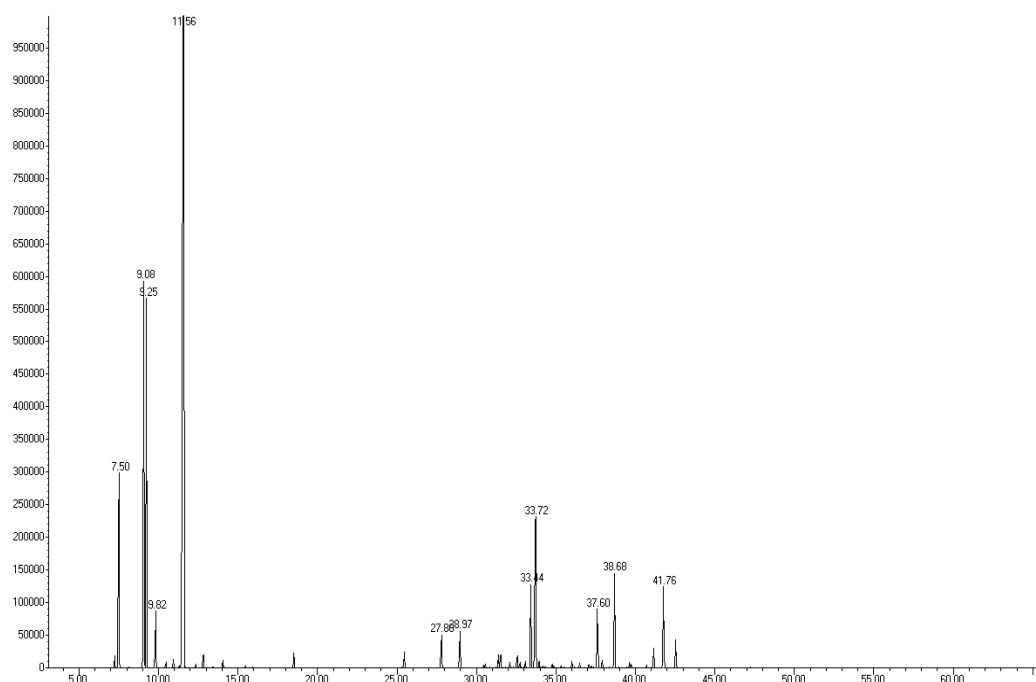


Figura 10. Cromatograma típico del aceite esencial de *B. latifolia*  
Elaboración: El autor

### 3.3.2.5 Determinación de los Índices de Kóvats

El índice de retención o índice de Kóvats relaciona el tiempo de retención de un soluto con los tiempos de retención de los alcanos lineales. Para determinar los índices de kóvats se inyectó una muestra que contenía una mezcla de n-alcanos ( $C_{10}$ - $C_{25}$ ), los resultados se interpretan mediante la comparación de los

<sup>35</sup> Jones A, Principios de Química, "Los caminos del descubrimiento", Tercera edición, Editorial médica Panamericana, 2002, pp.: 327



valores de retención calculados con los valores publicados en la literatura mediante la siguiente fórmula:<sup>36</sup>

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

**Dónde:**

**IK=** Índice de retención de Kóvats

**n=** Número de átomos de carbono en el n-alcano

**tRx=** Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos.

**tRn=** Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado.

**tRN=** Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

### **3.3.2.6 Análisis de los Espectros de Masas**

Un espectro de masas es un gráfico de barras en el que la altura de las barras corresponde a la cantidad relativa de un ión determinado representado como una función de la relación masa/carga. El espectro de masas de un compuesto orgánico indica que aquel compuesto está integrado por varias especies moleculares distintas de diferentes combinaciones de isótopos naturales.<sup>37</sup>

### **3.3.2.7 Identificación cualitativa de los componentes químicos del aceite esencial con base en los Índices de Kóvats y los espectros de masas**

El análisis cualitativo en Cromatografía de Gases se basa en la comparación de los tiempos de retención de los picos desconocidos, con los tiempos de retención de compuestos conocidos, separados en la misma columna y bajo las mismas condiciones experimentales. Cuando se mantienen constantes las

<sup>36</sup> Adams R . Identification of Essentials oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois, USA .Allured Publishing Corporation; 1995

<sup>37</sup> Jones A, Principios de Química, "Los caminos del descubrimiento", Tercera edición, Editorial médica Panamericana, 2002, pp.: 327



condiciones de operación, los tiempos de retención o volumen de retención son característicos de cada componente para una determinada fase líquida, y se pueden utilizar para identificar la muestra.<sup>37</sup>

Para la identificación de los compuestos químicos del aceite esencial de *B. latifolia* se determinaron los índices de Kóvats de los picos detectados en la columna DB-5MS, y luego se analizó los espectros de masas de los mismos y se hizo una comparación del espectro del pico con los propuestos en la librería WILLEY. Se realiza la comparación de los índices de Kóvats obtenidos experimentalmente en las dos columnas con los reportados en la literatura.

### 3.3.3 Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de Llama (CG-FID)

El Detector de Ionización de Llama (FID) se basa en la conductividad eléctrica de los gases. A temperatura y presión normales, los gases se comportan como aislantes, pero si en su interior existen átomos o moléculas cargadas eléctricamente, o electrones libres, se produce un incremento en la conductividad.

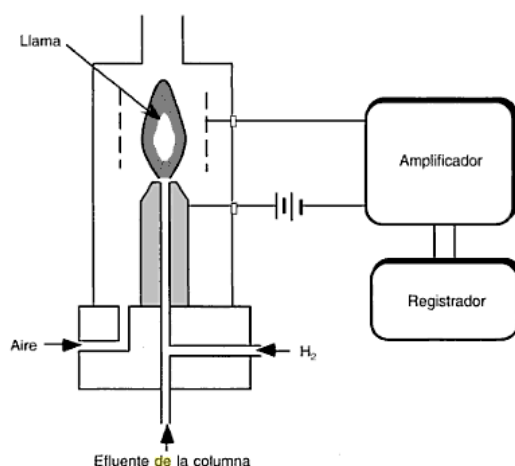


Figura 11. Detector de Ionización de llama (FID)  
Fuente: Hernández (2002)

El Detector de Ionización de Llama representado en la figura (11), consiste en un quemador en el que se produce una llama de hidrógeno, la cual origina muy

<sup>37</sup> Jones A, Principios de Química, "Los caminos del descubrimiento", Tercera edición, Editorial médica Panamericana, 2002, pp.: 327





pocos iones. Sin embargo, la energía térmica de la llama es suficiente para ionizar muchas moléculas, con lo que aumenta la conductividad eléctrica a través de los compuestos de la llama. Entre el extremo del mechero y un segundo electrodo colector de iones se aplica un potencial de unos cientos de voltios, midiéndose la intensidad de la corriente originada por la ionización de la llama, la cual difiere de la representada por el gas portador y de la originada por una gran variedad de sustancias. Como las corrientes originadas son muy pequeñas ( $=10^{-12}$  A), es necesaria la correspondiente amplificación.<sup>38</sup>

Se realiza la comparación de los cromatogramas obtenidos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas con los obtenidos por Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de Llama con la finalidad de determinar si el porcentaje relativo obtenido en ambos detectores presentan diferencias

### **Especificación de los parámetros usados en el cromatógrafo de gases acoplado al FID.**

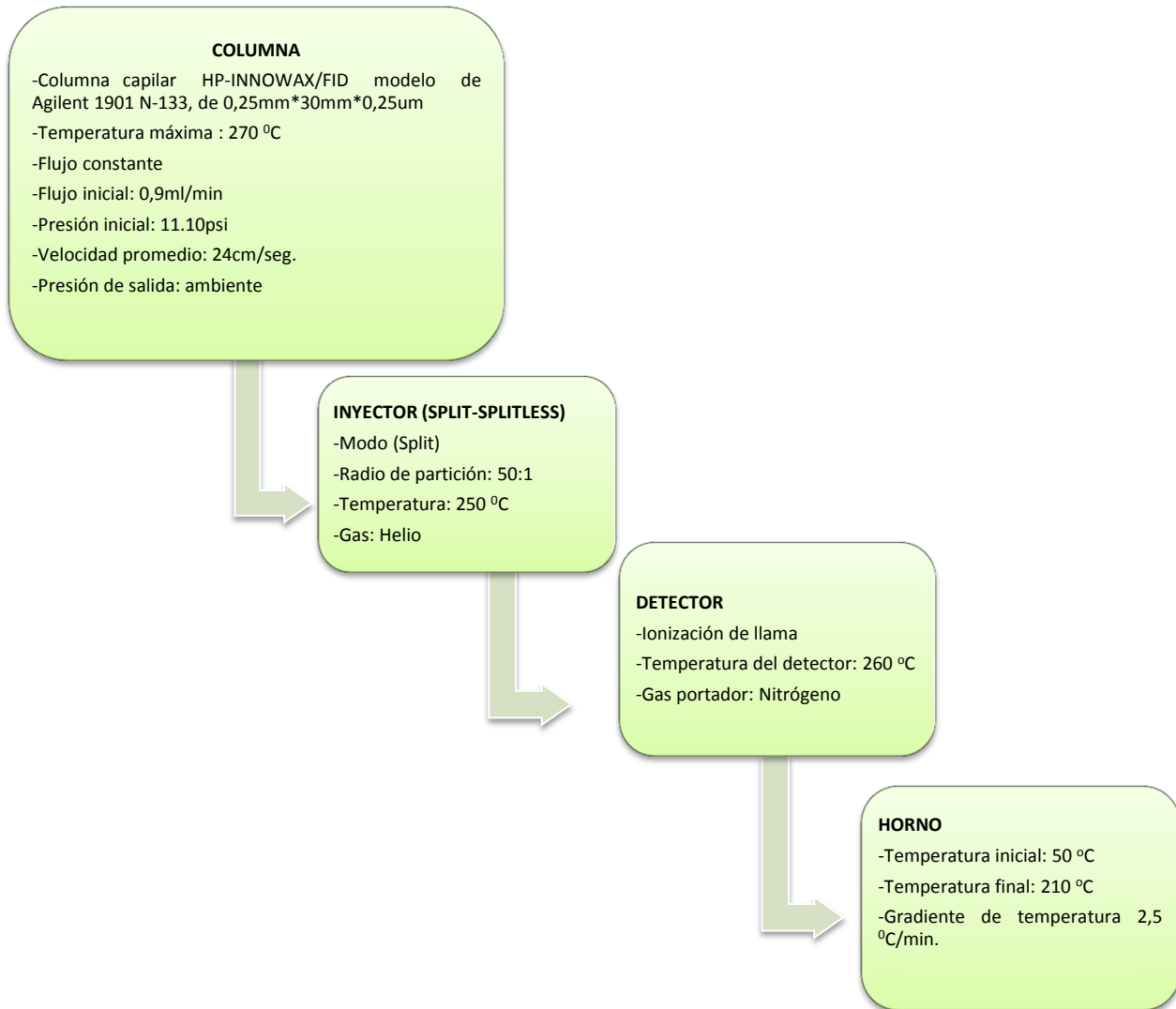
Las muestras se prepararon de la misma forma que las muestras analizadas por Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas

#### **3.3.3.1 Corrida Cromatográfica en la columna HP-INNOWAX.**

Las condiciones operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite esencial de *B. latifolia* por Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama CG-FID usando la columna polar HP-INNOWAX se indican a continuación:

---

<sup>38</sup> Hernández L, González C, "Introducción al Análisis Experimental" Editorial Ariel S.A, Primera Edición, 2002, pp.: 378-379

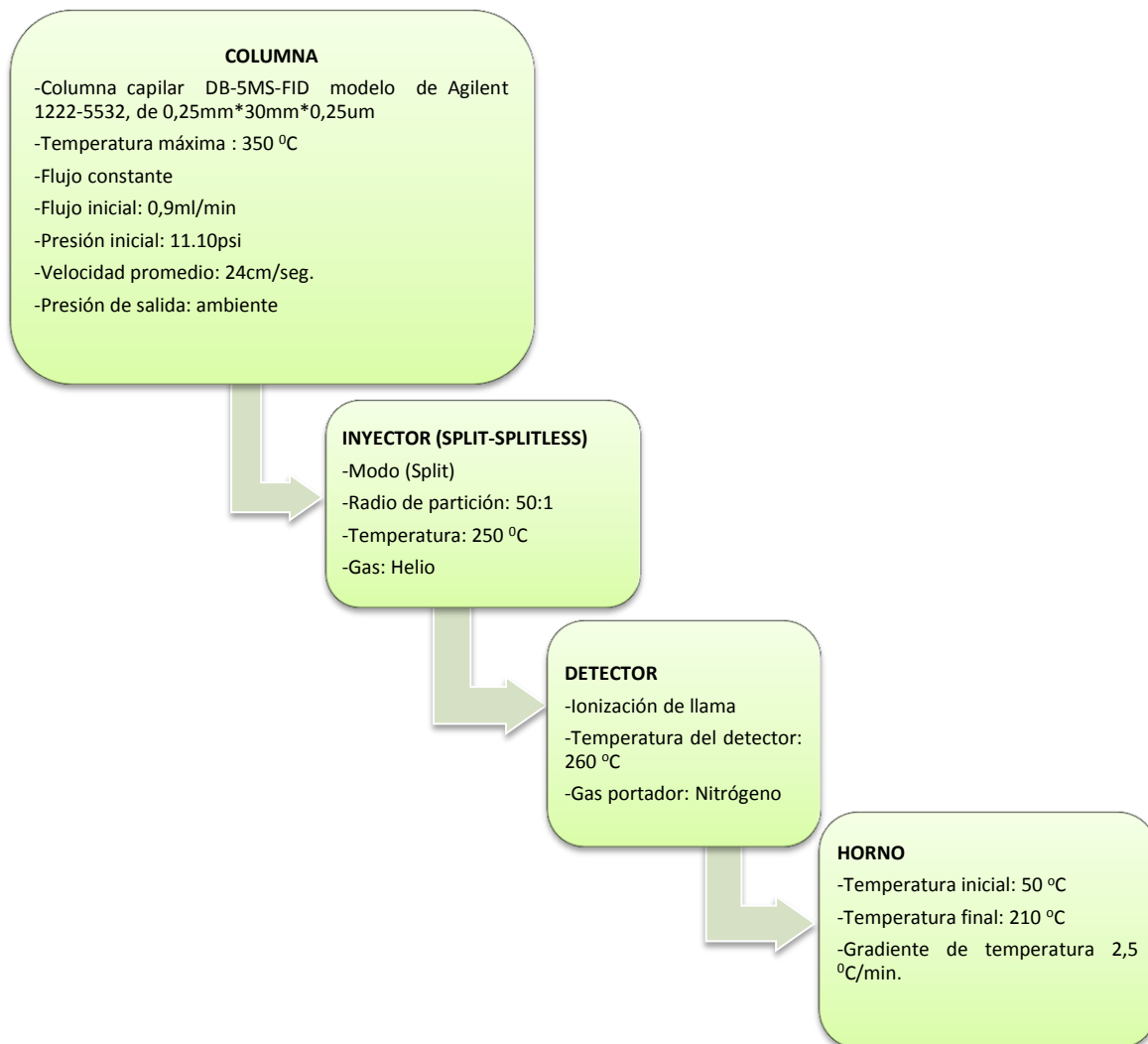


**Figura 12.** Condiciones de operación del CG-FID en la columna HP-INNOWAX  
**Elaboración:** El autor



### 3.3.3.2 Corrida cromatográfica en la columna DB-5MS

Las condiciones operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras de aceite esencial de *B. latifolia* por Cromatografía de Gases acoplado al Detector de Ionización de Llama CG-FID usando la columna apolar DB-5MS se indican a continuación:



**Figura 13.** Condiciones de operación del CG-FID en la columna DB-5MS  
**Elaboración:** El autor



### **3.3.4 Comparación de los cromatogramas obtenidos en CG-MS con los obtenidos en CG-FID**

Una vez que se ha obtenido los cromatogramas en CG-MS y en CG-FID se procedió hacer una comparación con el fin de determinar si el porcentaje relativo de cada compuesto identificado en ambos detectores distan entre ellos y si existe alguna variabilidad.

### **3.3.5 Determinación de los componentes químicos del aceite esencial de *B. latifolia***

Después de ser identificados cualitativamente los componentes químicos del aceite esencial por CG-MS se realiza la determinación del porcentaje correspondiente a cada componente químico en función del área de cada pico cromatográfico tanto en GC-MS como en GC-FID.

## **3.4 Determinación de la actividad biológica del aceite esencial de *B. latifolia***

### **3.4.1 Microorganismos de prueba**

Para realizar las pruebas de actividad biológica se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> 9997, *Proteus vulgaris* ATCC<sup>®</sup> 8427, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2; 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCCV<sup>®</sup> 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 25923. De la misma manera se emplearon dos hongos esporulados: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC<sup>®</sup> 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC<sup>®</sup> 28188.

## **3.5 Pruebas antimicrobianas**

### **3.5.1 Métodos de microdilución en caldo**

#### **3.5.1.1 Preparación del aceite**

Para la disolución del aceite para las pruebas de microdilución en caldo se utilizó 20 µL del aceite esencial concentrado, diluidos en 980 µL de Dimetil



sulfóxido (DMSO), cabe mencionar que ésta dilución es la misma para CMI antibacteriano y CMI antifúngico.

### 3.5.1.2 Preparación del cultivo bacteriano (overnight)

El cultivo overnight se preparó a partir de los microorganismos que se encuentran en reserva criogénica a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los medios de cultivo y las condiciones de incubación para cada microorganismo utilizado se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Medios de cultivo y condiciones de incubación para las bacterias utilizadas

Microorganismos	Medio de cultivo	Condiciones de Incubación
<i>P. aeruginosa</i>	Caldo Triptisoya	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>K. pneumoniae</i>	Caldo Triptisoya	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>P. vulgaris</i>	Caldo Muller Hinton	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>E. coli</i>	Caldo Triptisoya	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>S. tiphy</i>	Caldo Nutritivo Oxoid	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>E. faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h
<i>S. aureus</i>	Caldo Triptisoya	$37^{\circ}\text{C}$ por 14-16 h

Fuente: Proveedores  
Elaboración: El autor

### 3.5.1.3 Preparación de la suspensión de los inóculos

#### Bacterianos

Del cultivo overnight realizado 24 horas antes de realizar las pruebas correspondientes se tomaron 150-300  $\mu\text{L}$  en 7 mL de suero fisiológico estéril,



ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de Mac Farland, de ésta suspensión tomamos 140  $\mu\text{L}$  e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  ufc/mL. 100  $\mu\text{L}$  de ésta suspensión se usan para completar a 200  $\mu\text{L}$  el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  ufc/mL.

### Hongos Esporulados

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a  $-80^\circ\text{C}$  tomando de ésta 14  $\mu\text{L}$  en 7 mL de Caldo Sabouraud; posteriormente 100  $\mu\text{L}$  de ésta suspensión se usaron para completar a 200  $\mu\text{L}$  el volumen final de la placa de cultivo, de ésta manera se ajusta la población fúngica a  $5 \times 10^4$  esporas/mL.

**Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación para los hongos utilizados**

Hongos esporulados	Medio de cultivo	Condiciones de Incubación
<i>T. mentagrophytes</i>	Caldo Sabouraud	$28^\circ\text{C}$ por 24-72
<i>T. rubrum</i>	Caldo Sabouraud	$28^\circ\text{C}$ por 24-72

Fuente: Proveedores  
Elaboración: El autor

#### 3.5.1.4 Procedimiento

##### Para bacterias:

Las pruebas se realizaron en placas de 96 pocillos mediante dilución doble seriada de la siguiente manera: colocamos 180  $\mu\text{L}$  de caldo Muller Hinton al primer pocillo y 100  $\mu\text{L}$  a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona 20  $\mu\text{L}$  del aceite (20 mg/mL) a probar, en el primer pocillo y mezclamos. Se realiza diluciones seriadas tomando 100  $\mu\text{L}$  del primer pocillo y diluyendo con 100  $\mu\text{L}$  del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  extracto) control negativo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20



$\mu\text{L}$  DMSO) como para el control positivo (180  $\mu\text{L}$  caldo + 20  $\mu\text{L}$  Gentamicina® a 1000 ppm).

Luego de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  ufc/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 8  $\mu\text{g/mL}$ . Se sella las placas e incubamos a  $37^\circ\text{C}$  por un período de 18-24 horas.

### **Para hongos:**

Se sigue el mismo procedimiento de dilución seriada aplicada variando únicamente ciertos parámetros: en hongos esporulados la concentración final del inóculo  $5 \times 10^4$  esporas/mL, concentración final del aceite de 1000 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  en la que se realiza diluciones seriadas hasta obtener 12 diluciones consecutivas y el control positivo que se emplea una solución de 1  $\text{mg/mL}$  de Itraconazol. Se incuban las placas a  $28^\circ\text{C}$  y se monitorea el crecimiento hasta las 96 horas.

## *IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*





## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de humedad

En la tabla 4 se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes de humedad obtenidos de las tres destilaciones de cada recolección.

**Tabla 4.** Promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $\sigma$ ), y coeficiente de variación (CV) para el porcentaje de humedad (% Humedad)

RECOLECCIÓN	$\bar{x}$	$\sigma$	CV
1	62,67	2,08	0,03
2	62,63	4,93	0,07
3	61,33	6,03	0,09

**Fuente:** Investigación directa  
**Elaboración:** El autor

Haciendo una comparación entre los promedios de las tres recolecciones realizadas se puede observar que el promedio de humedad mayoritario corresponde para la primera recolección (62,67%), y el menor para la tercera recolección (61,33%); la variabilidad que se da en estos resultados se puede atribuir a las diferentes condiciones climáticas que precedieron para cada recolección.

### 4.2 Determinación del rendimiento

En la tabla 5 se detallan los rendimientos obtenidos de las tres destilaciones hechas para cada recolección en relación al peso/volumen.



**Tabla 5.** Rendimiento en % (p/v) de las tres destilaciones hechas para cada recolección

Recolección	Destilaciones			
	1	2	3	
1	2880	2880	2880	P (g)
	7	7	7,8	V (mL)
	0,24	0,24	0,27	R (%)
2	2000	2000	2000	P (g)
	4	3 9	6	V (mL)
	0,20	0,19	0,30	R (%)
3	2880	2880	2880	P (g)
	5,5	6	7,8	V (mL)
	0,19	0,20	0,27	R (%)

Fuente: Investigación directa  
Elaboración: El autor

En la tabla 6 se indica el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes de rendimiento obtenidos de las tres destilaciones de cada recolección.

**Tabla 6.** Promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $\sigma$ ), y coeficiente de variación (CV) para los porcentajes de rendimiento (% R)

RECOLECCIÓN	$\bar{x}$	$\sigma$	CV
1	0,25	0,01	0,07
2	0,23	0,06	0,26
3	0,22	0,04	0,19

Fuente: Investigación directa  
Elaboración: El autor

El rendimiento de los aceites esenciales fue calculado en relación al peso/volumen; el promedio de rendimiento mayoritario que se obtuvo fue para la primera recolección (0,25%), y el menor fue para la tercera recolección (0,22%). Existen diferentes factores por los cuales se ve afectada el rendimiento de los aceites esenciales, se puede mencionar que el contenido de humedad; el hábitat de la planta, la época de recolección, son algunos de los factores que afectan directamente al rendimiento de los aceites esenciales.<sup>39</sup>

<sup>39</sup> Guzmán S, Cardozo R, García V (2004). Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Brittony Wilson, Guillermo de Ockham. Vol.: 7: 201-215.



### 4.3 Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial

El aceite esencial de *B. latifolia* es un líquido viscoso a temperatura ambiente y en refrigeración; presenta una coloración amarillenta y un olor cítrico-dulce.

#### 4.3.1 Determinación de la densidad

En la tabla 7 se detallan los valores de la densidad de la mezcla de los tres aceites para cada recolección, con un promedio de 0,931 g/mL.

Tabla 7. Densidad relativa de la unión de los tres aceites de cada recolección

RECOLECCIÓN	Densidad
1	0,918
2	0,949
3	0,927

$$\bar{x} = 0,931 \text{ g/mL}$$

Fuente: Investigación directa  
Elaboración: El autor

#### 4.3.2 Determinación del índice de refracción

En la tabla 8 se detallan los valores promedios de los índices de refracción de los tres aceites obtenidos de cada recolección; dando un promedio general de 1,487.

Tabla 8. Promedio ( $\bar{x}$ ) del índice de refracción de los tres aceites obtenidos de cada recolección

RECOLECCIÓN	$\bar{x}$
1	1,480
2	1,490
3	1,490

$$\bar{x} = 1,487$$

Fuente: Investigación directa  
Elaboración: El autor



#### 4.4 Compuestos químicos del aceite esencial de *B. latifolia*

La determinación de los compuestos químicos del aceite esencial de *B. latifolia* por CG-MS, tanto en la columna DB-5MS y HP-INNOWAX se basó en la comparación de los espectros de masas con los espectros de la base de datos Wiley 7n.1 del equipo

El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos. Un total de 28 compuestos fueron determinados correspondiendo al 93,53% y al 91,08% en la columna DB5-MS y a la columna HP-INNOWAX respectivamente, 10 compuestos fueron determinados en ambas columnas.

Los compuestos mayoritarios identificados son: limonene (38,71%); sabinene (10,28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8,81%);  $\beta$ -pinene (6,99%);  $\gamma$ -curcumene (6,43%); no definido (5,36%);  $\alpha$ -pinene (5,44%).

En la tabla 9 se detalla la composición química del aceite esencial de *B. latifolia*; se indican los índices de Kóvats tanto experimentales como los reportados en la literatura, también se muestra el porcentaje promedio relativo para cada compuesto en las dos columnas DB-5MS y HP-INNOWAX para las tres recolecciones, y se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes relativos obtenidos.

**Tabla 9.** Composición química del aceite esencial de *B. latifolia*.

Pico #	Compuestos	DB5		HP-INNOWAX		% CANTIDAD RELATIVA						DB5			HP-INNOWAX		
		IK A <sup>a</sup>	IK A <sup>ref</sup>	IK P	IK P <sup>ref</sup>	DB5 <sup>b</sup>			HP-INNOWAX <sup>c</sup>			$\bar{x}$	$\sigma$	CV	$\bar{x}$	$\sigma$	CV
						111	121	131	111	121	131						
1	$\alpha$ -thujene	937	931 <sup>d</sup>	-	-	0,38	0,30	0,25	-	-	-	0,31	0,07	0,21	-	-	-
2	$\alpha$ -pinene	942	939 <sup>d</sup>	1015	1034 <sup>f</sup>	5,84	5,32	5,15	6,07	5,59	7,18	5,44	0,36	0,07	6,28	0,82	0,13
3	sabinene	974	976 <sup>e</sup>	1154	1123 <sup>g</sup>	11,88	10,85	8,10	20,75	21,66	16,02	10,28	1,95	0,19	19,48	3,03	0,16
4	$\beta$ -pinene	977	990 <sup>e</sup>	1018	1008 <sup>g</sup>	8,49	6,84	5,66	8,74	8,28	8,31	6,99	1,42	0,20	8,44	0,26	0,03
5	myrcene	988	994 <sup>e</sup>	1115	1161 <sup>g</sup>	1,62	1,71	1,00	2,21	2,41	1,51	1,44	0,39	0,27	2,04	0,47	0,23
6	limonene	1026	1039 <sup>f</sup>	1146	1178 <sup>n</sup>	40,33	39,85	35,94	23,54	26,75	25,96	38,71	2,41	0,06	25,42	1,67	0,07
7	trans- $\beta$ -ocymene	1043	1050 <sup>e</sup>	-	-	0,37	0,19	-	-	-	-	0,28	0,13	0,45	-	-	-
8	aromadendrene	1468	1458 <sup>g</sup>	1462	1458 <sup>g</sup>	0,60	-	0,79	0,73	1,53	-	0,70	0,13	0,19	1,13	0,57	0,50
9	$\gamma$ -terpinene	1054	1059 <sup>f</sup>	-	-	0,34	0,21	0,25	-	-	-	0,27	0,07	0,25	-	-	-
10	$\alpha$ -terpinolene	1080	1088 <sup>e</sup>	-	-	0,22	-	0,23	-	-	-	0,23	0,01	0,03	-	-	-
11	terpinen-4-ol	1176	1177 <sup>e</sup>	1260	1272 <sup>p</sup>	0,41	0,25	0,31	0,71	0,52	-	0,32	0,08	0,25	0,62	0,13	0,22
12	$\beta$ -elemene	1382	1391 <sup>h</sup>	-	-	0,62	0,28	0,73	-	-	-	0,54	0,23	0,43	-	-	-
13	$\beta$ -caryophyllene	1409	1419 <sup>e</sup>	1591	1594 <sup>g</sup>	1,11	1,92	1,88	2,08	3,74	2,92	1,64	0,46	0,28	2,91	0,83	0,28
14	$\alpha$ -curcumene	1474	1483 <sup>e</sup>	-	-	0,63	0,99	-	-	-	-	0,81	0,25	0,31	-	-	-
15	$\gamma$ -curcumene	1471	1480 <sup>j</sup>	-	-	5,71	7,15	-	-	-	-	6,43	1,02	0,16	-	-	-
16	bicyclogermacrene	1485	1517 <sup>j</sup>	-	-	0,33	-	0,49	-	-	-	0,41	0,11	0,28	-	-	-
17	$\beta$ -bisabolene	1501	1509 <sup>e</sup>	1726	1714 <sup>g</sup>	0,22	-	0,32	2,00	0,74	0,89	0,27	0,07	0,26	1,21	0,69	0,57
18	$\beta$ -dihydroagarofuran	1525	1504 <sup>k</sup>	-	-	5,44	-	12,18	-	-	-	8,81	4,77	0,54	-	-	-
19	$\delta$ -cadinene	1509	1524 <sup>e</sup>	1764	1749 <sup>g</sup>	0,50	0,78	0,54	5,07	8,34	6,85	0,61	0,15	0,25	6,75	1,64	0,24
20	$\alpha$ -bisabolol	1680	1701 <sup>l</sup>	-	-	0,25	-	0,65	-	-	-	0,45	0,28	0,63	-	-	-
21	chromolaenin	1721	1728 <sup>m</sup>	-	-	0,65	0,93	-	-	-	-	0,79	0,20	0,25	-	-	-
22	no identificado	1654	-	2019	-	4,76	4,26	7,06	4,77	3,55	-	5,36	1,49	0,28	4,16	0,86	0,21
23	azulen-2-ol,1,4-dimetil-	1760	1767 <sup>n</sup>	-	-	1,81	2,18	3,34	-	-	-	2,44	0,80	0,33	-	-	-
24	germacrene D	-	-	1673	1705 <sup>g</sup>	-	-	-	0,54	0,64	0,81	-	-	-	0,66	0,14	0,21
25	caryophyllene oxide	-	-	2080	2068 <sup>g</sup>	-	-	-	-	0,75	0,59	-	-	-	0,67	0,11	0,17
26	no identificado	-	-	1793	-	-	-	-	5,91	-	5,01	-	-	-	5,46	0,64	0,12
27	no identificado	-	-	2080	-	-	-	-	3,11	-	7,42	-	-	-	5,27	3,05	0,58
28	p-cymene	-	-	1174	1214 <sup>q</sup>	-	-	-	0,36	0,75	0,64	-	-	-	0,58	0,20	0,34
<b>Total*</b>												<b>93,53%</b>	<b>91,08%</b>				

IK A, IK P, Índices de kóvats en la columna polar (DB5-MS) y en la columna polar (HP-INNOWAX) respectivamente

a= Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS

b=Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB5-MS para cada recolección (111-121-131)

c= Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna HP INNOWAX-MS

\*= sumatoria del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB-5-MS y HP INNOWAX-MS

$\bar{x}$  = promedio del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB-5-MS y HP INNOWAX-MS

$\sigma$  = desviación estándar del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB-5-MS y HP INNOWAX-MS

CV=coeficiente de variación del % de la cantidad relativa encontrada en la columna DB-5-MS y HP INNOWAX-MS

IK Ref., referencias: <sup>d</sup>ref, <sup>e</sup>ref, <sup>f</sup>ref, <sup>g</sup>ref, <sup>h</sup>ref, <sup>i</sup>ref, <sup>j</sup>ref, <sup>k</sup>ref, <sup>l</sup>ref, <sup>m</sup>ref, <sup>n</sup>ref, <sup>o</sup>ref, <sup>p</sup>ref, <sup>q</sup>ref.

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El autor



Investigaciones previas acerca de la composición química del aceite esencial de diferentes especies del género *Baccharis* han reportado una variedad de componentes tales como sabinene, limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, (E)-nerodiol,  $\alpha$ -muurolol, isocaryophyllene,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide,  $\beta$ -salinene, terpinen 4 ol,  $\alpha$ -thujene, sphaatulanol, cumenol, germacrene-D, y carvacrol.<sup>40</sup>

En una investigación realizada acerca de la composición química del aceite esencial de *B. latifolia* en dos columnas una apolar (HP-5MS) y otra polar (AT-WAX) por CG-MS reportan 16 compuestos de los cuales el mayoritario es el  $\gamma$ -curcumene en un porcentaje del 12,2%,<sup>41</sup> en comparación con los resultados obtenidos en la presente investigación en la que el compuesto mayoritario es el limonene en un porcentaje de 38,71%. De igual forma en una investigación previa acerca de la composición química del aceite esencial de la especie en estudio reportan: germacrone (41.3%), limonene (23.6%),  $\alpha$ -thujene (10.9%),  $\alpha$ -pinene (6.3%),  $\gamma$ -elemene (4.3%) y verbocidantafurane (5.6%), como componentes mayoritarios,<sup>42</sup> en comparación con los resultados que hemos obtenido en la que los componentes mayoritarios son: limonene (38,71%); sabinene (10,28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8,81%);  $\beta$ -pinene (6,99%);  $\gamma$ -curcumene (6,43%); no definido (5,36%),  $\alpha$ -pinene (5,44). Como se puede apreciar los resultados obtenidos en esta investigación acerca de la composición química del aceite de *B. latifolia* con los resultados de investigaciones previas como las expuestas anteriormente, difiere tanto cualitativa como cuantitativamente.

Se sabe que la composición química de un aceite esencial viene determinada genéticamente, pero puede variar según distintas condiciones ambientales del

<sup>40</sup>Malizia R, Cardell D, Molli J, González S, Guerra P, Grau R (2005). Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part I: *B. racemosa* (RuisetPav.) DC and *B. linearis*(RuisetPav.) Pers. Species from Argentina Journal of Essential Oil Research, Vol.:17: 103-106.

<sup>41</sup>Rojas J, Velasco J, Rojas L, Díaz T, Carmona J, Morales A (2007), Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Baccharis latifolia* Pers. and *B. prunifolia* H. B. &K. (Asteraceae), Natural Product Communications Vol.: 2 (12):200

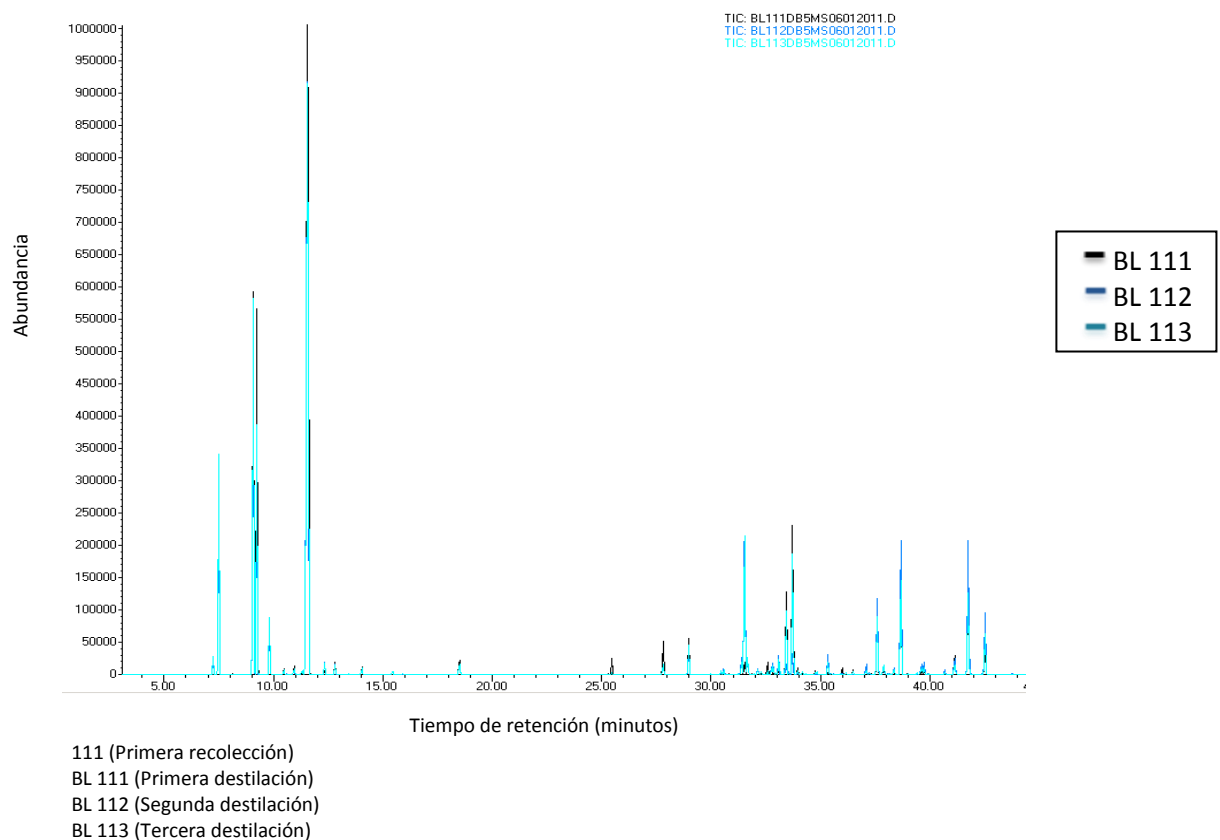
<sup>42</sup>Loayza I, Abujder D, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Jean F. (1995) Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. Phytochemistry, Vol.: 38: 381-389.



hábitat de la planta como suministro de agua, luz o temperatura.<sup>43</sup> Otros factores que explican la variabilidad en la composición química de un aceite esencial son el estado físico o fenológico en el que se destila la planta, el periodo de cosecha y el ciclo vegetativo.<sup>44</sup>

En la figura 14 se detalla la comparación de los cromatogramas en CG-MS de acuerdo a las tres destilaciones de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131.

a) 111

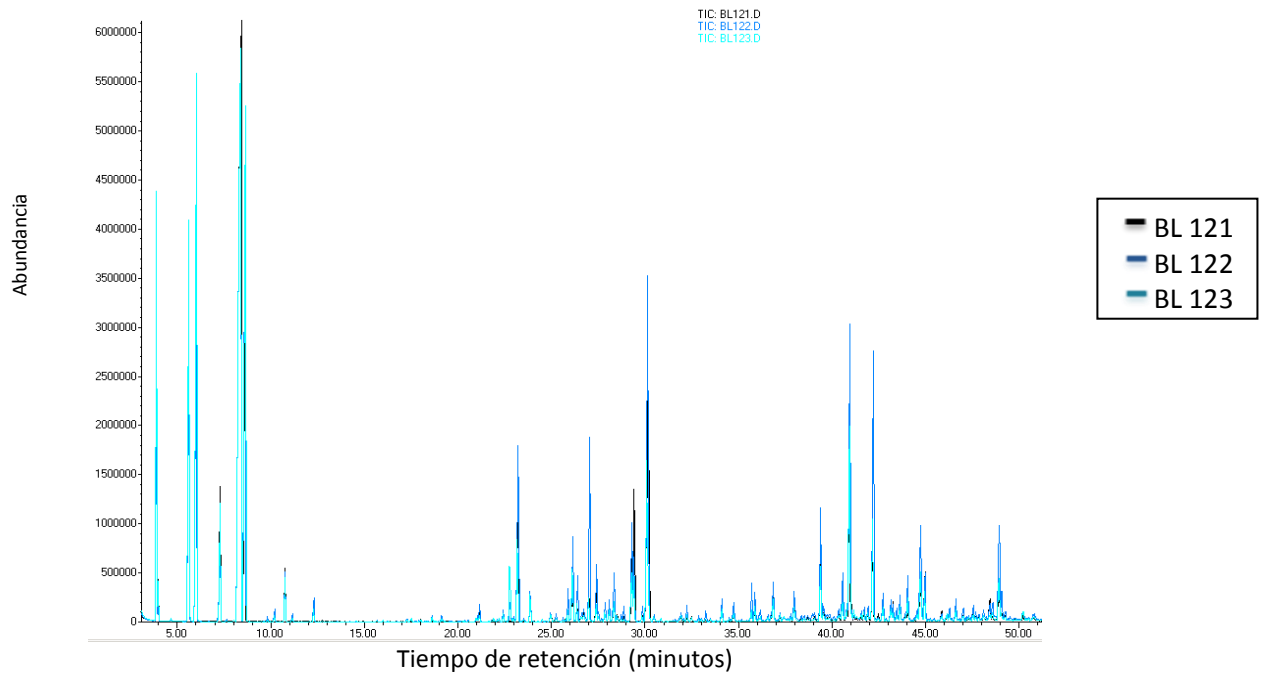


<sup>43</sup> A Burbott, Loomis D (1967). Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiol.*, Vol.: 42: 20-28

<sup>44</sup> H El-Seedi, A Khattab, A Gaara, N Hassan, El-Kattan A; Essential oil analysis of *Micromeria nubigena* H.B.K. and antimicrobial activity. *J Essent Oil Res* Vol.: 20: 452-456

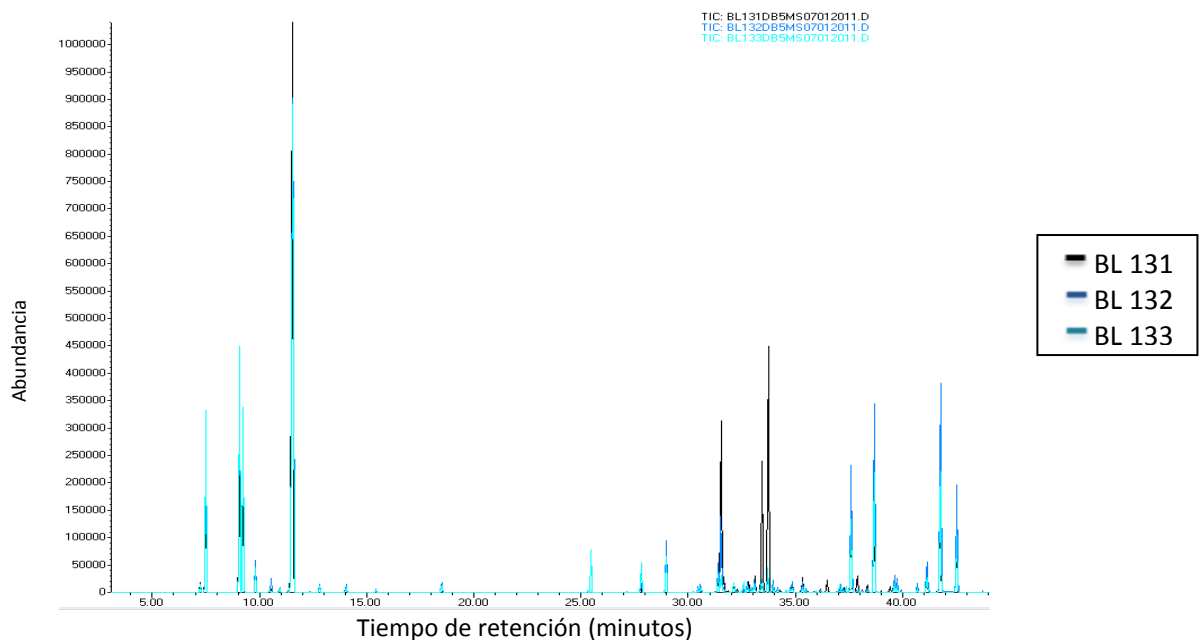


b) 121



121 (Segunda recolección)  
BL 121 (Primera destilación)  
BL 122 (Segunda destilación)  
BL 123 (Tercera destilación)

c) 131



131 (Tercera recolección)  
BL 131 (Primera destilación)  
BL 132 (Segunda destilación)  
BL 133 (Tercera destilación)

Figura 14. Comparación de los cromatogramas en CG-MS de acuerdo a las tres destilaciones de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131.

Elaboración: El autor

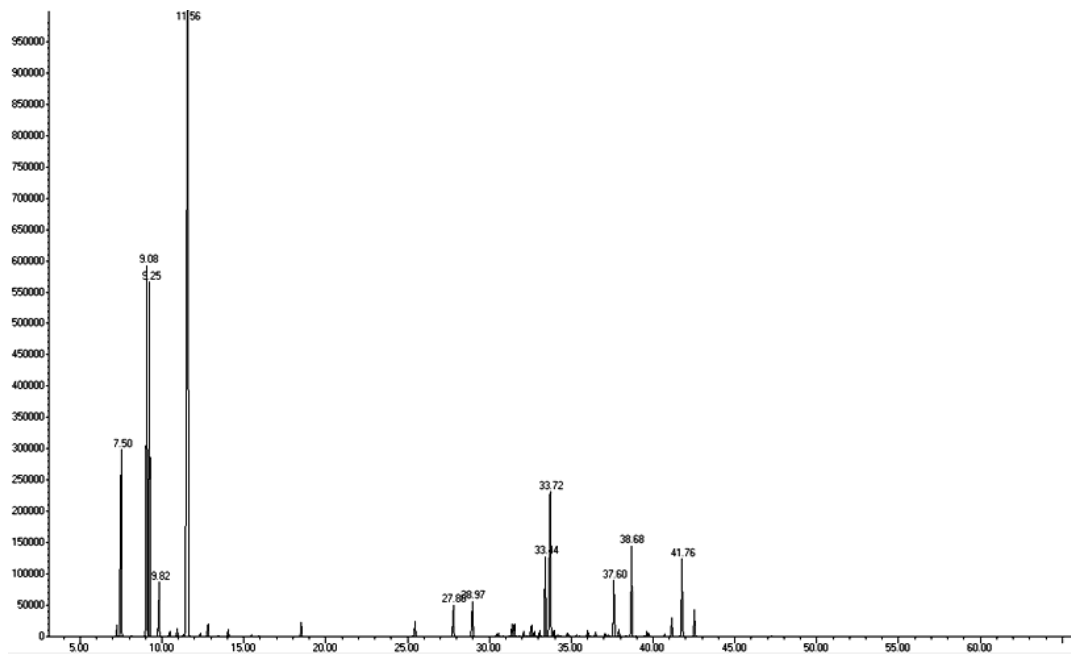




Como se puede apreciar en la figura 14 donde se realiza una comparación de los cromatogramas de las tres destilaciones realizadas para cada recolección en CG-MS se observa que existe una diferencia en cuanto a la abundancia de los picos lo que nos indica una variabilidad cuantitativa de los compuestos identificados en cada destilación. Las condiciones como temperatura y flujo de agua para el proceso de destilación que se usaron en esta investigación no son las mismas para una destilación y otra, dado que éste no es un método validado en el laboratorio y éste podría ser uno de los factores principales para que existan diferencias en cuanto a porcentajes de compuestos.

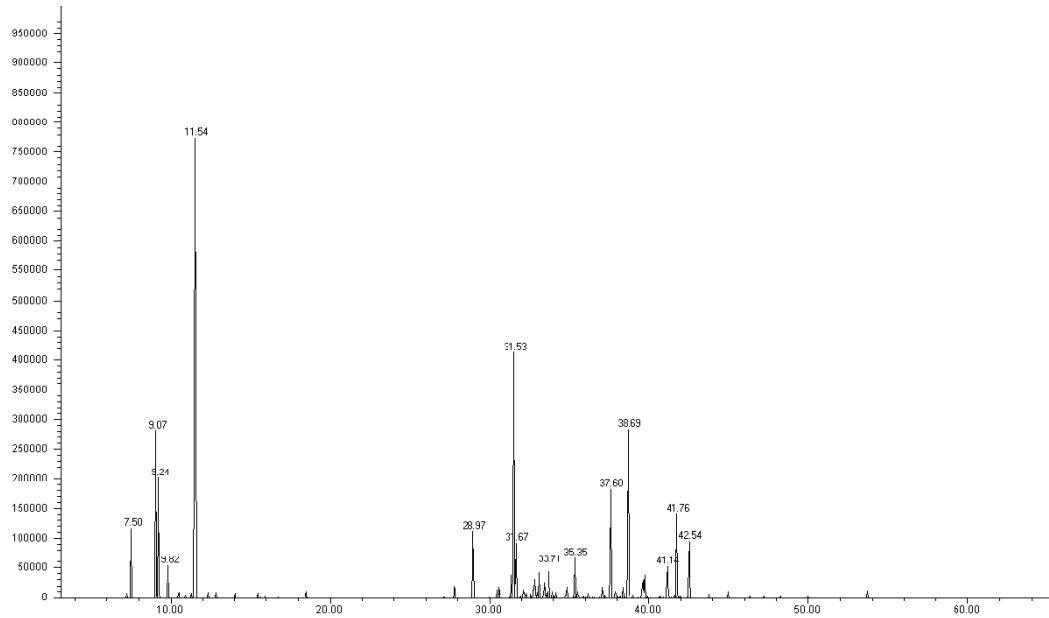
En la figura 15 se muestran los cromatogramas de la especie *B. latifolia* en la columna DB5-MS de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131

**a) 111**

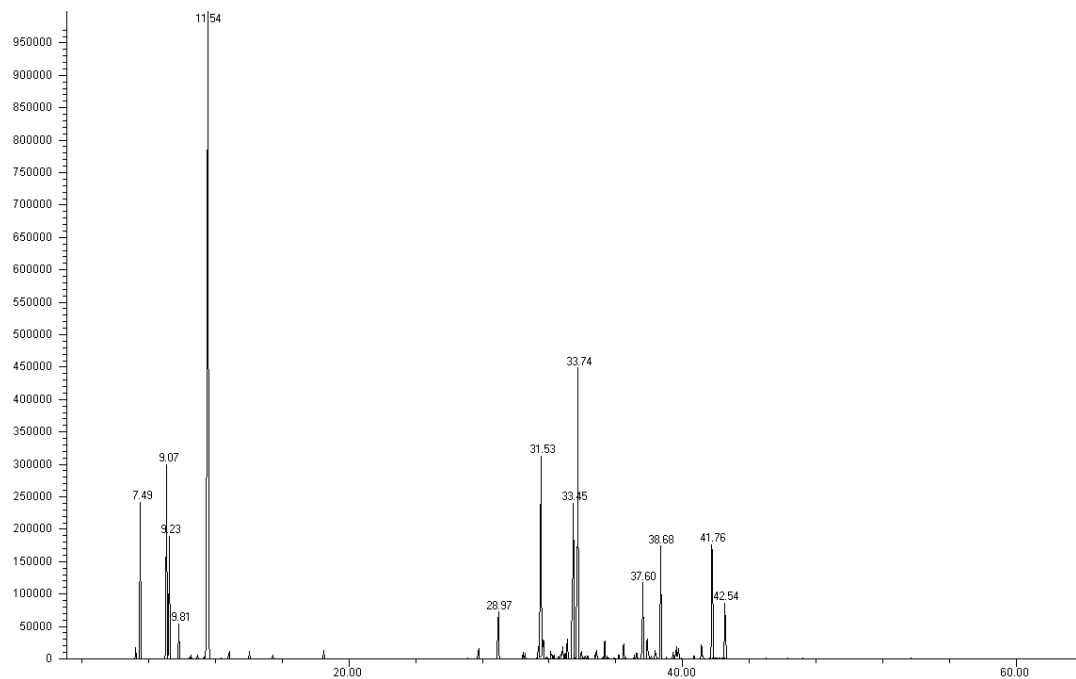




**b) 121**



**c) 131**



**Figura 15.** Cromatogramas de la especie *B. latifolia* en la columna DB5-MS de cada recolección; a) 111; b) 121; c) 131  
**Elaboración:** El autor



En la figura 16 se muestran los compuestos mayoritarios del aceite esencial de la especie *B. latifolia* de cada recolección (111-121-131).

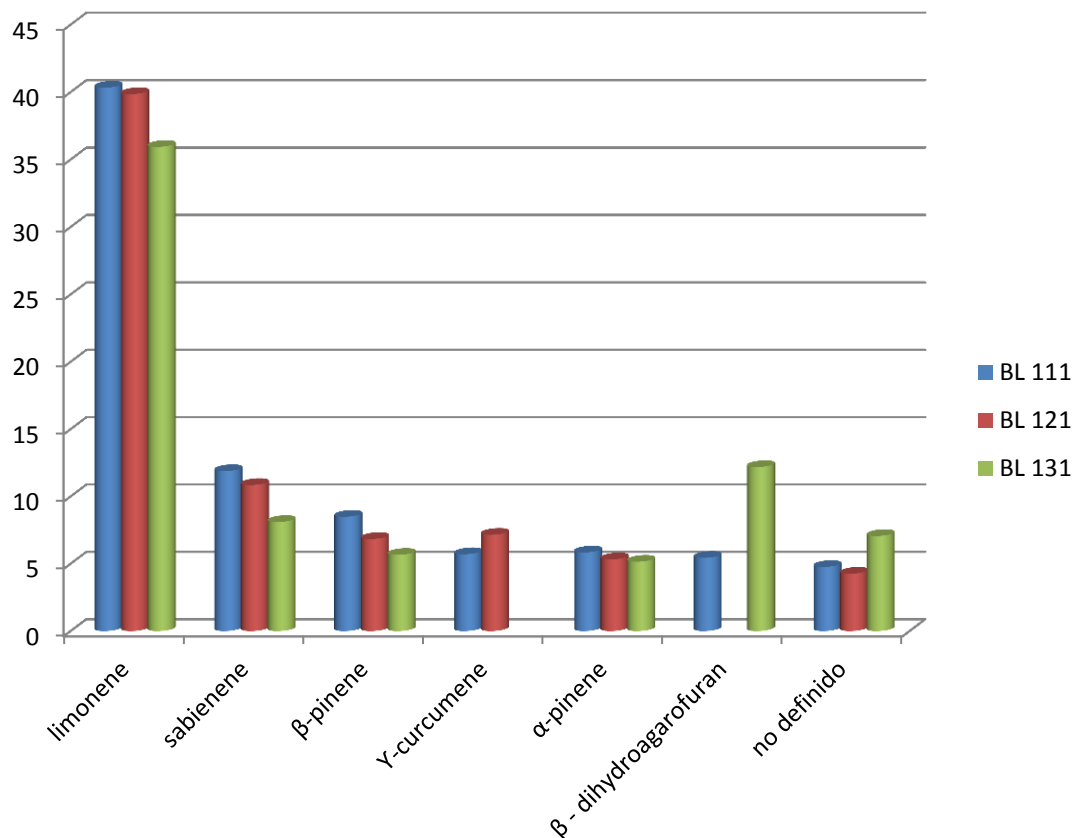


Figura 16. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *B. latifolia*.

Elaboración: El autor

Como se aprecia en la figura mostrada anteriormente en la que se compara el porcentaje de la cantidad relativa de los componentes mayoritarios de las tres destilaciones de cada recolección, se presenta una variación cuantitativa entre los componentes presentes de los aceites extraídos

#### 4.5 Proporción relativa de los componentes del aceite esencial

En la tabla 10 se muestra una comparación entre los porcentajes de los compuestos identificados en DB-5MS-MS con los porcentajes dados en DB-5MS-FID; la misma comparación se hace en la tabla 11 con la columna HPINNOWAX-MS Y HPINNOWAX-FID



**Tabla 10.** Comparación entre los porcentajes de los compuestos identificados en la columna DB-5MS-MS y los detectados en DB-5MS-FID.

Pico #	COMPUESTO <sup>a</sup>	% CANTIDAD RELATIVA DB-MS Y DB5-FID <sup>b</sup>						PROMEDIO <sup>c</sup>	
		111		121		131		FID	MS
		FID	MS	FID	MS	FID	MS		
1	α-thujene	0,29	0,38	0,34	0,3	0,263	0,25	0,30	0,31
2	α-pinene	4,85	5,84	6,45	5,32	5,305	5,15	5,53	5,44
3	sabinene	11,95	11,88	14,6	10,85	10,96	8,1	12,50	10,28
4	β-pinene	11,60	8,49	9,31	6,84	8,273	5,66	9,73	6,99
5	myrcene	1,94	1,62	2,07	1,71	1,598	1	1,87	1,44
6	limonene	41,15	40,33	45,7	39,85	32,87	35,94	39,91	38,71
7	trans-β-ocymene	0,14	0,37	0,2	0,19	-	-	0,17	0,28
8	aromadendrene	0,35	0,6	-	-	-	0,79	0,35	0,70
9	γ-terpinene	0,46	0,34	0,38	0,21	0,246	0,25	0,36	0,27
10	α-terpinolene	0,27	0,22	-	-	0,562	0,23	0,42	0,23
11	terpinen-4-ol	0,63	0,41	1,11	0,25	0,65	0,31	0,80	0,32
12	β-elemene	0,48	0,62	0,24	0,28	0,738	0,73	0,49	0,54
13	β-caryophyllene	1,21	1,11	1,26	1,92	1,317	1,88	1,26	1,64
14	α-curcumene	0,56	0,63	0,41	0,99	-	-	0,49	0,81
15	γ-curcumene	4,78	5,71	6,85	7,15	-	-	5,82	6,43
16	bicyclogermacrene	0,65	0,33	-	-	0,422	0,49	0,54	0,41
17	β-bisabolene	0,25	0,22	-	-	0,316	0,32	0,28	0,27
18	β-dihydroagarofuran	4,81	5,44	-	-	11,35	12,18	8,08	8,81
19	δ-cadinene	0,40	0,50	0,33	0,78	0,422	0,54	0,38	0,61
20	α-bisabolol	0,36	0,25	-	-	0,685	0,65	0,52	0,45
21	chromolaenin	0,36	0,65	0,93	0,93	-	-	0,64	0,79
22	no identificado	4,18	4,76	3,96	4,26	6,75	7,06	4,96	5,36
23	azulen-2-ol,1,4-dimetil-	1,42	1,81	1,11	2,18	1,089	3,34	1,21	2,44
							<b>Total*</b>	96,90	93,53

a= Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS-MS

b=Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB-5MS-MS y DB-5MS-FID para las tres recolecciones (111-121-131)

c= Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna DB-5MS-MS y DB-5MS-FID

\*= sumatoria del promedio del % de la cantidad relativa de las tres recolecciones en las columnas DB-5MS-MS y DB-5MS-FID

**Fuente:** Investigación directa

**Elaboración:** El autor



**Tabla 11.** Comparación entre los porcentajes de los compuestos identificados en la columna HPINNOWAX-MS y los detectados en HPINNOWAX-FID

Pico #	COMPUESTO <sup>a</sup>	% CANTIDAD RELATIVA HPINNOWAX-MS Y HPINNOWAX-FID <sup>b</sup>						PROMEDIO <sup>c</sup>	
		111		121		131		FID	MS
		FID	MS	FID	MS	FID	MS		
1	$\alpha$ -pinene	5,45	6,07	5,15	5,59	6,15	7,18	5,45	6,07
2	sabinene	20,3	20,75	20,4	21,66	15,3	16,02	20,3	20,75
3	$\beta$ -pinene	7,15	8,74	8,14	8,28	8,2	8,31	7,15	8,74
4	myrcene	2,18	2,21	3,21	2,41	1,14	1,51	2,18	2,21
5	limonene	24,2	23,54	25,2	26,75	25,4	25,96	24,2	23,54
6	aromadendrene	0,65	0,73	1,1	1,53	-	-	0,65	0,73
7	terpinen-4-ol	0,53	0,71	0,48	0,52	-	-	0,53	0,71
8	$\beta$ -caryophyllene	1,85	2,08	3,15	3,74	2,56	2,92	1,85	2,08
9	$\beta$ -bisabolene	1,53	2,00	0,53	0,74	0,7	0,89	1,53	2,00
10	$\delta$ -cadinene	5,15	5,07	8,15	8,34	6,15	6,85	5,15	5,07
11	no identificado	3,14	4,77	3,2	3,55	-	-	3,14	4,77
12	germacrene D	0,45	0,54	0,45	0,64	0,6	0,81	0,45	0,54
13	caryophyllene oxide	-	-	0,65	0,75	0,42	0,59	-	-
14	no identificado	5,28	5,91	-	-	4,85	5,01	5,28	5,91
15	no identificado	2,84	3,11	-	-	7,3	7,42	2,84	3,11
16	p-cymene	0,25	0,36	0,45	0,75	0,57	0,64	0,25	0,36
							Total*	85,26	91,08

a= Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB-5MS

b=Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna HPINNOWAX-MS y HPINNOWAX-FID para las tres recolecciones (111-121-131)

c= Porcentaje promedio calculados en base al % de área de los picos reportados en la columna HPINNOWAX-MS y HPINNOWAX-FID

\*= sumatoria del promedio del % de la cantidad relativa de las tres recolecciones en las columnas HPINNOWAX-MS y HPINNOWAX-FID

Fuente: Investigación directa

Elaboración: El autor

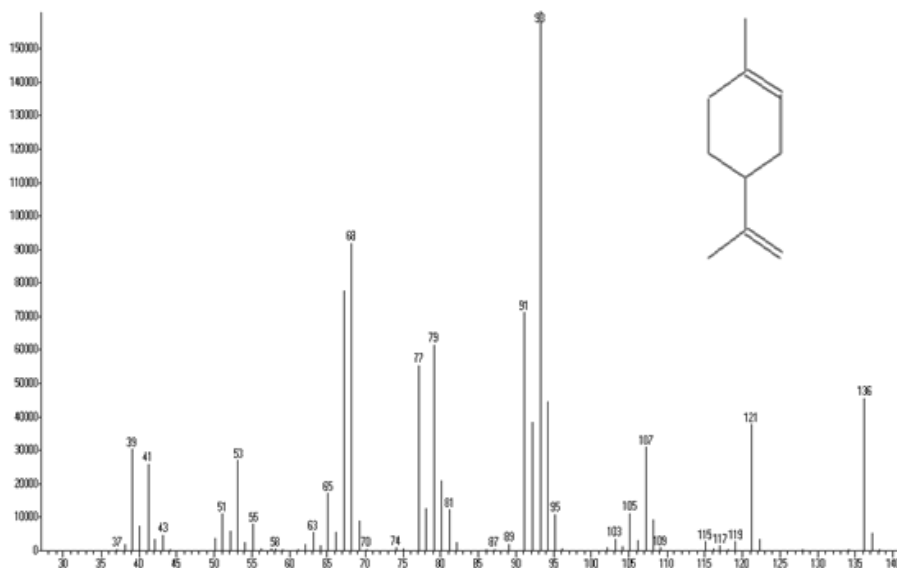
#### 4.6 Espectros de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *B. latifolia*

A continuación se presentan los espectros de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *B. latifolia*.



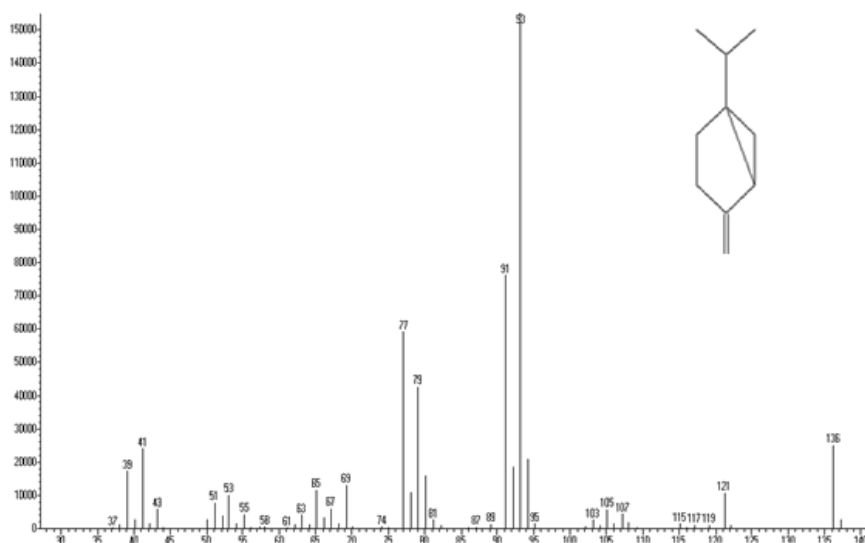
### limonene

136(28,22),121(23,42),119(1,64),117(0,92),115(1,70),109(0,50),107(19,17),105(6,92),103(2,11)95(6,74),93(100),91(44,12),89(1,21),87(0,22),81(7,61),79(38,11),77(34,36),74(0,50),70(0,25),68(56,99),65(10,66),63(3,39),58(0,36),55(4,95),53(16,74),51(6,86),43(2,92),41(16,08),39(18,84)37(0,23)



### sabinene

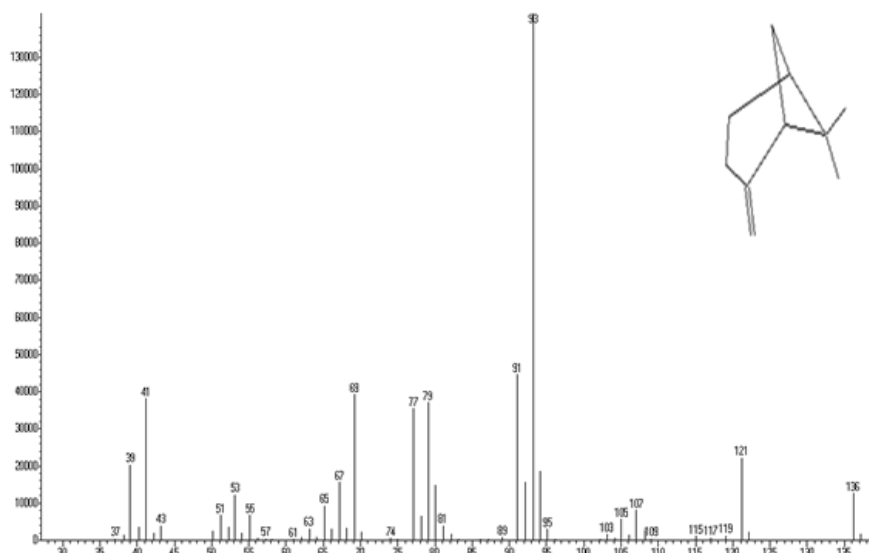
121(6,88),119(0,64),117(0,58),115(0,92),107(2,78),105(3,61),103(1,63),95(0,93),93(100),91(49,12),89(0,78),87(0,19),81(1,66),79(27,41),77(38,12),74(0,36),69(8,35),67(3,81),65(7,42),63(2,55),61(0,14),58(0,33),55(2,66),53(6,47),51(4,97),43(3,72),41(15,43),39(11,07),37(0,17)





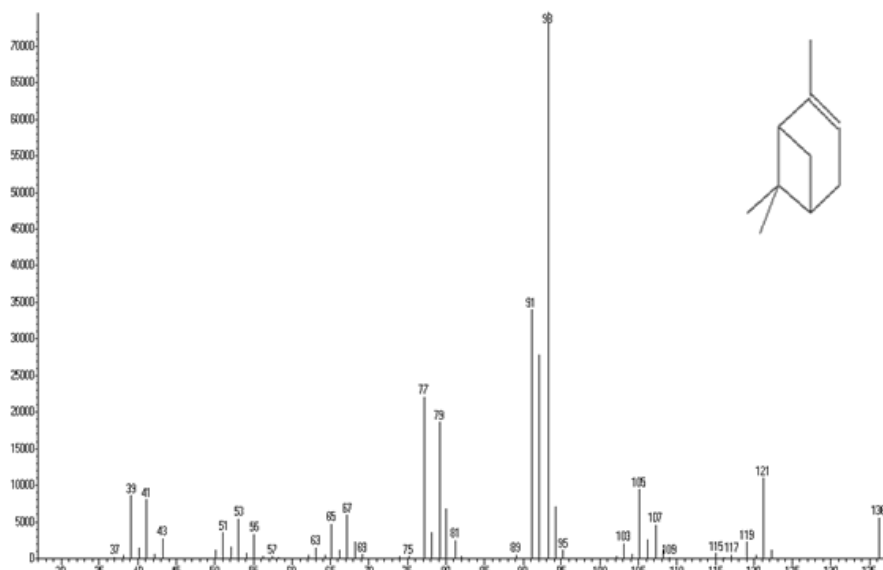
### $\beta$ -pinene

121(15,51),119(0,78),117(0,47),115(0,70),109(0,26),107(5,62),105(3,92),103(1,13),95(2,06),93(100),91(31,36),89(0,54),81(2,68),79(26,01),77(24,90),74(0,35),69(27,51),67(10,91),65(6,49),63(2,10),61(0,14),57(0,22),53(8,51),51(4,67),43(2,69),41(26,80),39(14,20),37(0,21)



### $\alpha$ -pinene

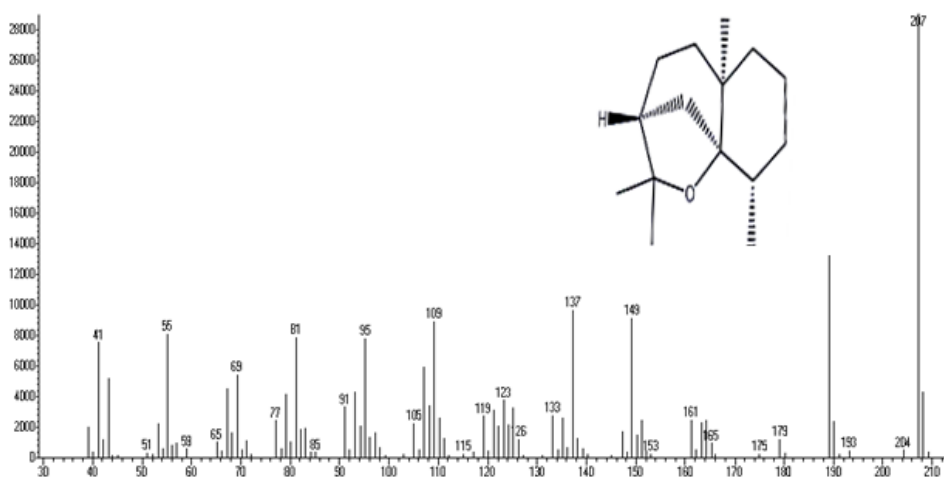
121(32,42),119(6,47),117(1,39),115(1,99),109(0,51),107(13,43),105(27,77),103(6,01),95(3,31),93(219,95),91(100),89(1,43),81(7,16),79(54,80),77(64,87),75(0,81),69(1,65),67(17,30),65(13,81),63(4,33),57(0,80),55(9,66),53(15,94),51(10,30),43(7,95),41(23,56),39(25,18),37(0,50)





### $\beta$ -dihydroagarofuran

207(100),204(1,71),193(1,58),189(53,33),179(4,19),175(0,88),165(3,21),161(8,48),153(0,87),149(31,41),137(33,20),133(9,48),126(4,17),123(12,93),119(9,42),115(0,89),109(30,65),105(7,7),95(26,85),91(11,37),85(1,17),81(21,16),77(8,32),69(18,72),65(3,52),69(18,72),65(3,52),59(1,98),55(27,81),51(1,10),41(26,02)



### $\gamma$ -curcumene

204(47,20),189(3,93),175(0,49),161(29,80),157(0,42),147(9,76),141(0,52),134(19,15),131(3,00),128(1,59),122(12,37),119(100),115(5,57),109(6,37),105(56,22),102(0,70),97(0,96),93(63,27),89(1,18),84(1,02),81(9,06),77(29,04),69(17,97),65(8,72),55(19,18),51(3,61),41(31,05)

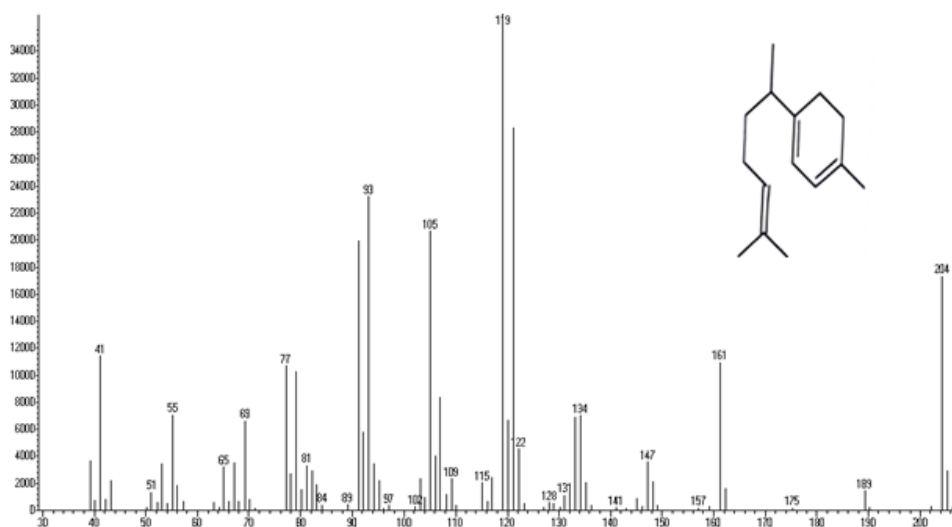


Figura 16. Espectros de los compuestos mayoritarios.  
Elaboración: El autor





#### 4.7 Pruebas antimicrobianas

La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos. El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes.<sup>23</sup> La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas; algunas especies con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos. En recientes estudios se ha demostrado la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales.<sup>45</sup>

Los aceites esenciales poseen notables propiedades antibacterianas, los estudios que se hacen hoy en día sobre la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales se han concentrado en microorganismos patógenos para el hombre; considerando la infinidad de compuestos presentes en un aceite esencial, es muy probable que su actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, diferencias estructurales en la pared celular de las bacterias gram-positivas y gram-negativas hacen variar la bioactividad de un aceite esencial.<sup>24</sup>

##### 4.7.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias

Los resultados obtenidos para las bacterias con las cuales se ha evaluado la actividad de los aceites muestran una CMI de 1000 µg/mL. Según la clasificación de Holetz,<sup>46</sup> una CMI 1000 de µg/mL se la clasifica como una actividad muy débil o nula, de modo que podemos mencionar que los aceites evaluados no tienen ninguna actividad a la concentración mencionada. No se han podido encontrar estudios de la bioactividad del aceite de la especie en estudio contra los microorganismos utilizados únicamente se ha reportado

<sup>23</sup> Cabrera C, Gómez R, Zuñiga A (2007), La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, ColombMed; Vol.: 38.: 149-158

<sup>45</sup> Carhuapoma M, López M, Roque M, Velapatiño B, Bell C, Whu D (2009), Actividad antibacteriana del Aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "RUYAQUÑA" Ciencia e Investigación; Vol.: 12(2): 83-89

<sup>24</sup> Zekaria D (2007). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos, Laboratorios Calier.

<sup>46</sup> Holetz B, Pessini L, Sanchez R, Cortez A, Nakamura V, Filho BP (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases MemInst Oswaldo Cruz. Vol.: 97: 1027-31.



estudios con extractos metanólicos que tienen actividad contra *S. aureus* y *P. vulgaris*.<sup>47</sup>

#### 4.7.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos

Hoy en día se ha venido observando un creciente desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos sintéticos por algunas especies fúngicas, este hecho se explica en parte porque la mayoría de fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, lo cual permite la aparición de clones resistentes. Por lo tanto ante este aumento de infecciones por hongos, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas; eficaces entre las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos.<sup>48</sup>

En la tabla 12 se indica los valores de CMI para los hongos evaluados, como se puede apreciar los aceites BL 113 y BL 131, inhiben el crecimiento del hongo *T. Mentagrophytes* ATCC<sup>®</sup> 28185 a una concentración de 62,5 µg/mL; a diferencia de los demás aceites que inhiben el crecimiento del mismo microorganismo a una concentración de 125 µg/mL. La CMI para *T. rubrum* ATCC<sup>®</sup> 28188 es de 31,25 µg/mL en todos los aceites. Según la clasificación de Holetz<sup>46</sup> la concentración a la que el aceite inhibe el crecimiento de los dos microorganismos evaluados es buena. Hasta hoy no se han realizado estudios sobre la bioactividad del aceite esencial de la especie en estudio con los microorganismos utilizados y estos son causantes de diversas micosis superficiales a nivel mundial,<sup>49</sup> por lo que el aceite en estudio sería una buena alternativa para la formulación de un antimicótico contra estas especies. Se ha

<sup>47</sup>Jaramillo X, Zaragoza T, Malagón O, Descripción Etnobotánica y estudio de la actividad antibacteriana, antimicótica y citotóxica de los extractos totales de cinco especies vegetales nativas de la provincia de Loja: *Baccharis genistelloides* (monte tres filos), *Baccharis obtusifolia* (chilca redonda), *Baccharis latifolia* (chilca larga), *Piper barbatum* (cordoncillo) y *Bidens andicola* (nachi), Planta de productos naturales, Universidad Técnica Particular de Loja-Ecuador, Vol:11

<sup>48</sup>KalembaD, Kunicka A, Institute of General Food Chemistry (2003), Technical University of Lodz, Poland Institute of Fermentation Technology & Microbiology, Technical University of Lodz, Poland. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils Current Medicinal Chemistry, Vol: 10, p.p. 813-829.

<sup>46</sup>Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. MemInst Oswaldo Cruz.Vol: 97, p.p.1027-31.

<sup>49</sup>Santos P, Córdova S, Roberto L, Carrillo A, Lopardo H (2010), Tinea capitis. Experiencia de 2 años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina, Rev. Iberoam Micol. Vol.: 27(2): 104-105



reportado un estudio previo sobre la bioactividad del aceite contra *A. fumigatus* (ATCC 204305) (157.4  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>50</sup>.

**Tabla 12.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos

Concentración mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Aceites	Tm	Tr
BL 111	125	31,25
BL 112	125	31,25
BL 113	62,5	31,25
BL 121	125	31,25
BL 122	125	31,25
BL 123	125	31,25
BL 131	62,5	31,25
BL 133	125	31,25

**CONTROLES**

**Itraconazol 1 mg/mL** 7,81 7,81

**Hongos evaluados:** *Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185 y *Trichophyton rubrum* ATCC ® 28188.

**Fuente:** Investigación directa  
**Elaboración:** El autor

<sup>50</sup> Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur L, Mesa A (2010), Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family, Revista Iberoamericana Micología, Vol: 27(2): 101-103.

## ***V. CONCLUSIONES***



## V. CONCLUSIONES

- ✓ El promedio de rendimiento mayoritario que se obtuvo fue para la primera recolección (0,25%), y el menor fue para la tercera recolección (0,22%).
- ✓ El promedio de humedad mayoritario fue para la primera recolección (62,67%), y la menor fue para la tercera recolección (61,33%).
- ✓ Los valores de la densidad obtenidos para los aceites esenciales referentes para cada recolección son: (0,918 - 0,949 - 0,927 g/cm<sup>3</sup>) con un promedio general de 0,931 g/ cm<sup>3</sup>.
- ✓ Los valores del índice de refracción obtenidos para los aceites esenciales para cada recolección son: (1,480 - 1,490 - 1,490) con un promedio general de 1,487.
- ✓ El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos. Un total de 28 compuestos se determinaron correspondiendo al 93,53% y al 91,08% en la columna DB-5MS y a la columna HP-INNOWAX respectivamente, 10 compuestos fueron determinados en ambas columnas.
- ✓ Los compuestos mayoritarios identificados son: limonene (38,71%); sabinene (10,28%);  $\beta$ -dihydroagarofuran (8,81%);  $\beta$ -pinene (6,99%);  $\gamma$ -curcumene (6,43%); no definido (5,36%);  $\alpha$ -pinene (5,44).
- ✓ Los resultados de las pruebas de actividad biológica contra bacterias muestran una CMI de 1000  $\mu$ g/mL; por lo que se concluye que el aceite no tiene actividad antibacteriana con las cepas evaluadas.



- ✓ La CMI para el hongo *T. mentagrophytes* en los aceites BL 113 y BL 131 es de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; a diferencia de los demás aceites que inhiben el crecimiento del mismo microorganismo a una concentración de 125  $\mu\text{g/mL}$ .
  
- ✓ La CMI para *T. rubrum* es de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  en todos los aceites.
  
- ✓ El aceite esencial de la especie en estudio presenta muy buena actividad con las cepas fúngicas evaluadas, de modo que su posible uso industrial podría ser en este campo.

## ***VI. RECOMENDACIONES***



## VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Se debe hacer estudios posteriores sobre los posibles factores externos que hacen que haya una variación en la composición química cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de una especie.
- ✓ Se debe efectuar una selección adecuada del material vegetal con el que se va a trabajar porque podría afectar a nuestros posteriores resultados tanto en el rendimiento como en el estudio de la caracterización fisicoquímica del aceite.
- ✓ Se debe realizar posteriores investigaciones sobre la posible aplicación del aceite esencial de la especie en la formulación de una forma farmacéutica contra *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* porque presenta una muy buena actividad; este hecho se justifica porque éstas especies son responsables de muchas micosis superficiales a nivel mundial.
- ✓ Realizar un estudio detallado sobre los posibles compuestos químicos del aceite esencial de la especie en estudio responsable de la actividad biológica con los hongos evaluados.
- ✓ Si se llegara a dar algún uso industrial al aceite esencial de la especie en estudio, se debe recomendar un manejo sustentable para evitar su extinción.



## ***VII. ANEXOS***



## DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

### Principio

El método para determinar la cantidad de agua presente en la muestra se basa en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada en porcentaje.

### Materiales

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

### Procedimiento

- Pesar el crisol vacío
- Pesar el crisol con 1 a 2 g de la muestra
- Llevar el crisol con la muestra a la lámpara UV a 35 °C durante 45 minutos
- Llevar la cápsula al desecador durante 15 minutos
- Pesar la cápsula nuevamente y luego someterla durante 15 minutos a la lámpara UV a 15 °C
- Llevar la cápsula al desecador durante 15 minutos y luego pesar
- Continuar con la desecación hasta que el peso sea constante

### Cálculo

$$Hm = \frac{(m1 - m2)}{(m1 - m)} * 100$$



**Dónde:**

**Hm**= porcentaje de humedad

**m**= peso de la cápsula vacía (g)

**m<sub>1</sub>**= peso de la cápsula + muestra (g)

**m<sub>2</sub>**= peso de la cápsula + muestra seca (g)



## ANEXO II

### DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL

Para la determinación del rendimiento del aceite esencial se hizo en relación al volumen obtenido del aceite y la cantidad de materia vegetal en gramos utilizada para cada destilación. El rendimiento se expresó en porcentaje, y se calculó un rendimiento exclusivo para cada destilación.

Los resultados se expresaron bajo la siguiente fórmula:

$$R = \frac{V}{P} * 100$$

**Dónde:**

**R=** rendimiento expresado en porcentaje

**V=** volumen del aceite obtenido (mL)

**P=** peso del material vegetal que se carga en el destilador (g)



## ANEXO III

### DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20 °C

#### Principio

La densidad de un aceite esencial, bien sea la densidad absoluta o la densidad relativa al agua, medida a una temperatura estándar (normalmente de 20 a 25 °C) es un parámetro fácil de obtener y que permite distinguir un aceite esencial auténtico de esencias sintéticas comunes. Un aceite esencial tiene a temperatura dada, un valor de densidad que se encuentra a un pequeño intervalo dependiendo de su procedencia, etc. La densidad se expresa en unidades de masa/volumen, generalmente g/cm<sup>51</sup>

#### Materiales

- Balanza analítica.
- 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.

#### Procedimiento

- **Preparación del picnómetro:** limpiar el picnómetro por la parte exterior y luego enjuagarlo con agua destilada, posteriormente lavamos el picnómetro con etanol y acetona, para por último pasarlo con una corriente de aire para secarlo completamente. Luego se pesa el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1 mg de precisión
- **Peso del agua destilada:** colocamos en el picnómetro agua destilada que esté a una temperatura de 20 °C, a continuación colocamos el picnómetro en el baño termostático durante 30 minutos, posteriormente ajustamos el nivel del agua hasta la marca, colocamos el tapón y secamos la parte exterior del picnómetro.

<sup>51</sup> Ortuño M, Manual Práctico de Aceites Esenciales, aromas y perfumes, Aiyana Ediciones 2006, pp.: 99-100



- Tratamos de equilibrar la temperatura en el cuarto de la balanza, y finalmente pesamos el picnómetro con 1 mg de precisión
- **Peso del aceite esencial:** para realizar el peso del aceite esencial procedemos a vaciar el picnómetro y luego lo enjuagamos y secamos como en un principio. El mismo proceso que usamos para pesar el agua destilada usamos para pesar el aceite esencial.

### Expresión de resultados

Los resultados de la densidad relativa se expresa bajo la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{(m2 - m0)}{(m1 - m0)}$$

**Dónde:**

$d_{20}^{20}$  = densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

**m0** = masa en gramos del picnómetro vacío (g)

**m1** = masa en gramos del picnómetro con agua (g)

**m2** = masa en gramos del picnómetro con aceite esencial (g)



## ANEXO IV

### DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

#### Principio

Cuando un rayo de luz pasa a través de una sustancia cambia su dirección de forma proporcional al índice de refracción de ésta, de acuerdo con la ley de Snell. El índice de refracción es una magnitud exclusiva de cada aceite esencial y cambia si éste se diluye o se mezcla con otra sustancia.<sup>52</sup>

#### Materiales

- **Refractómetro:** se utilizó un refractómetro modelo NAR-1T DESCO

#### Procedimiento

- Inicialmente se calibra el refractómetro midiendo el índice de refracción del agua
- Luego medimos el índice de refracción del aceite y se anota el resultado

---

<sup>52</sup> Ortuño M, Manual Práctico de Aceites Esenciales, aromas y perfumes, Aiyana Ediciones 2006, pp.: 99-100



## ANEXO V

### CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)

El coeficiente de variación es la relación entre la desviación típica de una muestra y su media. El coeficiente de variación permite comparar las dispersiones de dos distribuciones distintas, siempre que sus medias sean positivas. Se calcula para cada una de las distribuciones y los valores que se obtienen se comparan entre sí. La mayor dispersión corresponderá al valor del coeficiente de variación mayor.

Es una medida que se emplea fundamentalmente para:

- ✓ Comparar la variabilidad entre dos grupos de datos referidos a distintos sistemas de unidades de medida. Por ejemplo, kilogramos y centímetros.
- ✓ Comparar la variabilidad entre dos grupos de datos obtenidos por dos o más personas distintas.
- ✓ Comparar dos grupos de datos que tienen distinta media.
- ✓ Determinar si cierta media es consistente con cierta varianza.

El coeficiente de variación se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{S_X}{\bar{x}}$$

**Dónde:**

$S_X$  = desviación estándar

$\bar{x}$  = media aritmética





## ANEXO VI

### CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR ( $\sigma$ )

La desviación estándar, en un conjunto de datos es una medida de dispersión que nos indica cuánto pueden alejarse los valores respecto al promedio (media), por lo tanto es útil para buscar probabilidades de que un evento ocurra. Es la medida de dispersión más utilizada, se le llama también desviación típica. La desviación estándar siempre se calcula con respecto a la media y es un mínimo cuando se estima con respecto a este valor.

Se calcula de forma sencilla, si se conoce la varianza, por cuanto que es la raíz cuadrada positiva de esta. A la desviación se le representa por la letra minúscula griega "sigma" ( $\delta$ ) o por la letra S mayúscula, según otros analistas.

La Desviación estándar se calcula en base a la siguiente fórmula

$$\sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

#### Donde

$x_i$  = dato  $i$  que esta entre (0, n)

$\bar{x}$  = media aritmética

$n$  = numero datos

## ANEXO VII



## BIBLIOGRAFÍA DE LOS INDICES DE KOVATS REPORTADOS EN LA LITERATURA

- d) Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- e) Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998:201-211.
- f) Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51:2687-2692
- g) Chung, T.Y., Eiserich, J.P., and Shibamoto, T. 1993. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *J. Agric. Food Chem.* 41:1693-1697.
- h) Tellez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M., and Duke, S.O. 1999. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochem.* 52:1035-1040.
- i) Shatar S., Essential oil of *Ferula ferulaoides* from Western Mongolia, *Chem. Nat. Compd.* (Engl. Transl.), 2005, 41, 5, 607-608, In original 497.
- j) Jirovetz, L., G. Buchbauer, et al. (2002). *Journal of Chromatography A* 976(1-2): 265-275. [RSL200]
- k) Hamm, S., Bleton, J., and Tchaplá, A. 2004. Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples. *J. Sep. Sci.* 27:235-243.
- l) Baranauskiene R., Venskutonis, R.P., and Demyttenaere, J.C.R. 2003. Sensory and instrumental evaluation of catnip (*Nepeta cataria* L.) aroma. *J. Agric. Food Chem.* 51:3840-3848.
- m) Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H.; Jean, F.-I., *Essential oils of Baccharis salicifolia, B. latifolia and B. dracunculifolia, Phytochemistry*, 1995, 38, 2, 381-389. [all data]
- n) Schieberle, P., and Grosch, W. 1988. Identification of potent flavor compounds formed in an aqueous lemon oil/citric acid emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 36:797-800.
- p) Rychlik, M., Schieberle, P., and Grosch, W. 1998. In compilation of odour thresholds, odour qualities and retention indices of key food



odorants. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München

- q)** Encarnación K, Valarezo E, Malagón O, Morocho V, Determination of physical-chemical properties of the Poleo Essential Oil (*Mintostachys mollis* (KUNTH) GRISEB) in different phenological stages from three places of the Province of Loja by means of GC-MS and GC-FID, Chemical Engineering School-Universidad Técnica Particular de Loja, 2009.