



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

MODALIDAD PRESENCIAL

Caraterización físico – química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de una especie Asteraceae (*Chromolaena laevigata*) de la Provincia de Loja

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

AUTORA:

Flora Anabel Arias Armijos

DIRECTOR:

Ing. Benito Eduardo Valarezo Valdez

LOJA – ECUADOR

2012

CESIÓN DE DERECHOS

Yo Flora Anabel Arias Armijos declaro ser la autora de presente trabajo. Adicionalmente 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 investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....
Flora Anabel Arias Armijos

CERTIFICACION DE APROBACIÓN

Ing. Eduardo Valarezo

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UTPL

DIRECTOR DE TESIS:

Certifico:

Haber dirigido el trabajo de investigación titulado: **“CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE UNA ESPECIE ASTERÁCEAE (*Chromolaena laevigata*) DE LA PROVINCIA DE LOJA”** elaborado por la Srta. Flora Anabel Arias Armijos el mismo que ha sido revisado durante su ejecución, se ajusta a los requisitos legales exigidos por la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, marzo del 2012

.....
Ing. Eduardo Valarezo
DIRECTOR DE TESIS

AUTORIA

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

.....
Flora Anabel Arias Armijos

AGRADECIMIENTO

En primer lugar el agradecimiento más grande a Dios por acompañarme todos los días durante este largo trayecto de mi vida, por haber consolado mi corazón cuando tuve que pasar situaciones muy dolorosas, ahora gracias a él culmino un escalón más en mi vida para empezar uno nuevo.

A mis padres Julio y Lucía, ambos trabajadores incansables, gracias al apoyo tan grande que desde niña me brindaron hoy logro cumplir con uno de mis propósitos más grandes, por sus consejos tan valiosos que definitivamente me han conducido por el camino correcto, por haberme animado constantemente a seguir adelante, mil gracias a los dos porque siempre me dejaron ser libre y me permitieron tomar mis propias decisiones, porque a pesar de mis locuras me supieron querer y reprender cuando estaba equivocada, gracias por educarme y formarme como un ser integral por lo cual me siento muy orgullosa y agradecida, mil gracias a los dos por darme la oportunidad de culminar con mi carrera.

A mi hermano Antonio el mayor de todos, desde niño supiste cuidar a tus hermanas menores, siempre tratando de hacer lo mejor para nosotras, y aunque ahora te encuentres tan lejos a través de tus palabras me has alentado constantemente para seguir adelante, a mi hermana Cecibel que has compartido todos esos secretos y aventuras que solo se puede vivir entre hermanas, prácticamente hemos vivido las mismas historias, los mismos pesares y las mismas alegrías, de carácter fuerte y orgullosa pero que me ha demostrado un amor inigualable, a mi hermanito Andrés el más pequeño, alegre y alborotado de la familia, ñañito tu nos alegras cada día con tus locuras, desde que naciste eres la alegría de la casa; a los tres gracias por haberme dado fuerzas y valor cuando sentía decaer, a mi hermanita Adriana de los Angeles aunque hoy no estas aquí se que desde el cielo junto con Dios has cuidado y guiado a tu familia por el sendero correcto.

A mis dos abuelitas Lolita y Rosita por sus sabios consejos, por su amor tan puro y bueno que me brindan cuando estan conmigo. A mis tios, tias y primos que han sabido alentarme para continuar con mis propositos.

A mis amigas Alejandra, Diana, María, Karito y Mony por los buenos y malos momentos compartidos, por los animos que me han transmitido durante todo este tiempo, por la amistad tan sincera que me brindaron y por haber estado conmigo en situaciones tan difíciles que me toco vivir, gracias por todo niñas las quiero mucho.

Al Ing. Eduardo Valarezo en calidad de Director de tesis por compartirme su experiencia y conocimientos, y sobre todo por haber confiado en mi para llevar a cabo la realizacion de este proyecto. A todo el personal del Instituto de Quimica Aplicada por haberme dado la oportunidad y brindarme todos los medios para realizar mi proyecto de tesis.

Flora Anabel Arias Armijos

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a Dios por estar a mi lado siempre, por darme valor y brindarme la fortaleza que tanto necesito, por haberme regalado a una familia tan maravillosa.

A mis padres que me dieron la oportunidad de tener una carrera para mi futuro, por el inmenso apoyo que me dieron, por haber confiado en mi, porque siempre me dieron aliento para seguir luchando a pesar de mis temores. A mis hermanos que adoro tanto, por que a pesar de nuestras diferencias siempre creyeron en mi. Gracias por haber estado a mi lado cuando sentia que ya no podia mas.

Flora Anabel Arias Armijos

ÍNDICE DE CONTENIDO

CESIÓN DE DERECHOS	i
CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORÍA	v
ÍNDICE	vi
RESUMEN	xiii
ARTICULO	xiv

I. PRESENTACIÓN DE FIN , PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1. Fin del proyecto	2
1.2. Propósito del proyecto	2
1.3. Componentes del proyecto	3
1.4. Hipótesis	3
1.5. Diseño Estadístico	3

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. INTRODUCCIÓN	5
2.2. ANTECEDENTES	15

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	19
3.2. DESTILACION DEL ACEITE ESENCIAL	20
3.2.1. Determinación de la Humedad	22
3.2.2. Determinación del Rendimiento	23
3.3. DETERMINACION DE PROPIEDADES FISICAS	23

3.3.1. Densidad Relativa	23
3.3.2. Índice de Refracción	24
3.4 DETERMINACION DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL	25
3.4.1. Cromatografía de Gases (CG)	26
3.4.2. Equipo	26
3.4.3. Características de las columnas capilares	27
3.4.4. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS)	27
3.4.5. Preparación de la muestra	27
3.4.6. Parámetros operacionales en la columna DB-5 MS	29
3.4.7. Parámetros operacionales en la columna HP-INOWAX	30
3.4.8. Identificación cualitativa de los componentes químicos	31
3.4.9. Interpretación de los Cromatogramas	32
3.4.10. Corrida cromatográfica por CG-FID en la columna capilar DB-5	33
3.4.11. Parámetros operacionales en la columna DB-5 (CG-FID)	34
3.4.12. Parámetros operacionales en la columna HP-INOWAX (CG-FID)	35
3.5. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA	36
3.5.1. Microorganismos de Prueba	36
3.5.2. Preparación de Aceite Esencial	36
3.5.3. Preparación de los Medios de Cultivo	37

3.5.3.1. Bacterias	37
3.5.3.1.1. Caldo de Cultivo Muller Hinton	37
3.5.3.1.2. Cultivo Overnight	37
3.5.3.1.3. Preparación de la Suspensión de los Inóculos	38
3.5.3.2. Hongos	39
3.5.3.2.1. Caldo Saburo	39
3.5.3.2.2. Preparación de la Suspensión de los Inóculos	40
3.5.4. Concentración Mínima Inhibitoria	40
3.5.4.1. CMI Antibacteriano	41
3.5.4.2. CMI Antifúngico	42
3.5.5. Interpretación de los Resultados	42
IV. RESULTADOS Y ANALISIS	
4.1. Determinación de Humedad	46
4.2. Rendimiento del Aceite Esencial	46
4.3. PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL	47
4.3.1. Densidad	47
4.3.2. Índice de Refracción	48
4.4. COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Chromolaena laevigata</i>	48
4.4.1. Compuestos Identificados en DB-5 MS y HP-INOWAX	51

4.5. Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB-5; HP-INOWAX (MS) y DB-5; HP-INOWAX (FID)	54
4.6. Espectros de los compuestos más representativos	61
4.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL	65
4.7.1. Concentración Mínima Inhibitoria de Bacterias	65
4.7.2. Concentración Mínima Inhibitoria de Hongos	66
V. CONCLUSIONES	69
VI. RECOMENDACIONES	72
VII. ANEXOS	74

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de las columnas capilares	27
Tabla 2. Humedad media de <i>Chromolaena laevigata</i> (%)	44
Tabla 3. Rendimiento en % (p/v) del aceite esencial de <i>Chromolaena Laevigata</i>	44
Tabla 4. Densidad media del aceite esencial de <i>Chromolaena laevigata</i> (gr/cm ³)	46
Tabla 5. Índice de Refracción medio de los nueve aceite esencial de <i>Chromolaena laevigata</i> (n ₂₀)	46
Tabla 6. Composición Química de <i>Chromolaena laevigata</i>	49
Tabla 7. Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB-5; HP-INOWAX (MS) y DB-5; HP-INOWAX (FID)	55
Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente a las bacterias de prueba	65
Tabla 9. Concentraciones de inhibición	66
Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente <i>Trichuphytum rubrum</i>	67
Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente <i>Trichophytom Mentagrophytes</i>	67

Lista de Figuras

Figura 1. Diseño experimental	3
Figura 2. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	6
Figura 3. <i>Proteus vulgaris</i>	7
Figura 4. <i>Escherichia coli</i>	8
Figura 5. <i>Salmonella Tiphymurium</i>	8
Figura 6. <i>Enterococcus faecalis</i>	9
Figura 7. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Figura 8. <i>Trichophyton rubrum</i>	10
Figura 9. <i>Chromolaena laevigata</i>	16
Figura 10. Esquema de los análisis realizado	18
Figura 11. Área de estudio	19
Figura 12. Proceso de destilación	20
Figura 13. Materia vegetal antes del proceso de destilación	21
Figura 14. Recolección del aceite esencial en el florentino	21
Figura 15. Recolección de aceite esencial.	22
Figura 16. Humedad	22
Figura 17. Termómetro y Picnómetro, material principal para determinar la densidad	24
Figura 18. Determinación de la Densidad	24
Figura 19. Determinación del Índice de Refracción	25
Figura 20. Cromatógrafo de Gases	27
Figura 21. Preparación de la muestra	28
Figura 22. Muestra ubicada para la Inyección cromatográfica	28
Figura 23. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna DB-5 MS	29
Figura 24. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna HP-INOWAX	30
Figura 25. Cromatograma	32
Figura 26. Parámetros operacionales en la columna DB-5 (CG-FID)	34
Figura 27. Parámetros operacionales en la columna HP-INOWAX (CG-FID)	35
Figura 28. Cultivo Overnight	38

Figura 29. Medios de cultivo	39
Figura 30. Cabina de flujo laminar	40
Figura 31. Placa TC ₉₆	41
Figura 32. Compuestos mayoritarios en la columna DB-5 MS	47
Figura 33. Cromatogramas del aceite esencial de <i>Chromolaena laevigata</i> en la columna DB-5 MS.	58
Figura 34. Cromatogramas de los aceites esenciales obtenidos en DB-5 MS: a) Primera recolección, b) Segunda recolección, c) Tercera recolección.	59
Figura 35. Cromatogramas de los nueve aceites esenciales obtenidos en las tres recolecciones realizadas.	61

Lista de Anexos

Anexo I. Determinación de Humedad	74
Anexo II. Cálculo de Rendimiento	75
Anexo III. Determinación de la Densidad Relativa A 20 °C	76
Anexo IV. Determinación del Índice de Refracción	78
Anexo V. Referencias bibliográficas (Índice de Kovats)	80

RESUMEN

En el presente proyecto se muestra los datos obtenidos de acuerdo al estudio realizado en el aceite esencial de una especie Asteraceae (*Chromolaena laevigata*).

El AE se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor, se determinó propiedades físicas como densidad e índice de refracción.

Se realizó la identificación de constituyentes químicos presentes en el AE mediante un Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N, acoplado al Espectrómetro de Masas 5973. Se identificaron 25 compuestos en la columna DB5-MS, los mismos que representan el 95.99%, los compuestos mayoritarios son: Chromolaenin (46.84%), Germacrene D (15,37%), γ - selinene (11,52%), γ - elemene (4,3%), limonene (3,94%), α - pinene (2,85%).

Para evaluar la susceptibilidad bacteriana se utilizó: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®] 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 9997, *Proteus vulgaris* ATCC[®] 8427, *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 y *Salmonella Tiphymurium* LT2; *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923; para evaluar la susceptibilidad fúngica se utilizó: *Trichophyton rubrum* ATCC[®] 28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC[®] 28185 y *Aspergillus niger*. El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* fue inactivo frente a bacterias, mientras que para *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* presento actividad.



**PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE
BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF A KIND ASTERACEAE
(*Chromolaena laevigata*) IN THE PROVINCE OF LOJA**

Anabel Arias¹; Eduardo Valarezo²; Vladimir Morocho²

¹Escuela de Bioquímica y Farmacia - Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano alto s/n, 11 01 608, Loja - Ecuador.

²Instituto de Química Aplicada - Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano alto s/n, 11 01 608, Loja - Ecuador.

AUTHOR ADDRESS: faarias@utpl.edu.ec, bevalarezo@utpl.edu.ec

ABSTRACT: *Chromolaena laevigata* was collected in Gonzanamá; the essential oil of this species was extracted by steam distillation and then analyzed by GC-FID and GC-MS. The compounds present in the essential oil were identified by Kovats index and mass spectrum. 25 compounds were identified in the column DB5-MS, among the major compounds are: Chromolaenin (46.84%), germacrene D (15.37%), γ - selinene (11.52%), γ - elemene (4.3 %), limonene (3.94%), α -pinene (2.85%), δ - cadinene (1.48%), β - caryophyllene (1.31%), β - pinene (1.18%), β - bisabolene (1.15%). The essential oil did not present inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC ® 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC ® 9997), *Proteus vulgaris* (ATCC ® 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella Tiphymurium* (LT2), *Enterococcus faecalis* (ATCC ® 29212) and *Staphylococcus aureus* (ATCC ® 25923), while for *Trichophyton rubrum* (ATCC ® 28188) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC ® 28185) if present inhibitory activity.

Key words: *Chromolaena laevigata*, Asteraceae.

INTRODUCTION

The use of certain plants, specific therapeutic purpose shows that these compounds possess healing properties of great importance among these is to quote the great plants belonging to the Asteraceae plant family (formerly called Compositae), this is one of the most distributed the world, although their greatest diversity is found in the Americas, characterized by its diversity of plant types, with about 20000 especies¹

Chromolaena laevigata is a shrub that reaches a height of 2.5 m, has traditionally been used to treat

infecciosas and to heal some illnesses and diseases, inflammation swelling, tumors, toothache, intestinal diseases, influenza, itching, and to fight leprosy, part of the plant used in traditional medicine are the leaves, which may be prepared in alcohol or by cooking in water¹. It is known as sweet blackberry, azotacaballo, cambará or comrade, pain-killer, sage and doc¹.

This paper analyzes the chemical composition of essential oil from *Chromolaena laevigata* obtained by steam distillation, essential oils or essences are compounds of plant metabolism; most of them are volatile



and are responsible for the smell of vegetal².

Many applications of aromatic plants, and particularly of its essential oils are related to the presence of biologically active substances, so that the identification and quantification of these is a prerequisite for proper use in its various aplicaciones³.

And extract the oil from different plants have been used for a variety of purposes for thousands of year⁴. That is why the importance of studies of plant essential oil as an alternative body to fight pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Plant material was collected in state foliage in the canton Gonzanamá (Loja, Ecuador); three collections were held with a range of 15 days each.

Essential Oil Extraction

Essential oil was obtained by steam distillation using Clevenger-type apparatus, distillation process was performed out for 3 hours, after which time the amount of essential oil obtained is invaluable.

Determination of Properties

The essential oil density was determined according to the standard ANFOR NF T 75-111, and the refraction index was determined according to the standard ANFOR NF T 75-112, to start the process it is important that pignometro is calibrated.

Gas chromatography

The identification of the chemical components of essential oil from *Chromolaena laevigata* was performed by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS, and attached a flame ionization detector GC-FID and for this we used a gas chromatograph Agilent 6890N series coupled to a mass spectrometer Agilent 5973 inert series, equipped with a Chemstation data D.01.00 MSD-SP1, has an automatic injector split / splitless 7683 series, and two capillary columns. The identification of compounds present in the essential oil of *Chromolaena laevigata* was based on comparing the Kovats index of each of the compounds present in the AE, additionally identification is performed by mass spectral analysis of each compounds identified in the team.

Evaluation of Biological Activity

The method used to evaluate the biological activity to measure the susceptibility of microorganisms to antimicrobial and antifungal agents by determining the potency of the substance.

CMI was conducted to determine what concentration an inhibition of both bacteria and fungi. This prepared the necessary means for fungi and bacteria, the entire procedure was performed in triplicate in order to obtain results with greater reliability.



RESULTS AND DISCUSSION

Table 4 shows that the average density of the essential oil is 0.9568 g/cm³.

Table 4. Average density of essential oil of *Chromolaena laevigata* (g/cm³)

Code	\bar{X} gr/cm ³	Prom. Total gr/cm ³
Ch1	0,9604	
Ch2	0,9516	0,9568
Ch3	0,9584	

CH: *Chromolaena laevigata*; 1 First Collection; 2 Second Collection; 3 Third Collection; \bar{X} : Average density for each collection.

Source: Direct Research
Preparation: the Author

The refractive index are shown in Table 5, corresponding to the same values of the three essential oils obtained from each collection made. The average refractive index of essential oils is 1.5114 n²⁰.

Table 5. Refractive index through the nine essential oil from *Chromolaena laevigata* (n²⁰)

Code	Index refraction	\bar{X}
CH1	1,5133	
CH2	1,5106	1,5114
CH3	1,5103	

CH: *Chromolaena laevigata*; 1 First Collection; 2 Second Collection; 3 Third Collection.
 \bar{X} : for each collection.

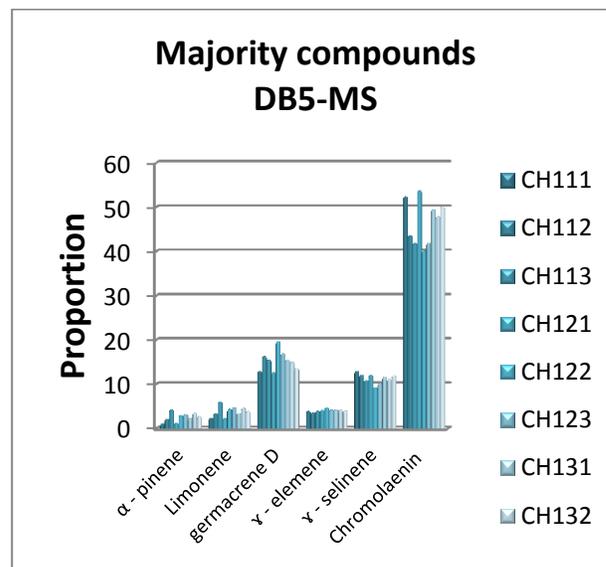
Source: Direct Research
Preparation: the Author

The qualitative identification of compounds was performed based on the Kovats index and mass spectrum to the library Wiley 7N it gives us the

information required to initiate the identification of individual compounds in the essential oil.

In the essential oil from *Chromolaena laevigata* from Gonzanamá, 25 compounds were identified in the column DB5-MS, they represent 96.5%, based on all the compounds identified in the essential oil of the three collections we can deduce that major compounds present in all essential oils are: Chromolaenin (46.84%), Germacrene D (15,37%), γ - selinene (11,52%), γ -elemene (4,3%), limonene (3,94%), α -pinene (2,85%).

In Figure 33 shows the average percentages of the major compounds obtained in the three collections.



Source: Direct Research
Preparation: the Author



ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

No	Compounds	DB5-MS ^a								HPINOWAX - MS ^e							
		IK-C ^b	IK-R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV	IK-C ^b	IK - R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV
16	α - muurolene	1490	1500 ^g	0,23	0,1	0,17	0,09	0,56	1711	1727 ^t	0,37	0,40	0,36	0,38	0,02	0,06
17	β - bisabolene	1501	1505 ^g	1,56	1,22	0,66	1,15	0,45	0,40
18	β - gurjunene	1503	1457 ^l	0,15	0,28	0,22	0,09	0,43
19	δ - cadinene	1509	1523 ^h	1,5	1,58	1,35	1,48	0,12	0,08	1743	1749 ^u	3,30	3,61	3,45	3,45	0,15	0,04
20	β - sesquiphellandrene	1516	1522 ^g	0,25	0,29	0,27	0,03	0,10	1759	1780 ^q	0,52	0,58	0,36	0,49	0,12	0,24
21	α - cis copaene 8ol	1554	1595 ^m	0,68	0,45	0,64	0,59	0,12	0,21
22	Spathulenol	1567	1578 ^g	1,02	0,37	0,12	0,50	0,46	0,92
23	γ - selinene	1585	1535 ⁿ	12	10,55	11,55	11,37	0,74	0,07
24	Chromolaenin	1725	1726 ^o	46,01	45,3	49,21	46,84	2,08	0,04	2358	2373 ^o	19,96	17,56	16,94	18,15	1,60	0,09
25	2-Methoxy-4methyl-4-phenyl - 2,5-cyclohexadien- 1-one	1761	1729 ^p	0,34	0,39	0,37	0,04	0,10
26	Alloaromadendrene ^e	1626	1662 ^t	0,31	0,45	0,38	0,10	0,26
27	γ - muurolene	1674	1684 ^q	0,82	0,88	0,71	0,81	0,09	0,11
28	α - himachalene	1705	1649 ^t	1,30	0,76	1,03	0,38	0,37
29	bicyclgermacrene	1717	1731 ⁿ	6,87	7,94	7,42	7,41	0,54	0,07
30	caryophyllene oxide	1962	1999 ^q	0,36	0,57	0,47	0,15	0,31
31	Viridiflorol	2072	2102 ^q	18,35	15,50	18,13	17,32	1,59	0,09
32	No Identificado	2128	2,98	3,44	3,21	0,33	0,10



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

No	Compounds	DB5-MS ^a								HPINOWAX - MS ^e							
		IK-C ^b	IK-R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV	IK-C ^b	IK - R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV
33	α - cadinol	2160	2211^q	0,59	0,73	0,97	0,76	0,19	0,25
34	t - muurolol	2220	2178^p	0,97	0,83	0,94	0,91	0,07	0,08
35	16 Kaurene	2341	2310^w	0,58	0,89	0,74	0,22	0,29
36	No Identificado	2712	1,58	0,72	1,15	0,61	0,53
		*TOTAL								*TOTAL							
		95,99								98,05							

a = Compounds arranged in order of elution on DB5-MS column

b = Kovats index determined experimentally.

c = Kovats index according to the reference literature.

d = Average % calculated on the basis of peak area reported in the column DB5-MS and HP-INOWAX respectively.

e = compounds identified only on HP-INOWAX column

***** = Sum of the relative percentage of the compounds identified in both columns

X = Average

σ = Standard Deviation

CV = coefficient of variation

IK REF, Literature: ^rref 1, ^qref 2, ^href 3, ^lref 4, ^jref 5, ^kref 6, ⁱref 7, ^mref 8, ⁿref 9, ^oref 10, ^pref 11, ^oref 12, ^rref 13, ^sref 14, ^tref 15, ^uref 16, ^vref 17, ^wref 18, ^wref 19 (anexo V)



Bioactivity by testing conducted to evaluate the susceptibility of bacteria was determined that the essential oil of the species *Chromolaena laevigata* presented no activity against any of the bacteria used for the analysis performed, all bacteria had a CMI greater than 1000 ug / ml, so we can say that it is likely that the essential oil from *Chromolaena laevigata* at higher concentrations inhibit bacterial growth if which is not relevant for our study since it must be noted that very high concentrations are at risk of be toxic when they are used.

Comparing the results with studies of the extract of the same species can confirm that *Chromolaena laevigata* shows no activity against the bacteria that was submitted as are *Echericha coli* and *Pseudomona aeruginosa* and other bacteria that were not part of our study, while for *Staphylococcus aureus* biológica activity¹ if present, these variables may be initially to be used in this study the extract of the dried leaves of the species which may be an important factor in the presence or absence of on top of that in the extracts were identified some compounds that were not identified in the essential oil, which is why this variability may be due to the conditions and the same starting material used for testing were treated very differently.

On the other hand, according to a study of a plant of the same genus *Chromolaena odorata* was determined for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* had an MIC greater than 1000 mg / mL, results show total respect to the results obtained in our study. As for the results of Antifungal CMI was determined that the essential oil from *Chromolaena laevigata* if inhibited the growth of

Trichophyton mentagrophytes and *Trichophyton rubrum* as shown in Table 9 and 10 respectively.

Table 9. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil against *Trichophytum rubrum*.

CMI (ug/ml)		
<i>Trichophytun rubrum</i>		
	Code	inhibition
1st. Recollection: 3 distillations	CH111	125
	CH112	125
	CH113	125
2nd. Recollection: 3 distillations	CH121	250
	CH122	125
	CH123	125
3rd. Recollection: 3 distillations	CH131	125
	CH132	125
	CH133	125

CH: *Chromolaena laevigata*; 1^{er} N^o of each code is the point of collection; 2^{do} N^o is the collection and 3^{er} N^o is the detillation.

Table 10. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil against *Trichophytom Mentagrophytes*.

CMI (ug/ml)		
<i>Trichophyton Mentagrophytes</i>		
	Code	inhibition
1st. Recollection: 3 distillations	CH111	250
	CH112	250
	CH113	250
2nd. Recollection: 3 distillations	CH121	250
	CH122	250
	CH123	250
3rd. Recollection: 3 distillations	CH131	250
	CH132	125
	CH133	250

CH: *Chromolaena laevigata*; 1^{er} N^o of each code is the point of collection; 2^{do} N^o is the collection and 3^{er} N^o is the detillation.

According to studies conducted with a species of the genus *Chromolaena odorata*⁵ was determined that the species if you have antifungal activity against *Aspergillus niger* (MIC = 78 mg / ml), results can be attributed to that the study



was conducted with other species and perhaps under other conditions of extraction of essential oil and other compounds found himself as the geijerene and pregeijerene (7.5%) among other variations that could be responsible for such variables.

CONCLUSION

We identified a total of 25 compounds of which 16 were identified in both columns, being the main compound the chromolaenin with a 46.84%; essential oil from *Chromolaena laevigata* no activity against any of the bacteria tested, while for *Trichophytum rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* present inhibition.

ACKNOWLEDGMENT

By Eduardo Valarezo as Director of thesis for sharing your experience and knowledge, and especially for having trusted me to carry out the realization of this project. All staff of the Institute of Applied Chemistry for giving me the opportunity and giving me all facilities for my thesis project.

REFERENCES

1. Flores, M., D'armas, H., Herrera, H., *Identification of some chemical constituents from the Chromolaena laevigata leaves by gas chromatography-mass spectrometric*. Part II. Ciencia, 2007, vol.15, no.3, p.421-432.
2. Moreno, S., Crecente, O., Ortiz, S., Quintero, M., *Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de Simsia pubescens Triana*, 2009, 745-747: 745.
3. Llorens, J., Castell, V., Pascual, R., *Composición del aceite esencial de Artemisia absinthium L procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales*, 2008, pags. 61-84.
4. Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G., Estrada, E., *Synergic effect of Origanum vulgare essential oil to Gentamicin on Escherichia coli isolates*, CIMEL 2008 Vol. 13, Nº 2.
5. Owolabi M, Ogundajo A, Yusuf K, Lajide L, Villanueva H, Tuten J, Setzer W., *Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of Chromolaena odorata from Nigeria.*, (2010) 72-78.

Capítulo I.
Presentación del
Fin, Propósito y Componentes
del Proyecto



I. PRESENTACION DE FIN, PROPOSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin del Proyecto

La investigación de *Chromolaena laevigata* perteneciente a la familia Asteraceae contribuirá con el estudio de la flora aromática de la región sur del Ecuador que se está llevando a cabo en el Instituto de Química Aplicada.

Contribuir estableciendo los rendimientos reales en cuanto a aceite esencial que presenta dicha especie, determinar las propiedades físico – químicas las cuales nos permitirán establecer condiciones de uso, así como también determinar los compuestos mayoritarios y su importancia a nivel industrial.

De la misma manera dicho proyecto permitirá evaluar la actividad biológica del aceite esencial de la especie *Chromolaena laevigata* frente a cepas patógenas, con lo cual se aportara de gran manera dejando un precedente de las propiedades presentes en dicha especie.

1.2 Propósito del Proyecto

Realizar la CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE UNA ESPECIE ASTERÁCEAE (*Chromolaena laevigata*) DE LA PROVINCIA DE LOJA, con el fin de obtener nuevas fuentes de anti fúngicos y antibacterianos naturales no tóxicos para el hombre que eviten el crecimiento y proliferación de algunos hongos y bacterias que están causando fuertes afecciones a nivel mundial.



1.3 Componentes del Proyecto

Lo esperado del presente proyecto es determinar con exactitud los componentes químicos presentes en la especie en estudio así como también establecer la presencia de actividad biológica en concentraciones bajas las cuales permitirán que dicha especie sea usada en la elaboración de nuevos fitofármacos.

1.4 Hipótesis del Proyecto

1.4.1 Inhibición del crecimiento bacteriano y fúngico

H0: El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* Si inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico.

H1: El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* No inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico.

1.5 Diseño Estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado a cada uno de los aceites obtenidos, posteriormente realizó un análisis estadístico a todos los resultados obtenidos de los nueve aceites esenciales de *Chromolaena laevigata* con el fin de establecer resultados más confiables.

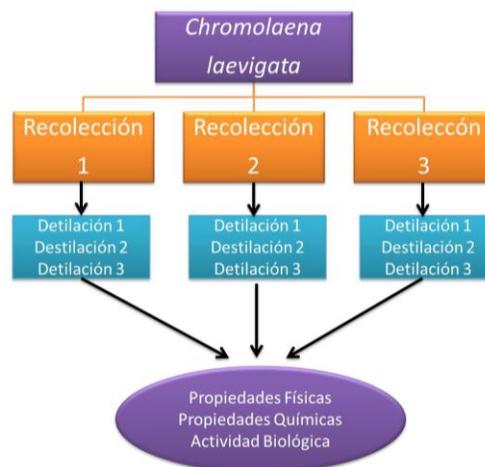


Figura 1. Diseño experimental
Elaboración: La Autora

Capítulo II.

Introducción y Antecedentes



I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte en el mundo, tanto en adultos como en niños. Más de 13 millones de personas mueren anualmente por enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, tales como la malaria, la tuberculosis, el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida), la fiebre hemorrágica producida por el virus Ébola, el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), la infección por el virus del Nilo occidental y el dengue. Solo tres de estas infecciones (el sida, la tuberculosis y la malaria) cobraron 5,7 millones de vidas durante el año 2001, la mayor parte de ellas en países en desarrollo¹.

La permanencia de las enfermedades infecciosas causadas por cepas patógenas bacterianas resistentes es un problema de salud a nivel mundial². Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos². Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas y el tiempo de tratamiento³.

Los microorganismos representan, aproximadamente, el 60% de la biomasa del planeta Tierra y se estima en más de 10^{30} el número de bacterias en la biosfera. Así, los microorganismos han desarrollado múltiples estrategias para evolucionar a lo largo de millones de años y poder adaptarse a diferentes nichos y a cambios en los ecosistemas⁴.

¹ Ridel, G.M., I.R. Luis, and J. Teja, *Emerging and reemerging diseases: a health problem in the Americas*. Revista Panamericana de Salud Pública. 2004. 15: p. 285-287.

² Tte. Cor. Fernández, F., M.L.J., Dra. Ponce L, y Dra. Machado C, *Resistencia Bacteriana*. Rev Cubana Med Milit, 2003.

³ Luján, C.G., *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de "Staphylococcus aureus" con resistencia múltiple*. 2006.

⁴ Garcia, F., *Emergent infectious diseases: interaction between the microbial world and human societies*. 2008, vol 50 (3).



En el mes de marzo del 2006 la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) publicó una “lista de choque” para enfatizar sobre la importancia de seis gérmenes de alto riesgo no sólo por su virulencia sino por ser resistentes a la mayoría de antibióticos que disponemos. Estos microorganismos multiresistentes son el *Staphylococcus áureus* resistente a oxacilina, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus spp*, *Enterococcus faecium* y *Pseudomonas aeruginosa*⁵.

Entre los organismos patógenos causantes de múltiples enfermedades infecciosas y que se evaluarán en la presente investigación se encuentran bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, así como 2 organismos fúngicos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Pseudomona aeruginosa (fig.2) se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales, puede colonizar a los humanos normales en los cuales es un saprofito.



Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*⁶

Causa enfermedad en huéspedes humanos con defensas anormales. *P. aeruginosa* es un bacilo dotado de motilidad que mide casi 0,6 x 2 µm. Es gramnegativo y se encuentra como bacteria única, en pares y ocasionalmente en

⁵ Paz, E., Ponce, D., Ramírez, R., *Antimicrobial resistance in an intensive care unit current trends: Critical Care Department, Intensive Care Service of Guillermo Almenara-Inrigoyen National Hospital, EsSalud, Lima. Perú, 2004-2006*,(2008), 25(3).

⁶ Abad, X., *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper ecuadorensis (Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante), Fuschia ayavacensis (Pena-Pena), Niphogeton dissecta (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial.* 2009.



cadena corta. *P. aeruginosa* es aerobio obligatorio que crece fácilmente sobre muchos tipos de medio de cultivo, crece bien de 37° C a 42° C. *P. aeruginosa* solo es patógena cuando se introduce en regiones desprovistas de defensa normal, por ejemplo, mucosas y piel lesionada por daño tisular directo, produce infección en heridas y quemaduras, formando pus color azul verdoso; cuando se introduce por punción lumbar causa meningitis, e infección del aparato urinario⁷.

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un problema cada vez creciente en salud pública. Entre estos, ***Klebsiella pneumoniae*** es un representante importante no sólo por su frecuencia como causa de infecciones asociadas al cuidado de la salud y de la comunidad, sino por los mecanismos patogénicos que posee, como la capacidad de producir cápsula, la presencia de estructuras especializadas que le permiten adherirse a las células del hospedero (pilis), y de sideróforos que le permiten obtener el hierro necesario para su desarrollo⁸.

Se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de casi el 5% de las

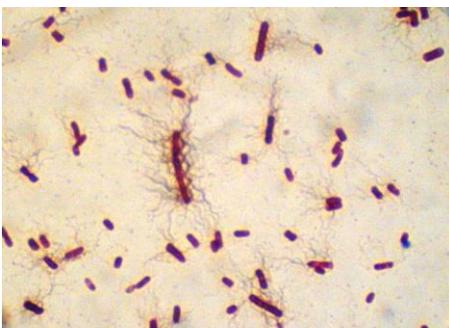


Figura 3. *Proteus vulgaris*⁶

personas sanas, produce aproximadamente el 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación necrosante hemorrágica extensa del pulmón. En ocasiones produce infecciones del aparato urinario y bacteremia a partir de las infecciones focales en pacientes debilitados⁷.

⁷ Brooks, G., Butel, J., MORSE, S., *Microbiología Médica*, 2005, 18a ed., México.

⁸ López, J., Echeverri, L., K. *PNEUMONIAE: ¿la nueva "superbacteria"?* *Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia*. 2010, vol 23.

⁷ Brooks, G., Butel, J., MORSE, S., *Microbiología Médica*, 2005, 18a ed., México.



Las especies de ***Proteus vulgaris*** producen infecciones en humanos solo cuando la bacteria abandona el intestino⁷. Se les encuentra en infecciones del aparato urinario y producen bacteremia, neumonía e infecciones focales en pacientes debilitados o en quienes son tratados con infusiones intravenosas. *Proteus vulgaris* (fig. 3) es un importante patógeno nosocomial⁷.

Escherichia coli (fig.4) es una bacteria se transmite por: consumo de alimentos mal cocidos o crudos, ingestión de agua contaminada, contacto persona a persona, contacto con materia fecal de animales⁹.



Figura 4. *Escherichia coli*⁶

El reservorio de esta bacteria es la materia fecal de animales (bovinos, porcinos, etc.) y agua contaminada con heces⁹.

Salmonella Tiphymurium (fig.5) las salmonelas son bacilos dotados de motilidad mediante flagelos peritricos, con frecuencia son patógenas para humanos o animales cuando se adquieren por vía oral. Se transmiten a humanos a partir de animales y productos de estos, y causan enteritis, infección sistémica y fiebre entérica⁷.

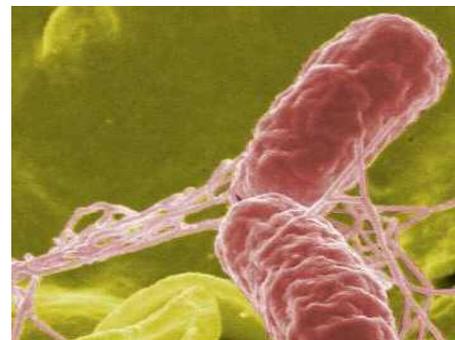


Figura 5. *Salmonella Tiphymurium*⁶

⁹ Michanics, S., *Escherichia coli* O157:H7, La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne, Año IX, 2003.

⁶ Abad, X., *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper ecuadorensis (Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante), Fuschia ayavacensis (Pena-Pena), Niphogeton dissecta (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial.* 2009.

⁹ Michanics, S., *Escherichia coli* O157:H7, La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne, Año IX, 2003.

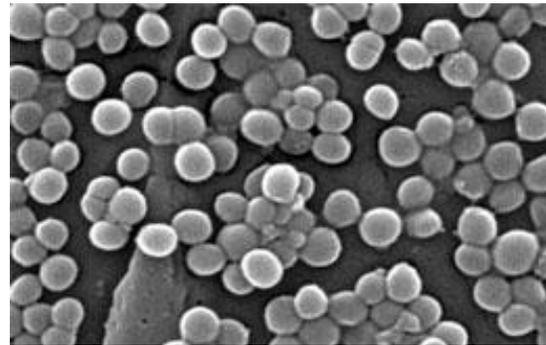
⁷ Brooks, G., Butel, J., MORSE, S., *Microbiología Médica*, 2005, 18a ed., México.

Figura 6. *Enterococcus faecalis*⁶

Enterococcus faecalis (fig.6) existen al menos de 12 especies de enterococos. El *Enterococcus faecalis* es el más común y causa de 85 a 90% de las infecciones enterocócicas. Los enterococos se consideran una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales sobre todo en unidades de cuidado intensivo, los

enterococos se transmiten de un paciente a otro principalmente por las manos del personal del hospital, algunos de ellos pueden portar el enterococo en el conducto gastrointestinal. Los enterococos pueden causar meningitis y bacteremia en los neonatos; en los adultos pueden causar endocarditis⁷.

Staphylococcus aureus (fig.7) es un patógeno importante para los humanos, casi toda persona padece algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales. El *S. aureus* son

Figura 7. *Staphylococcus aureus*⁶

células esféricas de casi 1 mm de diámetro dispuestos en grupos irregulares, desprovistos de motilidad y no forman esporas⁷.

⁶ Abad, X., *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: Piper ecuadorensis (Matico), Lepechinia mutica Benth (Turuyante), Fuschia ayavacensis (Pena-Pena), Niphogeton dissecta (Culantrillo del cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración Mínima Inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial.* 2009.

⁷ Brooks, G., Butel, J., MORSE, S., *Microbiología Médica*, 2005, 18a ed., México.



Trichophyton rubrum (fig.8) *T. rubrum* emergió en el sudeste asiático y se convirtió en una especie cosmopolita tras la Segunda Guerra Mundial, siendo en la actualidad la especie de dermatofito más frecuente en Europa y Estados Unidos¹⁰.

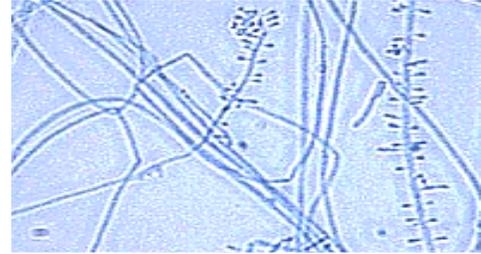


Figura 8. *Trichophyton rubrum*
Fuente:http://www.medmicro.wisc.edu/resources/imagelib/mycology/images/trichophyton_rubrum.gif

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; 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. *Trichophyton rubrum* es el agente causal más frecuente en tiñas del cuerpo, de la ingle, de los pies, así como de onicomicosis¹¹.

Es por ello la importancia de realizar estudios del aceite esencial de plantas como una alternativa para combatir contra organismo patógenos. El aceite y extracto de distintas plantas han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años¹².

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales nació con el hombre, hasta el siglo XVIII se conocieron las propiedades curativas de las plantas, su

¹⁰ Gómez, E., Crespo-Erchiga, V., Samaniego, E., Del Boz, J., Martínez, S., *Tinea cruris (glutealis) de importación por Trichophyton rubrum var. raubitschekii en España*. Rev Iberoam Micol 2008, 25: 250-253.

¹¹ Hernández, A., Carbajal, P., Fernández, R., Arenas, R., *Dermatofitosis por Trichophyton rubrum Experiencia de 10 años en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México*. Rev Iberoam Micol 2007; 24: 122-124.

¹² Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G., Estrada, E., *Synergic effect of Origanum vulgare essential oil to Gentamicin on Escherichia coli isolates*, CIMEL 2008 Vol. 13, Nº 2.



efecto sobre el organismo y su modo de aplicación, desconociendo en muchos de los casos la composición y caracterización de principios activos¹³.

La gran mayoría de los principios activos se han obtenido sintéticamente en laboratorios, para su posterior uso en la preparación de medicamentos químicos. Con el paso de los años el consumo de medicamentos sintéticos se incrementó, desplazando cada vez más el uso directo de plantas medicinales alejándose así de la medicina tradicional¹³.

Las plantas aromáticas son usadas directamente en la industria de alimentos, como agentes saborizantes y antioxidantes. En medicina humana y veterinaria, como componentes de formulaciones farmacéuticas. En agricultura, como pesticidas y repelentes de insectos y como agentes antibacterianos y antifúngicos¹⁴. En la industria cosmética, como perfumes y aromatizantes¹⁵.

En las últimas cuatro décadas se han realizado innumerables estudios sobre sustancias con actividad antimicrobiana, provenientes de plantas superiores con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos¹⁶.

¹³ Lizcano, A., Vergara, J., *Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*, 2008, 131: p22.

¹⁴ Bandoni, A., *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores*, 2002, Corporación Iberoamericana CYTED, Segunda Edición, Argentina.

¹⁵ Llorens, J., Castell, V., Pascual, R., *Composición del aceite esencial de Artemisia absinthium L procedente del término municipal de Calamocho (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales*, 2008, pags. 61-84.

¹⁶ Acosta, M., Gonzalez, M., Araque, M., Velazco, E., Khouri, N., Rojas, L., Usubillaga A., *Composición química de los aceites esenciales de Ocimum basilicum L. var basilicum, O. basilicum L. var purpurensens, O. gratissimum L., y O. tenuiflorum L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial*, 2003, vol 45 (1).



Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia su estudio y el desarrollo de técnicas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales⁶¹³.

El uso de las plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas, vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en diferentes países. De ellas el 74% fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional. La investigación en este sentido brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural como son las plantas medicinales¹⁷.

Existen innumerables especies vegetales con propiedades aromáticas, desde plantas superiores, hasta algas o líquenes. Algunas familias botánicas son tradicionalmente fuentes de productos aromáticos, como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Lauraceae, Piperaceae, Apiaceae y Asteraceae¹⁴.

El empleo de ciertas plantas, con fines terapéuticos específicos, indica que éstas poseen compuestos con propiedades curativas de gran importancia, entre éstas se puede citar las plantas pertenecientes a la gran familia botánica Asteráceae (anteriormente denominada *Compositae*), siendo ésta una de las más distribuidas en el mundo aunque su mayor diversidad se encuentra en el continente americano, caracterizada por su diversidad de tipos de plantas, con cerca de

¹³ Lizcano, A., Vergara, J., *Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*, 2008, 131: p22.

¹⁷ Aricapa, D., *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos*, 2009, 147: p12.

¹⁴ Bandoni, A., *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores*, 2002, Corporación Iberoamericana CYTED, Segunda Edición, Argentina.



20000 especies¹⁸. En algunas especies de esta familia han sido encontradas lactonas sesquiterpénicas, como la ametilen- g-lactona, que tienen propiedades citotóxicas, antitumorales y/o mutagénicas¹⁹.

Los aceites esenciales, o esencias, son compuestos del metabolismo vegetal; la mayoría de ellos son volátiles y son responsables del olor del vegetal. Es característica de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes²⁰.

Sin embargo, conviene saber que así como existen esencias compuestas exclusivamente por terpenos (la trementina), existen esencias que prácticamente carecen de ellos (la esencia de almendras), y están compuestas por derivados bencénicos, fenoles (esencia de clavo) ésteres e hidrocarburos lineales (esencias de frutas), o hasta por componentes difícilmente relacionables con las esencias, como alcaloides, glicósidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, pirazínicos, sulfuros, aminas, etc¹⁴.

Debido a esta complejidad en su composición, es aconsejable hacer una discriminación entre los compuestos contenidos en una esencia. Se habla entonces de compuestos mayoritarios, cuando están en la esencia en una proporción mayor al 1 o 0.5%, y los minoritarios, que en algunos casos pueden contarse por centenares, como en las esencias de flores (jazmín, rosa, inmortelle, tuberosa)¹⁴.

¹⁸ Flores, M., D'armas, H., Herrera, H., *Identification of some chemical constituents from the Chromolaena laevigata leaves by gas chromatography-mass spectrometric*. Part II. Ciencia, 2007, vol.15, no.3, p.421-432.

¹⁹ Moreno, S., Crescente, O., Ortiz, S., Quintero, M., *Composición Química Y Actividad Tóxica Del Aceite Esencial De Simsia pubescens Triana*, 2006, Interciencia., vol 31.

²⁰ Moreno, S., Crecente, O., Ortiz, S., Quintero, M., *Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de Simsia pubescens Triana*, 2009, 745-747: 745.

¹⁴ Bandoni, A., *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores*, 2002, Corporación Iberoamericana CYTED, Segunda Edición, Argentina.



Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas. La mayoría de los alimentos deben su sabor y olor a sustancias químicas que se encuentran presentes en el orden de partes por millón²¹.

En la naturaleza, algunas especies evolucionaron con niveles mucho mayores de estas sustancias químicas que otras. Con el descubrimiento de la destilación se hizo posible separar del material botánico estas sustancias o sus mezclas, dando lugar al nacimiento de los aceites esenciales como producto comercial²¹.

Otro concepto que debe tenerse en cuenta es que, siendo una parte del metabolismo de una planta, la composición química de una esencia está permanentemente variando, modificándose las proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según la parte de la planta, el momento de su desarrollo, o el momento del día. Más aún, debe tenerse en cuenta que dada su normalmente compleja composición, presenta una alta probabilidad de sufrir modificaciones fisicoquímicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde se almacena la esencia, etc.)¹⁴.

Muchas de las aplicaciones de las plantas aromáticas y, particularmente, de sus aceites esenciales, están relacionadas con la presencia de determinadas sustancias biológicamente activas, por lo que la identificación y cuantificación de

²¹ Cerutti, M., Neumayer, F., *Introducción a la obtención de aceite esencial de limón.*, vol 7, N 102., pp149-155., 2004.

¹⁴ Bandoni, A., *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento Industrial para la producción de aromas y sabores*, 2002, Corporación Iberoamericana CYTED, Segunda Edición, Argentina.



las mismas es un requisito fundamental para utilizarlas adecuadamente en sus diversas aplicaciones¹⁵.

2.2. ANTECEDENTES

Desde tiempos muy remotos las plantas han cumplido un papel muy importante en el área de la terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen¹³.

El estudio de plantas aromáticas del sur del Ecuador es un interesante proyecto el cual constituye un avance significativo de las especies que hasta el momento no cuenta con estudios de referencia.

Dicho proyecto permitirá determinar la calidad del aceite esencial frente a cepas patógenas con lo cual se aportara de gran manera dejando un precedente de las propiedades presentes en dicha especie y de esta manera contribuir con los estudios realizados para la elaboración de nuevos fitofármacos.

Para desarrollar la presente investigación se ha considerado una especie de la familia Asteráceae (*Chromolaena laevigata*), está ubicada en Gonzanama, tradicionalmente ha sido usada para el tratamiento de enfermedades infecciosas¹⁵, así como para aliviar ciertos males y dolencias, desinflamar hinchazones, tumores, dolor de muelas, enfermedades intestinales, antigripal, rasquiña y para combatir la lepra¹⁸.

¹⁵ Llorens, J., Castell, V., Pascual, R., *Composición del aceite esencial de Artemisia absinthium L procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales*, 2008, pags. 61-84.

¹³ Lizcano, A., Vergara, J., *Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*, 2008, 131: p22.

¹⁵ Llorens, J., Castell, V., Pascual, R., *Composición del aceite esencial de Artemisia absinthium L procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales*, 2008, pags. 61-84.

¹⁸ Flores, M., D'armas, H., Herrera, H., *Identification of some chemical constituents from the Chromolaena laevigata leaves by gas chromatography-mass spectrometric*. Part II. Ciencia, 2007, vol.15, no.3, p.421-432.



La *Chromolaena laevigata* es conocida como mora dulce, azotacaballo, cambará o camará, sanalotodo, salvia y doctorcito, la parte de la planta utilizada en la medicina popular son las hojas, que bien pueden prepararse en alcohol o cociéndolas en agua¹⁸.

Chromolaena laevigata

Reino: Plantae

Divison: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteráceae

Género: *Chromolaena* DC.

Especie: *Laevigata*

Habito: Arbusto

Altura: 2.5m¹⁸



Figura 9. *Chromolaena laevigata*
Fuente: Herbario PPN-UTPL.

Sinónimos: *Eupatorium conyzoides* Vahl²², *Eupatorium laevigatum* B.L. Rob²³, *Eupatorium psiadiifolium* DC²⁴.

²² Hokche, O., P. E. Berry & O. Huber. *Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas, Venezuela*. 2008.

²³ Jorgensen, P. M., M. H. Nee & S. G. Beck. *Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia*. 2011.

²⁴ Steyermark, J. *Flora of the Venezuelan Guayana Project*. 1995.

Capítulo III.
Materiales y Métodos



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Metodología

La metodología utilizada en la presente investigación se indica a continuación:

- Recolección y selección de la materia vegetal
- Destilación de la materia vegetal
- Determinación de las propiedades físicas del aceites esencial
- Determinación de composición química del aceite esencial
- Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial

El esquema de los analisis realizados se detallan a continuacion (Fig11):



Figura 10. Esquema de los analisis realizados
Elaboración: La Autora



3.1. Recolección de la materia vegetal

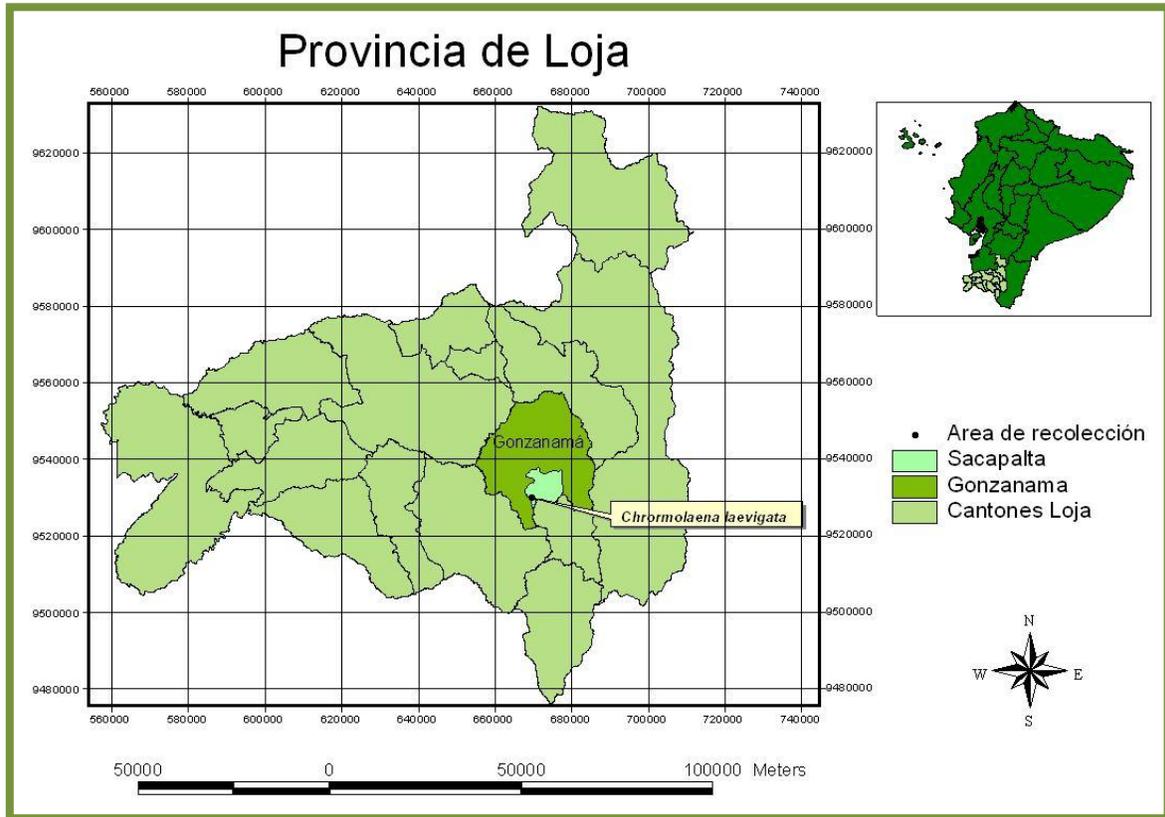


Figura 12. Área de estudio de la especie *Chromolaena laevigata* en la provincia de Loja
Elaboración: La Autora

Los ejemplares de *Chromolaena laevigata* fueron recolectados en la localidad de Gonzanamá específicamente en la Granja Experimental Lanyacu Predesur con las siguientes coordenadas: 669756E, 9529874N, 1737MET (Fig 12).

La recolección de la muestra se realizó en tres salidas de campo una cada quince días, posteriormente la muestra fue transportada al Instituto de Química Aplicada (IQA) de la UTPL para su tratamiento poscosecha el mismo que consistió en seleccionar la materia vegetal, es decir, eliminar la materia deteriorada e impurezas ajenas a esta, así mismo se realizó cortes de la



materia para conseguir una mayor superficie de contacto al momento de la destilación, es decir para permitir que el vapor de agua pueda ingresar por todos los espacios existentes entre la materia, todo este tratamiento con el fin de obtener mejores resultados en cuanto al rendimiento del aceite esencial.

3.2. Destilación del Aceite Esencial

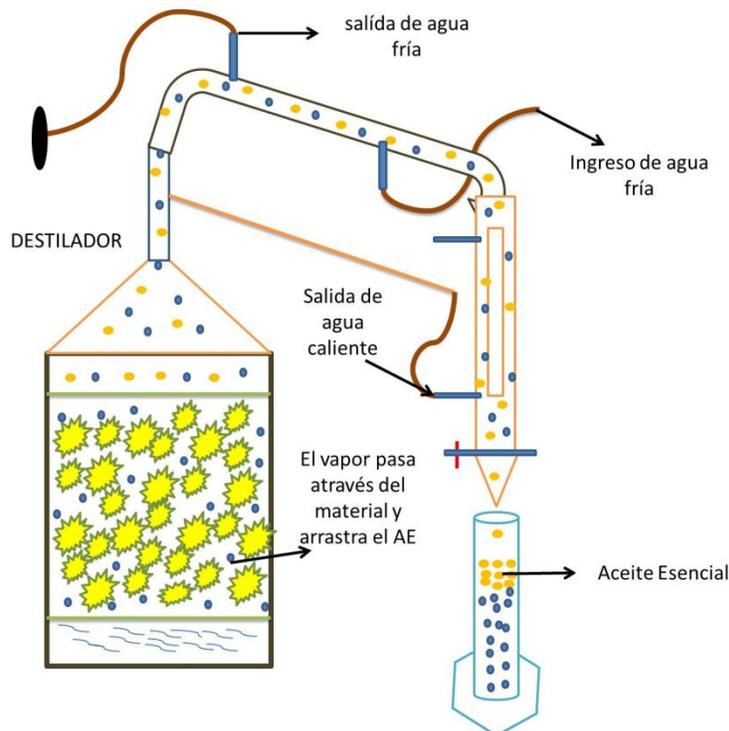


Figura 13. Proceso de destilación
Elaboración: La Autora

Luego de haber realizado el tratamiento pos cosecha se procedió a la obtención del aceite esencial por medio de destilación con arrastre de vapor (Fig 13), dicho proceso consiste en separar los componentes de una mezcla en este caso la obtención del aceite esencial mediante el vapor de agua seguida de la condensación.

Para la obtención del aceite esencial se realizó algunos ensayos previos con los cuales se determinó el óptimo estado fenológico de la materia vegetal y el



tiempo necesario para obtener un mejor rendimiento. La materia fue destilada en fresco y en seco, logrando determinar que el mejor estado fenológico para ser sometida a destilación es en foliación y el tiempo óptimo de destilación es de 3 horas, pasado este tiempo la cantidad de aceite esencial obtenido es mínimo e inapreciable.



Figura 14. Materia vegetal antes del proceso de destilación
Elaboración: La Autora

Para que la muestra sea sometida al proceso de destilación esta fue previamente cortada en trozos más pequeños y luego colocada en el destilador (Fig 14), posteriormente el destilador fue sometido a fuego lo que generó una corriente de vapor de agua el mismo que circulo por todos los espacios llevando consigo el aceite esencial, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa en el Florentino (Fig 15).



Figura 15. Recolección del aceite esencial en el florentino
Elaboración: La Autora



Esta técnica es muy utilizada especialmente en perfumería. Se aplica a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

Posteriormente el aceite esencial fue recogido en una probeta para medir el volumen de aceite esencial obtenido (Fig 16a), para luego ser envasado en frascos ámbar (Fig 16b) y almacenados en refrigeración a -4°C , todo ello para mantener el aceite en buenas condiciones y evitar que se degrade por efecto de la luz.

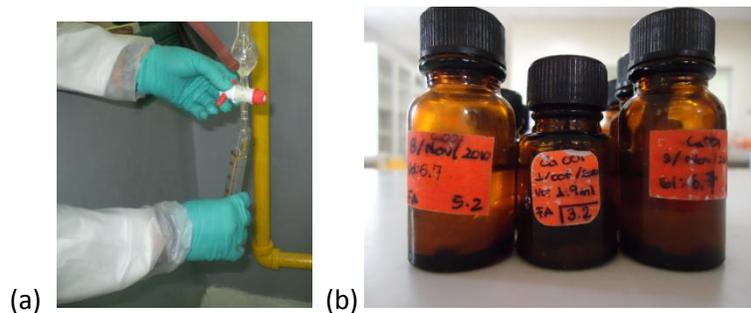


Figura 16. a) Recolección de aceite esencial. b) frascos ámbar con aceite esencial previos a ser almacenados en refrigeración
Elaboración: La Autora

3.2.1. Determinación de la Humedad

La Humedad fue determinada con las hojas de la materia vegetal recolectada, se realizaron cortes de las hojas y luego se colocó aproximadamente 1gr de la materia vegetal en capsulas de porcelana previamente taradas, este proceso se hizo por triplicado en cada recolección con el objetivo de obtener resultados confiables.

Figura 17. Humedad
Elaboración: La Autora





Luego las capsulas con el material fueron colocadas en la lámpara ULTRA X por 15 minutos y posteriormente fueron colocadas en el desecador por 15 minutos todo ello con el objetivo de eliminar el agua presente en la especie estudiada (Fig 17). El proceso fue realizado entre 3 y 4 veces hasta que en peso se mantuvo estable.

Una vez finalizado todo el procedimiento se realizó los cálculos respectivos para determinar la Humedad (Anexo I).

3.2.2. Determinación del Rendimiento

El rendimiento del aceite esencial depende mucho del estado fenológico y las condiciones en las que la materia fue sometida a destilación. Para obtener valores del rendimiento es necesario ayudarnos de los valores previos de humedad (Anexo II).

3.3 Determinación de Propiedades Físicas

El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* es un líquido viscoso, presenta una coloración amarillenta y con un olor fuerte.

3.3.1. Densidad relativa: La densidad del aceite es la relación entre su peso y su volumen, y es dependiente de la temperatura. Se determinará según la norma ANFOR NFT75-111, en la cuál se realizarán tres repeticiones, obteniendo una densidad promedio de cada una de las muestras.

Para este análisis se utilizó un picnómetro de 1ml, una balanza y un termómetro (Fig 18); el primer paso a seguir es obtener el peso inicial del picnómetro vacío, luego se coloca agua en el picnómetro y nuevamente se toma el peso y finalmente se coloca el aceite esencial



para obtener el peso final; en el Anexo 3 se muestran los cálculos respectivos para determinar la densidad del aceite esencial (Fig 19).

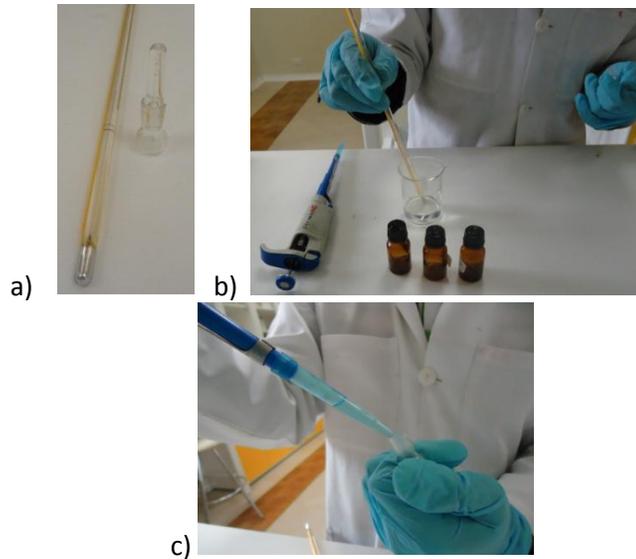


Figura 18. a) Termómetro y Picnómetro, material principal para determinar la densidad. b) medición de la temperatura necesaria para determinar la densidad. c) Picnómetro con aceite esencial.

Elaboración: La Autora

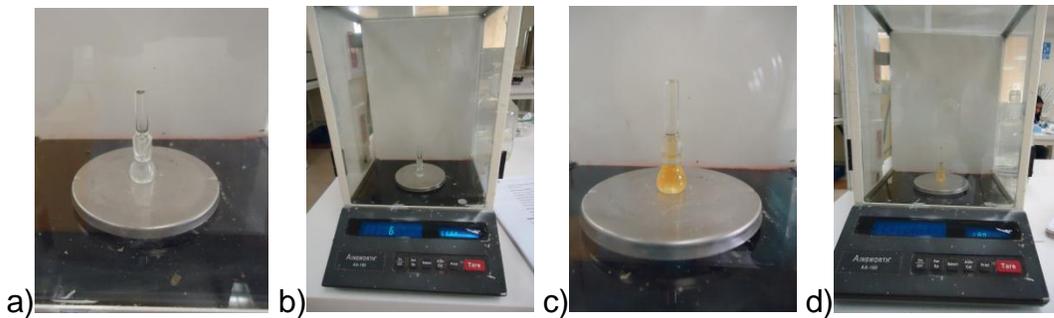


Figura 19. Determinación de la Densidad. a) y b) Picnómetro con agua. c) y d) Picnómetro con aceite esencial.

Elaboración: La Autora

3.3.2 Índice de Refracción: se determinó según la norma ANFOR NF 75-112 25, en la cual se utilizará el refractómetro ABBE disponible en el Laboratorio CETTIA.

Para ello se calibró el equipo con una gota de agua destilada, posteriormente se colocó una gota del aceite esencial y se procedió



a la lectura respectiva, se realizó el mismo procedimiento con todos las aceites esenciales de *Chromolaena laevigata* (Fig 20).

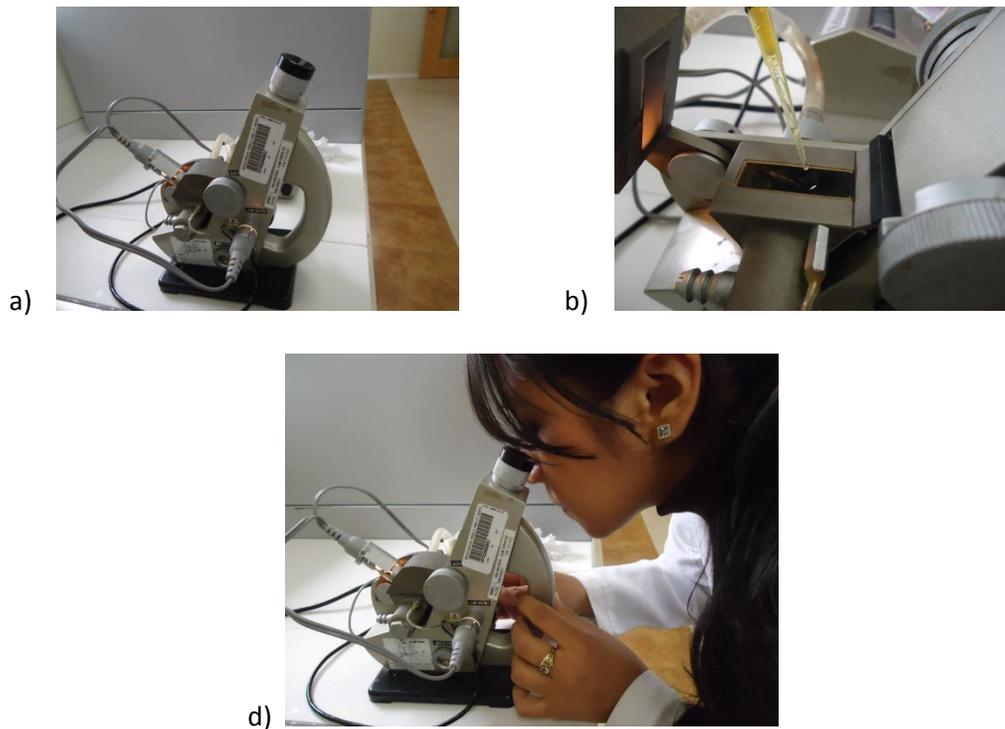


Figura 20. Determinación del Índice de Refracción. **a)** refractómetro calibrado . **b)** Muestra de aceite esencial en el refractómetro. **c)** lectura del Índice de Refracción .

Elaboración: La Autora.

3.4. Determinación de la composición química del Aceite Esencial

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Chromolaena laevigata* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-MS, y acoplada un detector de ionización de llama CG-FID, dichas corridas cromatográficas se harán en dos columnas en CG-MS en columna DB-5MS y HP-INNOWAX, CG-FID en columna DB-5MS y HP-INNOWAX.



3.4.1. Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida¹⁷.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más empleadas son las columnas capilares²⁵.

Un Cromatógrafo de gases consiste de:

- Fase móvil
- Puerto de inyección
- Horno
- Columnas
- Fase estacionaria
- Detector
- Sistema de registro de datos²⁶

3.4.2 Equipo

El equipo que se utilizó es 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 dos columnas capilares. (Fig 21)

¹⁷ Aricapa, D., *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos*, 2009, 147: p12.

²⁵ Gutiérrez, M., Droguet, M., *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*, 2002, (U.P.C.), N° 122.

²⁶ Olguín, L., Rodríguez, H., *Métodos en Biotecnología Cromatografía de Gases*, 2004.



Figura 21. Cromatografo de Gases
Elaboración: La Autora

3.4.3. Características de las Columnas Capilares

TABLA 1. Características de las columnas capilares

COLUMNA	LONGITU D (M)	DIÁMETRO INTERNO DI (MM)	FASE ESTACIONARIA	TEMPERATURA LÍMITE (°C)
DB-5	30	0.25	0.25	325
HP- INNOWAX	30	0.25	0.25	260

Fuente: Proveedores
Elaboración: La Autora

3.4.4. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas CG-MS

El análisis del aceite esencial de *Chromolaena laevigata* consistió en la obtención de los cromatogramas y los espectros de masas de los compuestos individuales.

3.4.5. Preparación de las muestras

Es de gran importancia tener en cuenta que todo el material a utilizar se encuentre limpio y en buenas condiciones con el fin de evitar posibles contaminaciones.

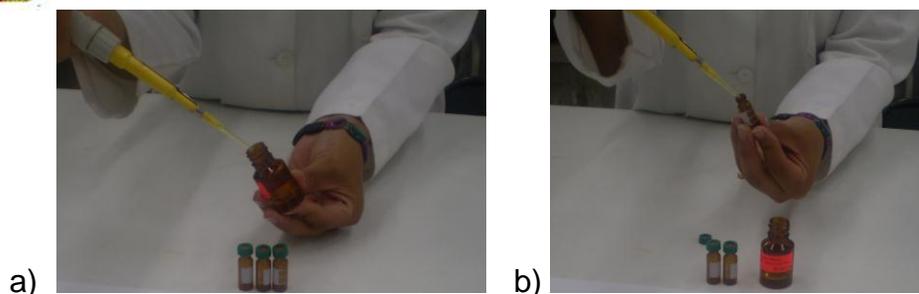


Figura 22. Preparación de la muestra. **a)** Aceite esencial . **b)** Diclorometano.
Elaboración: La Autora.

Las muestras fueron preparadas en viales propios para corridas cromatograficas, se colocó 10ul del aceite esencial de ***Chromolaena laevigata*** y 990ul de Diclorometano (Fig 22a, b), una vez preparada la muestra de cada uno de los aceites estos fueron debidamente rotulados con la finalidad de evitar errores al momento de realizar las corridas cromatográficas. Además se realizó la inyección de hidrocarburos (C10-decano a C25-pentacosano) comercialmente conocidos como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, los Hidrocarburos fueron inyectados tanto en la columna DB- 5 MS como en HP-INOWAX (Fig 23) esto con la finalidad de ser utilizados para obtener los índices de Kovats los mismos que son indispensables en la determinación de la composición química, los Hidrocarburos fueron inyectados bajo los mismos los mismos parámetros que los AE (Fig 22,23)



Figura 23. Muestra ubicada para la Inyección cromatografica
Elaboración: La Autora



3.4.6. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna DB-5 MS

Los parámetros bajo los cuales fueron inyectadas las muestras del aceite esencial de *Chromolaena laevigata* usando la columna DB-5 MS se indican a continuación. (Fig 24)

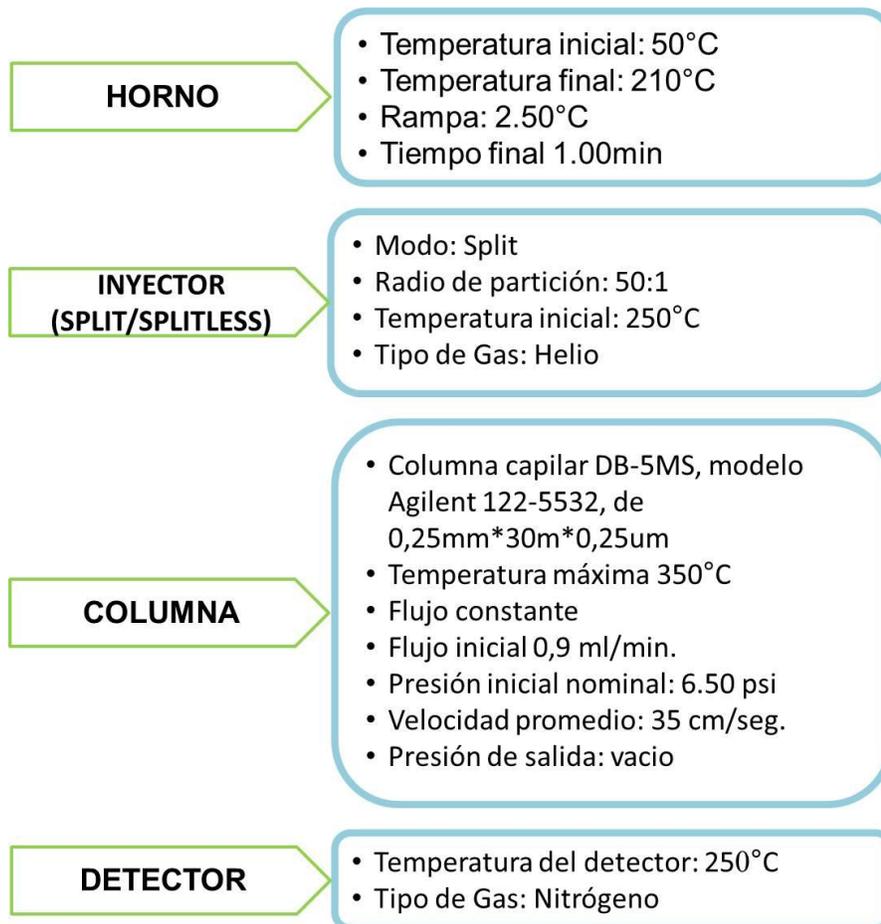


Figura 24. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna DB-5 MS
Elaboración: La Autora



3.4.7. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna HP-INOWAX

Los aceites esenciales fueron inyectados bajo los siguientes parámetros operaciones (Fig 25).

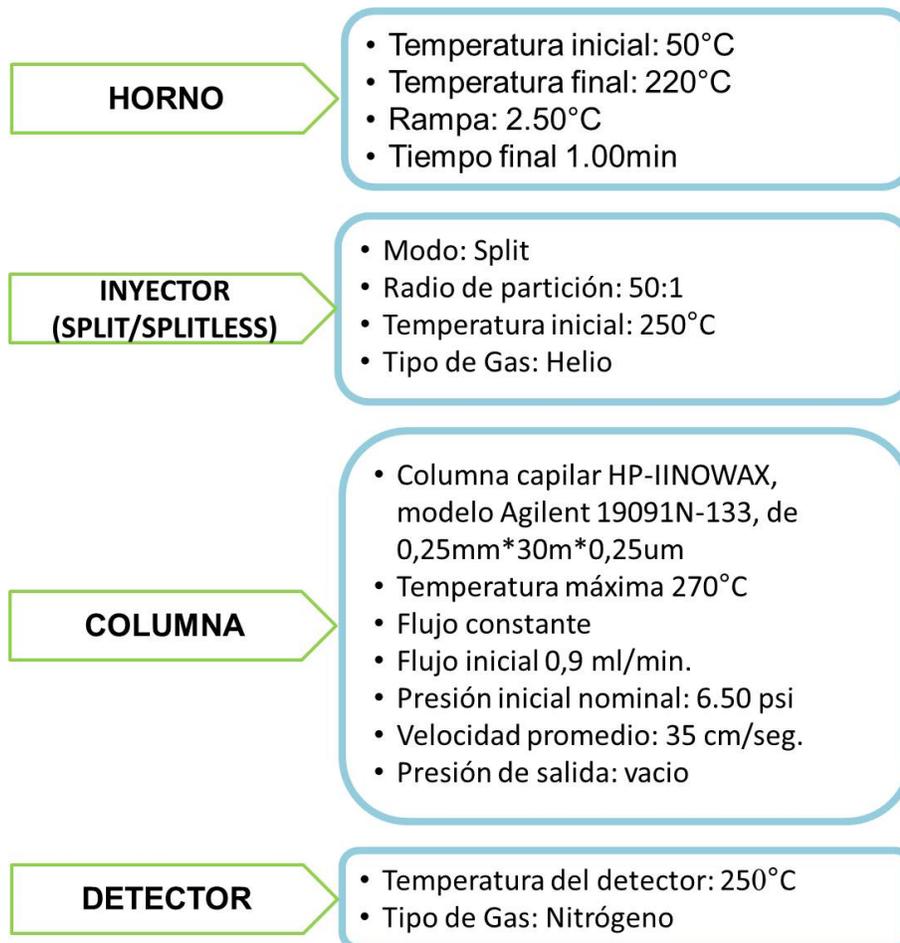


Figura 25. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna HP-INOWAX

Elaboracion: La Autotra



3.4.8. Identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos del aceite esencial en base a los índices de Kovats y los espectros de masas.

El tamaño de los picos y el tiempo de retención se usan para la determinación cuantitativa y cualitativa de un compuesto respectivamente²⁶.

La identificación de los compuestos químicos de *Chromolaena laevigata* se realizó con la ayuda de la librería WILEY 7n la misma que nos proporciona el número de CAS de cada uno de los compuestos con tres posibilidades respectivamente de las cuales se escogieron aquellas cuyo grado de coincidencia sea superior al 80%, posteriormente se determinó el índice de Kovats de cada uno de los compuestos del aceite esencial detectados en las dos columnas (DB-5 MS y HP-INOWAX).

Adicionalmente la identificación se la realiza mediante el análisis de los espectros de masas dados para cada uno de los compuestos identificados mediante la librería WILEY 7n.

Se realiza la comparación de los índices de Kovats obtenidos experimentalmente en las dos columnas con lo reportado en la literatura, cuya diferencia entre estos valores determinados debe ser menor o igual a 50 unidades²⁷.

²⁶ Olgún, L., Rodríguez, H., *Métodos en Biotecnología Cromatografía de Gases*, 2004.

²⁷ Cerutti, M., Neumayer, F., *Introducción a la obtención de aceite esencial de limos*, 2004, vol 7, número 102, pp149-155.



El tiempo de elución nos permitió calcular el índice de Kovats de cada uno de los compuestos, de tal manera que los índices calculados fueron indispensables para identificar los compuestos presentes en una mezcla.

3.4.9. Interpretación de los Cromatogramas

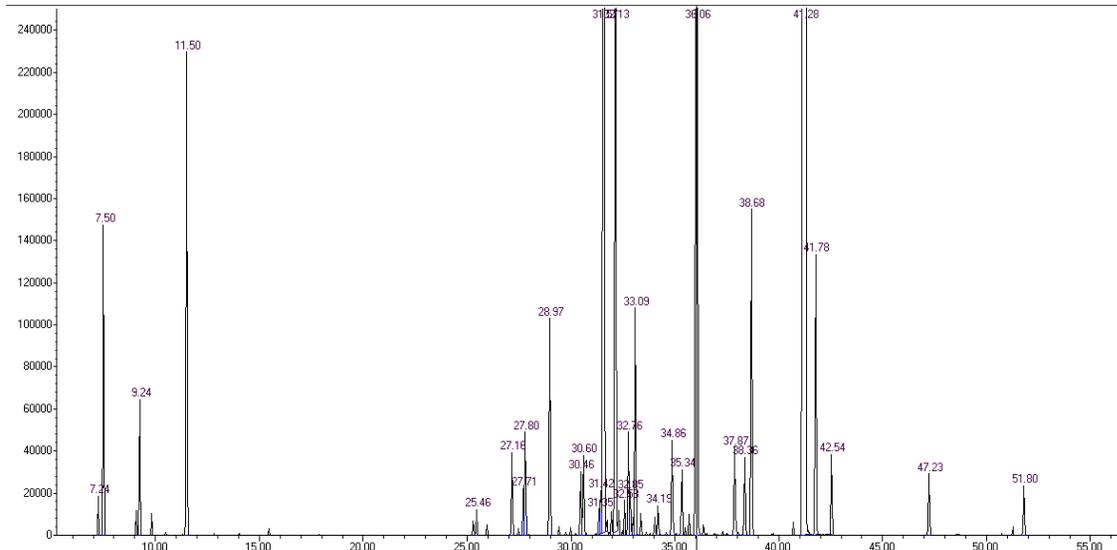


Figura 26. Cromatograma.

Elaboración: La Autotra

El tamaño de los picos se corresponde con el porcentaje del compuesto de la muestra. Si aumenta la concentración del compuesto, se obtiene un pico de mayor tamaño. El tiempo de retención es el tiempo que tarda el compuesto en atravesar la columna. Si las condiciones de la columna y todas las condiciones de funcionamiento son constantes, un compuesto determinado siempre tendrá el mismo tiempo de retención²⁵.

En primer lugar, es necesario analizar una cantidad conocida de una muestra auténtica pura del compuesto para determinar el tiempo de retención y el tamaño de los picos. A continuación, este valor se puede comparar con los

²⁵ Gutiérrez, M., Droguet, M., *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*, 2002, (U.P.C.), N° 122.



resultados de una muestra desconocida para determinar si está presente el compuesto de interés (mediante la comparación de los tiempos de retención) y en qué cantidad (mediante la comparación del tamaño de los picos)²⁵.

El cromatograma ideal tiene picos con muy poca separación que no se solapan (coelución). Esto es muy importante por dos motivos. En primer lugar, la coelución no permite medir los picos con exactitud. En segundo lugar, si dos picos tienen el mismo tiempo de retención, ninguno de ellos se puede identificar exactamente²⁵.

3.4.10. Corrida cromatográfica de las muestras por CG-FID en la columna capilar DB-5

El Detector de ionización de flama (FID flame ionization detector) consiste de una flama hidrógeno/aire y una placa colectora. Las muestras que salen de la columna pasan a través de la flama, la cual rompe las moléculas orgánicas y produce iones. Los iones son colectados en un electrodo parcial y produce una señal eléctrica. Es extremadamente sensible en un amplio rango dinámico. La única desventaja es que destruye la muestra²⁶.

²⁵ Gutiérrez, M., Droguet, M., *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*, 2002, (U.P.C.), N° 122.

²⁶ Olgúin, L., Rodríguez, H., *Métodos en Biotecnología Cromatografía de Gases*, 2004.



3.4.11. Parametros operacionales en la columna DB-5 (CG-FID)

Los parámetros operacionales bajo los cuales se inyectaron las muestras del aceite esencial se muestran a continuación.

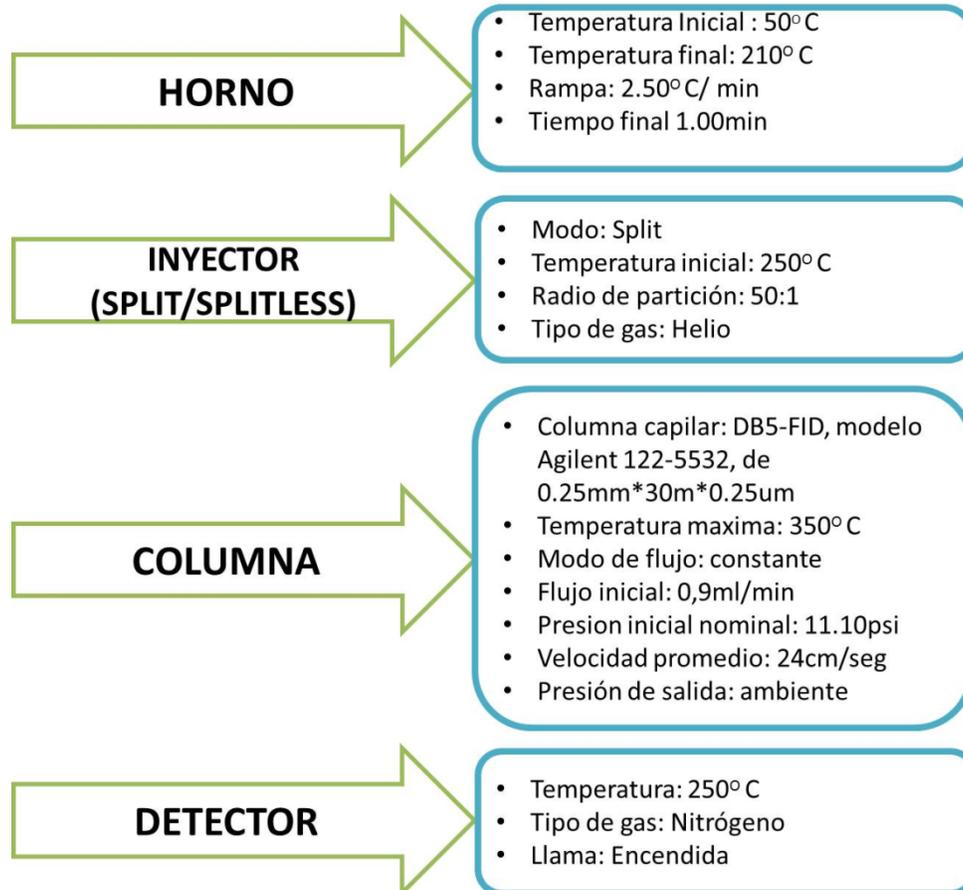


Figura 27. Parametros operacionales del CG-FID en la columna DB5

Elaboracion: La Autotra



3.4.12. Parámetros operacionales en la columna HP-INOWAX (CG-FID)

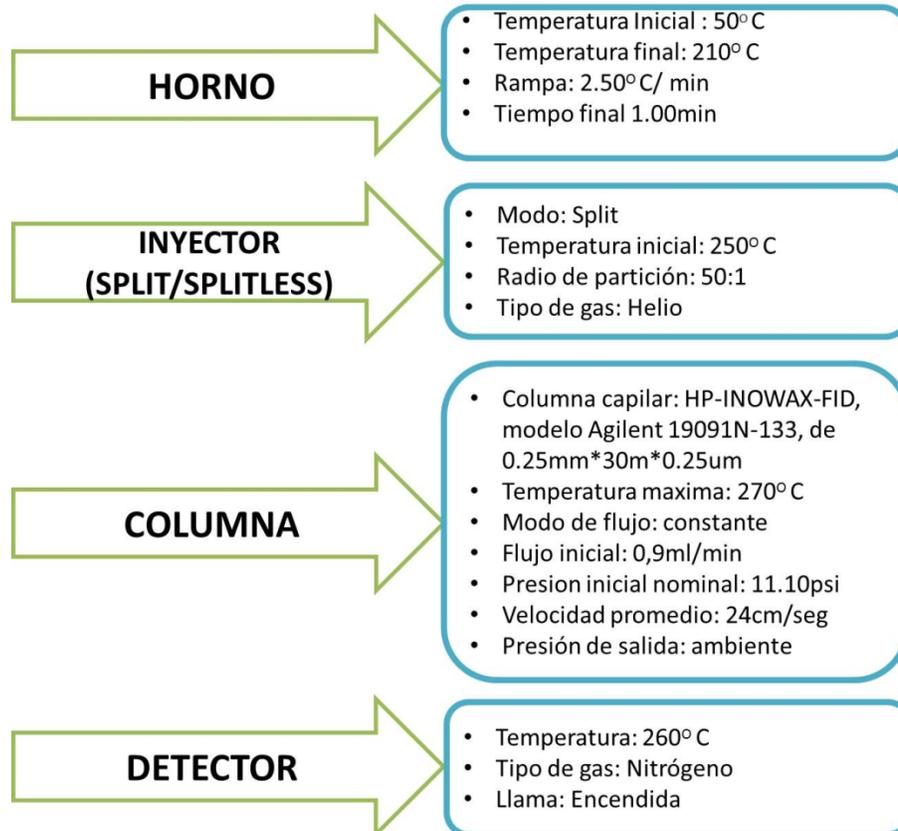


Figura 28. Parámetros operacionales del CG-FID en la columna HP-INOWAX
Elaboracion: La Autotra



3.5. Evaluación de la Actividad Biológica

El método empleado para evaluar la actividad biológica permite medir la susceptibilidad de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos y antifúngicos determinando la potencia inhibitoria de la sustancia, lo que dependerá de la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal.

3.5.1. Microorganismos de Prueba

Para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana se emplearon 5 cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 9997, *Proteus vulgaris* ATCC® 8427, *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Salmonella Typhimurium* LT2; y 2 cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, mientras que para la evaluación de la susceptibilidad fúngica se emplearon 3 organismos: *Trichophyton rubrum* ATCC® 28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC® 28185 y *Aspergillus niger*.

3.5.2. Preparación del aceite esencial

Para este ensayo se empleó una dilución de 20mg/ml de aceite esencial + 980ul de DMSO, esta dilución fue utilizada tanto para bacterias como para hongos.



3.5.3. Preparación de los medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

Los medios de cultivo se realizaron de acuerdo a las bacterias y hongos utilizados.

3.5.3.1. Bacterias

3.5.3.1.1. Caldo de Cultivo Muller Hinton

El caldo Muller Hinton es el principal medio utilizado para las pruebas bacterianas es por ello que se realizaron cálculos previos con el fin de elaborar el medio necesario, se tomó en cuenta el número de pocillos, el número de aceites y el número de bacterias a utilizar.

3.5.3.1.2. Cultivo overnight

El cultivo overnight consistió en la elaboración de una serie de medios de cultivo en los cuales se realizó el inóculo de las bacterias, entre los medios utilizados se encuentran Caldo Oxoid: *Salmonella Tiphymurium*; Clado tripticasa: *estafilococcus aureus*, *Klepsiella*, *Pseudomona* y *Echericha C*; Caldo Muller Hinton: *Proteus Vulgaris*; Caldo Infusión Cerebro: *Enterococcus Fecalis*.



Una vez listos los medios se procedió a esterilizarlos mediante autoclave, posteriormente se realizó el inóculo de las bacterias en los medios correspondientes a cada una de ellas.

3.5.3.1.3. Preparación de la suspensión de los inóculos

El inóculo bacteriano se realizó a partir de un cultivo nocturno también llamado cultivo overnight el mismo que fue sembrado el día anterior a 37°C por 14-16 horas (Fig 29).



Figura 29. Cultivo Overnight
Elaboración: La Autora

De este cultivo se toma 150-300 μ L en 7mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de MacFarland, de esta suspensión tomamos 140 μ L e inoculamos en 6,86 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 ufc/mL. 100 μ L de esta suspensión se usan para completar a 200 μ L el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL.



3.5.3.2. Hongos

3.5.3.2.1. Caldo Saburo

El Caldo Saburo es el principal medio utilizado para las pruebas de actividad fúngica, para ello se realizaron cálculos previos con el fin de elaborar el medio necesario, tomando en cuenta el número de pocillos, el número de aceites y el número de hongos.

Después de haber preparado los medios de cultivo estos fueron esterilizados con la ayuda del autoclave junto con el material necesario, todo ello con el fin de evitar contaminaciones, posteriormente los medios fueron almacenados en la estufa hasta el inicio de la prueba (Fig 30).



Figura 30. Medios de cultivo
Elaboración: La Autora



3.5.3.2.2. Preparación de la suspensión de los inóculos

El inóculo fúngico se realizó a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C .

De esta reserva se tomó 14ul en 7ml de Caldo Sabouroud. 100 μL de esta suspensión se usan para completar a 200 μL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

3.5.4 Concentración Mínima Inhibitoria

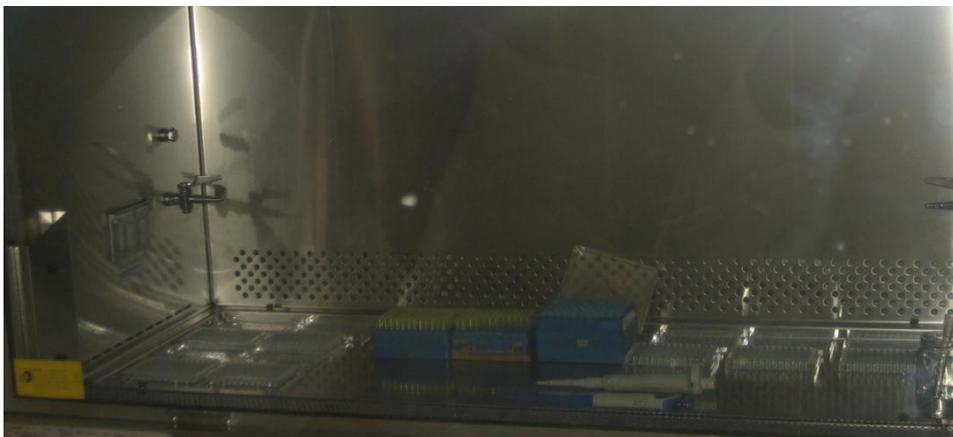


Figura 31. Cabina de flujo laminar
Elaboración: La Autora

Antes de haber iniciado la prueba de Microdilución en Caldo se procedió a colocar todo el material en la cámara de flujo laminar bajo rayos UV por un periodo de 15 minutos con el fin de esterilizar el área de trabajo y el material a utilizar (Fig 31).



3.5.4.1. CMI Antibacterianos

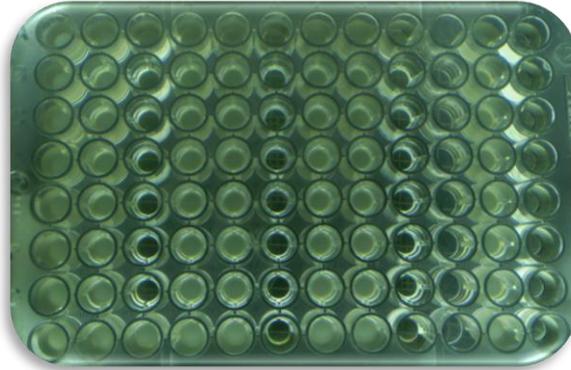


Figura 32. Placa TC₉₆
Elaboración: La Autora

Para este ensayo se emplearon las placas TC₉₆ (Fig 32), se colocó 180 μ l de caldo Muller-Hinton en todos los pocillos de la primera fila de la placa, luego 100 μ l de caldo Muller-Hinton a todos los demás pocillos restantes, después se añadió 20 μ l de la dilución previa de aceite esencial y DMSO en la primera fila de la placa, a continuación se mezcló en el primer pocillo y se realizó diluciones seriadas tomando 100 μ l del primer pocillo y traspasando al siguiente pocillo, todo en dirección vertical, se realizó el mismo procedimiento hasta el último pocillo donde está la concentración mínima a la que se quiere llegar, de este último se tomaron 100 μ l y se desechó, quedándose así 100 μ l de medio + aceite en cada pocillo.

Posteriormente se inoculó la placa con 100 μ l de la suspensión del inóculo bacteriano en todos los pocillos de la placa a excepción de los controles de esterilidad, llegando así a un volumen final de 200 μ l en todos los pocillos de la placa TC₉₆, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, así como la concentración final del aceites esenciales de 1000 a 8 μ g/mL.

Además de los controles de esterilidad se emplearon dos controles el uno positivo: Gentamicina - 180 μ l de caldo+ 20 μ l Gentamicina y el otro negativo: DMSO - 180 μ l



de caldo+20µl de DMSO. Finalmente las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C por un periodo de 18-24 h. La prueba se realizara por triplicado.

3.5.4.2. CMI Antifúngicos

Para realizar CMI Antifungicos se realizó el mismo procedimiento utilizado en CMI Antibacteriano, es decir, se colocó 180µl de Agar Saburo en la primera fila de la placa TC₉₆, luego se agregó 100µl de Agar Saburo en lo pocillos restantes, posteriormente se añadió 20µl de la dilución de aceite esencial y DMSO previamente preparada en toda la primera fila de la placa; a continuación se realizó diluciones seriadas tomando 100µl del primer pocillo y traspasando al siguiente pocillo todo en dirección vertical, se realizó el mismo procedimiento hasta el último pocillo donde está la concentración mínima a la que se quiere llegar, de este último se tomaron 100µl y se desechó, quedándose así 100µl de medio + aceite en cada pocillo;

Luego se realizó la siembra de 100ul del inculo en todos los pocillos de la placa a excepción de los controles de esterilidad, llegando así a un volumen final de 200ul en todos los pocillos, de esta manera se ajusta tanto la población de hongos esporulados a 5x10⁴ esporas/ml, concentración final del aceite esencial de 1000 a 0,5 µg/ml.

Además de los controles de esterilidad se emplearon dos controles el uno negativo: DMSO y el otro positivo - Itraconazol. Finalmente las placas fueron selladas e incubadas a 28 °C por un periodo de 24-72 horas. La prueba se realizara por triplicado.

3.5.5. Interpretación de los Resultados

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realiza de manera visual y se define como la menor concentración del aceite esencial necesario para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa.



Capítulo IV.

Resultados y Análisis



IV RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Determinación de Humedad

Todas las muestras fueron recolectadas en estado de foliación y destiladas al siguiente día de ser colectadas. A continuación se presenta el porcentaje promedio de humedad de las tres recolecciones realizadas, cabe recalcar que por cada recolección se realizó tres destilaciones de la materia vegetal.

Tabla 2. Humedad media de *Chromolaena laevigata* (%)

Código	H (%)	\bar{x}	σ	CV
CH1	53	55	3,2	0,06
CH2	51		2,6	0,05
CH3	61		2,6	0,04

CH: *Chromolaena laevigata*; 1 Primera Recolección; 2 Segunda Recolección; 3 Tercera Recolección.
H (%): Humedad promedio por cada recolección; σ : Desviación Estándar; cv: Coeficiente de Variación

Fuente: investigación Directa

Elaboración: la Autora

La materia vegetal recolectada tuvo una humedad promedio de 55%, se trató en lo posible de recolectar la especie bajo las mismas condiciones, sin embargo se puede apreciar que existe una pequeña variación entre estas. Es importante recalcar que son varias las condiciones que pueden influir sobre los resultados finales, entre estas se puede mencionar las condiciones climáticas, el suelo, el estado fenológico de las muestras recolectadas.

4.2. Rendimiento en aceite esencial

El rendimiento de aceite esencial de *Chromolaena laevigata*, así como el volumen correspondiente a cada destilación se muestra a continuación:

Tabla 3. Rendimiento en % (p/v) del aceite esencial de *Chromolaena laevigata*.

Repeticiones	Peso (gr)	Volumen (ml)	Rendimiento (%)	\bar{x}	σ	cv
CH11	1485	2,6	0,18	0,18	0,01	0,03
CH12	1790	3	0,17			
CH13	2170	3,9	0,18			



CH21	3005	5	0,17	0,18	0,01	0,07
CH22	3120	6	0,19			
CH23	2950	5	0,17			
CH31	3560	6	0,17	0,17	0,01	0,03
CH32	3720	6,5	0,17			
CH33	3720	6,7	0,18			

CH: *Chromolaena laevigata*; El primer número de cada código representan: **1** Primera Recolección; **2** Segunda Recolección; **3** Tercera Recolección; y el segundo número de cada código representan: **1** Primera Destilación; **2** Segunda Destilación; **3** Tercera Destilación; **X**: Promedio de todas las Destilaciones; σ : Desviación Estándar; **cv**: Coeficiente de Variación.

Fuente: investigación Directa
Elaboración: la Autora

La materia vegetal en un inicio fue sometida a ensayos previos es decir que la materia fue destilada tanto en fresco como en seco, obteniendo un mejor resultado en fresco, de tal manera que se logró obtener un rendimiento de 0,18%, es decir obtuvimos volúmenes bastante favorables en cuanto a rendimiento del aceite esencial. Cabe mencionar que el estado fenológico de la planta es uno de los factores que influye en los resultados, así como también las condiciones en las que fue destilada es decir que estas no fueron controladas por ende no fueron las mismas condiciones para todas las destilaciones.

4.3. Propiedades Físicas Del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* es un líquido viscoso y presenta una coloración amarillo intenso

4.3.1. Densidad

A continuación se presenta las densidades promedio de los nueve aceites esenciales de *Chromolaena laevigata*.

Tabla 4. Densidad media del aceite esencial de *Chromolaena laevigata*

Recolección	ρ gr/cm ³	\bar{x} gr/cm ³
Ch1	0,9604	0,9568
Ch2	0,9516	
Ch3	0,9584	
CH: <i>Chromolaena laevigata</i> ; 1 Primera Recolección; 2 Segunda Recolección; 3 Tercera Recolección; ρ : Densidad promedio de cada recolección; \bar{x} : Promedio de todas las recolecciones.		

Fuente: investigación Directa

Elaboración: la Autora

La tabla 4 muestra la densidad promedio de las tres destilaciones que se realizaron por cada recolección, proporcionando de esta manera una densidad final de 0,9568 gr/cm³.

4.3.2. Índice de refracción

Tabla 5. Índice de Refracción medio de los nueve aceite esencial de *Chromolaena laevigata*

Recolecciones	Índice de Refracción n^{20}	\bar{x}
CH1	1,5133	1,5114
CH2	1,5106	
CH3	1,5103	
CH: <i>Chromolaena laevigata</i> ; 1 Primera Recolección; 2 Segunda Recolección; 3 Tercera Recolección; \bar{x} : Promedio por cada recolección.		

Fuente: investigación Directa

Elaboración: la Autora

Los índices de refracción se muestran en la tabla 5, mismos que corresponden a los valores medios de los tres aceites esenciales obtenidos por cada recolección realizada. El Índice de Refracción promedio de los aceites esenciales es de 1,5114 n^{20} .

4.4. Composición Química del aceite esencial de *Chromolaena laevigata*

La identificación cualitativa de los compuestos se realizó en base al índice de Kovats y los espectros de masas, para ello la librería WILEY 7n nos da la



información requerida para iniciar la identificación de cada uno de los compuestos presentes en el aceite esencial.

En el aceite esencial de *Chromolaena laevigata* proveniente del sector de Gonzanamá se identificaron 22 compuestos en el aceite esencial de la primera recolección los mismos que representan el 95.75%; en la segunda recolección se identificaron 25 compuestos en el aceite esencial los que representan el 95.21%, mientras que en aceite esencial obtenido a partir de la tercera recolección se identificaron 22 compuestos y representan el 94,97%; en total se han identificado 25 compuestos en la columna DB5-MS, los mismos que representan el 96.5%, en base a todos los compuestos identificados en el aceite esencial de las tres recolecciones se puede deducir que los compuestos mayoritarios presentes en todos los aceites esenciales son: Chromolaenin (46.84%), Germacrene D (15,37%), γ - selinene (11,52%), γ -elemene (4,3%), limonene (3,94%), α -pinene (2,85%). En la Fig 32 se muestran los porcentajes medios de los compuestos mayoritarios obtenidos en las tres recolecciones.

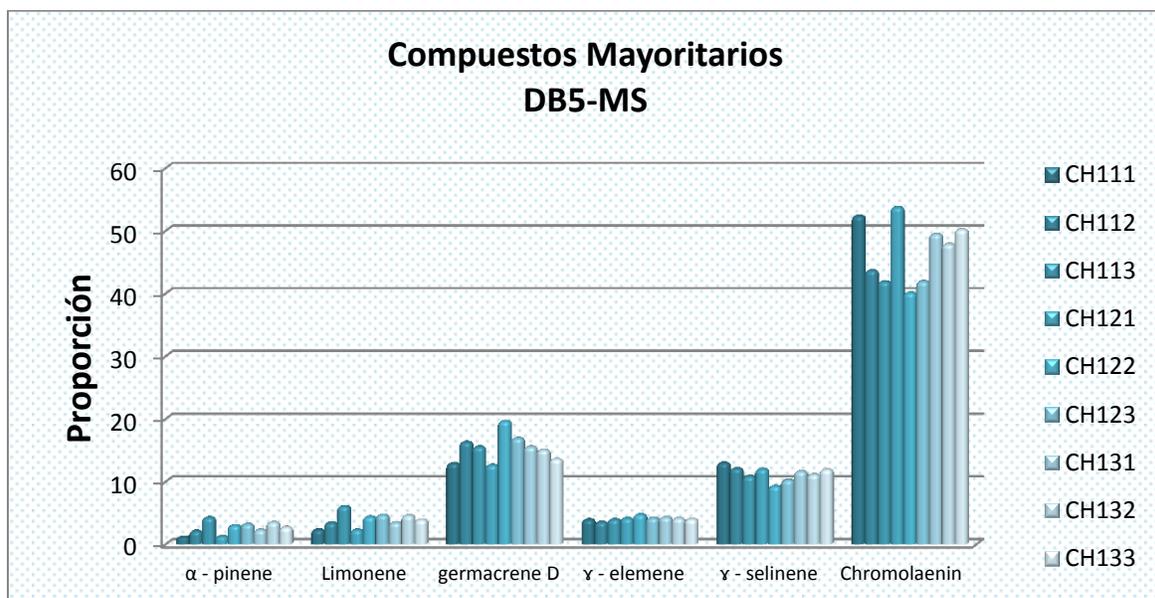


Figura 32. Compuestos mayoritarios en la columna DB5-MS

Fuente: investigación Directa

Elaboración: la Autora



Por otro lado se determinaron 27 compuestos en HP-INOWAX de los cuales 25 fueron identificados, entre los compuestos mayoritarios se encuentran: α -pinene (4,60%), β - pinene (2,14%), limonene (6,20%), β - caryophyllene (2,59%), germacrene D (20,57%), δ - cadinene (3,45%), viridiflorol (16,92%). Del total de compuestos identificados 15 de ellos se encontraron en DB5-MS y HP-INOWAX.

En la tabla 6 se indican los índices de Kovats, el porcentaje relativo para cada una de las recolecciones realizadas, además de ello se indica la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes relativos obtenidos en DB5-MS y HP-INOWAX, los parámetros que se presenta en la tabla nos dan una idea de la dispersión de cada uno de los valores con respecto a su promedio.



4.5. Compuestos Identificados en DB5-MS y HP-INOWAX

Tabla 6. Composición Química de *Chromolaena laevigata*

No	COMPUESTOS	DB5-MS ^a								HPINOWAX - MS ^e							
		IK-C ^b	IK-R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	\bar{X}	σ	CV	IK-C ^b	IK - R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	\bar{X}	σ	CV
1	α - thujene	937	930 ^g	0,39	0,31	0,35	0,35	0,04	0,11	1022	1038 ^p	0,56	0,62	0,80	0,66	0,12	0,18
2	α - pinene	942	939 ^g	2,54	3,14	2,87	2,85	0,30	0,11	1018	1034 ^q	4,61	4,11	5,09	4,60	0,49	0,11
3	Sabinene	973	975 ^g	0,27	0,25	0,21	0,24	0,03	0,13	1117	1134 ^q	0,48	0,42	0,50	0,47	0,04	0,10
4	β - pinene	977	979 ^g	1,17	1,14	1,24	1,18	0,05	0,04	1104	1124 ^q	2,01	1,99	2,41	2,14	0,23	0,11
5	myrcene	988	990 ^g	0,22	0,2	0,21	0,21	0,01	0,05	1161	1168 ^q	0,39	0,35	0,52	0,42	0,09	0,21
6	Limonene	1025	1029 ^g	3,97	3,82	4,02	3,94	0,10	0,03	1194	1212 ^r	5,99	6,07	7,00	6,35	0,56	0,09
7	α - cubebene	1367	1351 ^g	0,92	0,66	0,4	0,66	0,26	0,39	1478	1480 ^s	1,46	1,26	0,92	1,21	0,27	0,22
8	β - cubebene	1380	1388 ^g	0,44	0,25	0,35	0,13	0,39	1527	1558 ^q	0,81	0,59	0,48	0,63	0,17	0,27
9	β - elemene	1382	1390 ^g	0,56	0,66	0,6	0,61	0,05	0,08
10	β - caryophyllene	1409	1418 ^g	1,46	1,45	1,01	1,31	0,26	0,20	1580	1608 ^p	2,38	2,95	2,45	2,60	0,31	0,12
11	α - caryophyllene	1445	1459 ^g	0,36	0,39	0,33	0,36	0,03	0,08	1651	1680 ^q	0,65	0,76	0,75	0,72	0,06	0,09
12	β - E farnesene	1448	1458 ^h	0,95	0,91	0,49	0,78	0,25	0,32	1666	1674 ^q	1,19	1,13	0,73	1,02	0,25	0,25
13	aromadendrene	1468	1447 ⁱ	0,69	0,72	0,71	0,02	0,03
14	germacrene D	1472	1480 ^j	14,95	16,43	14,75	15,38	0,92	0,06	1694	1722 ^q	19,52	21,39	20,80	20,57	0,96	0,05
15	γ - elemene	1486	1445 ^k	3,84	4,4	4,19	4,14	0,28	0,07
16	α - muurolene	1490	1500 ^g	0,23	0,1	0,17	0,09	0,56	1711	1727 ^t	0,37	0,40	0,36	0,38	0,02	0,06



No	COMPUESTOS	DB5-MS ^a								HPINOWAX - MS ^e							
		IK-C ^b	IK-R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV	IK-C ^b	IK - R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV
17	β - bisabolene	1501	1505 ^g	1,56	1,22	0,66	1,15	0,45	0,40
18	β - gurjunene	1503	1457 ^l	0,15	0,28	0,22	0,09	0,43
19	δ - cadinene	1509	1523 ^h	1,5	1,58	1,35	1,48	0,12	0,08	1743	1749 ^u	3,30	3,61	3,45	3,45	0,15	0,04
20	β - sesquiphellandrene	1516	1522 ^g	0,25	0,29	0,27	0,03	0,10	1759	1780 ^q	0,52	0,58	0,36	0,49	0,12	0,24
21	α - cis copaene 8ol	1554	1595 ^m	0,68	0,45	0,64	0,59	0,12	0,21
22	Spathulenol	1567	1578 ^g	1,02	0,37	0,12	0,50	0,46	0,92
23	γ - selinene	1585	1535 ⁿ	12	10,55	11,55	11,37	0,74	0,07
24	Chromolaenin	1725	1726 ^o	46,01	45,3	49,21	46,84	2,08	0,04	2358	2373 ^o	19,96	17,56	16,94	18,15	1,60	0,09
25	2-Methoxy-4methyl-4-phenyl - 2,5-cyclohexadien- 1-one	1761	1729 ^p	0,34	0,39	0,37	0,04	0,10
26	Alloaromadendrene ^e	1626	1662 ^t	0,31	0,45	0,38	0,10	0,26
27	γ - muurolene	1674	1684 ^q	0,82	0,88	0,71	0,81	0,09	0,11
28	α - himachalene	1705	1649 ^t	1,30	0,76	1,03	0,38	0,37
29	bicyclogermacrene	1717	1731 ⁿ	6,87	7,94	7,42	7,41	0,54	0,07
30	caryophyllene oxide	1962	1999 ^q	0,36	0,57	0,47	0,15	0,31
31	Viridiflorol	2072	2102 ^q	18,35	15,50	18,13	17,32	1,59	0,09
32	No Identificado	2128	2,98	3,44	3,21	0,33	0,10
33	α - cadinol	2160	2211 ^q	0,59	0,73	0,97	0,76	0,19	0,25
34	t - muurolol	2220	2178 ^p	0,97	0,83	0,94	0,91	0,07	0,08
35	16 Kaurene	2341	2310 ^w	0,58	0,89	0,74	0,22	0,29



No	COMPUESTOS	DB5-MS ^a								HPINOWAX - MS ^e							
		IK-C ^b	IK-R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV	IK-C ^b	IK - R ^c	CH11 ^d	CH12 ^d	CH13 ^d	X	σ	CV
36	No Identificado	2712	1,58	0,72	1,15	0,61	0,53
*TOTAL						95,99		*TOTAL						98,05			

a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS

b = Índice de Kovats determinados experimentalmente.

c = índice de Kovats de acuerdo a la referencia bibliografía.

d = % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INOWAX respectivamente.

e = Compuestos identificados solo en la columna HP-INOWAX

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

X = Promedio

σ = Desviación Estándar

CV = Coeficiente de variación

IK^{REF}, Literatura: ^fref 1, ^gref 2, ^href 3, ⁱref 4, ^jref 5, ^kref 6, ^lref 7, ^mref 8, ⁿref 9, ^oref 10, ^pref 11, ^qref 12, ^rref 13, ^sref 14, ^tref 15, ^uref 16, ^vref 17, ^wref 18, ^xref 19 (anexo V)



4.5. Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB5; HP-INOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)

De acuerdo a la correlación realizada entre MS-FID se logró determinar la presencia de los compuestos en ambos detectores con una pequeña variación en cuanto al porcentaje de los compuestos.

En la tabla 7 se indican los porcentajes de los compuestos presentes en ambos detectores MS-FID.



Tabla 7. Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB5; HP-INOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)

No	COMPUESTOS	DB5										HPINOWAX									
		CH1		CH2		CH3		\bar{X}		σ		CH1		CH2		CH3		\bar{X}		σ	
		MS ^e	FID ^f																		
1	α - thujene ^{a,b}	0,39	0,33	0,31	0,36	0,35	0,40	0,35	0,36	0,04	0,04	0,56	0,43	0,62	0,66	0,80	0,52	0,66	0,54	0,12	0,12
2	α - pinene ^{a,b}	2,54	2,62	3,14	2,85	2,87	3,07	2,85	2,85	0,30	0,23	4,61	3,13	4,11	3,87	5,09	5,00	4,60	4,00	0,49	0,94
3	Sabinene ^{a,b}	0,27	0,27	0,25	0,29	0,21	0,29	0,24	0,28	0,03	0,01	0,48	0,36	0,42	0,27	0,50	0,36	0,47	0,33	0,04	0,05
4	β - pinene ^{a,b}	1,17	1,39	1,14	1,48	1,24	1,55	1,18	1,48	0,05	0,08	2,01	1,75	1,99	1,17	2,41	2,11	2,14	1,68	0,24	0,47
5	myrcene ^{a,b}	0,22	0,26	0,20	0,27	0,21	0,34	0,21	0,29	0,01	0,04	0,39	0,36	0,35	0,24	0,52	0,53	0,42	0,38	0,09	0,15
6	Limonene ^{a,b}	3,97	4,55	3,82	4,74	4,02	4,97	3,94	4,75	0,10	0,21	5,99	6,00	6,07	5,40	7,00	6,27	6,35	5,89	0,56	0,45
7	α - cubebene ^{a,b}	0,92	0,83	0,66	0,31	0,40	0,49	0,66	0,54	0,26	0,26	1,46	1,05	1,26	1,02	0,92	0,66	1,21	0,91	0,27	0,22
8	β - cubebene ^{a,b}	0,44	0,45	0,25	0,29	0,34	0,37	0,13	0,11	0,81	0,60	0,59	0,71	0,48	0,34	0,63	0,55	0,17	0,19
9	β - elemene ^a	0,56	0,17	0,66	0,15	0,60	0,25	0,60	0,19	0,05	0,05
10	β - caryophyllene ^{a,b}	1,46	1,31	1,45	1,36	1,01	1,17	1,31	1,28	0,26	0,10	2,38	2,21	2,95	2,04	2,45	2,32	2,60	2,19	0,31	0,14
11	α - caryophyllene ^{a,b}	0,36	0,16	0,39	0,39	0,33	0,19	0,36	0,25	0,03	0,13	0,65	0,24	0,76	0,78	0,75	0,65	0,72	0,56	0,06	0,28
12	β - E farnesene ^{a,b}	0,95	1,27	0,91	0,25	0,49	0,35	0,78	0,62	0,25	0,56	1,19	1,20	1,13	1,10	0,73	0,92	1,02	1,07	0,25	0,14
13	aromadendrene ^a	0,69	0,74	0,72	0,43	0,70	0,58	0,02	0,22
14	germacrene D ^{a,b}	14,95	13,03	16,43	13,11	14,75	13,59	15,37	13,24	0,92	0,30	19,52	18,13	21,39	19,54	20,80	17,45	20,57	18,37	0,96	1,07
15	γ - elemene ^a	3,84	3,29	4,40	3,70	4,19	4,70	4,14	3,90	0,28	0,73
16	α - muurolene ^{a,b}	0,23	0,47	0,10	0,22	0,17	0,34	0,09	0,18	0,37	0,38	0,40	0,30	0,36	0,25	0,38	0,31	0,02	0,07



No	COMPUESTOS	DB5										HPINOWAX									
		CH1		CH2		CH3		\bar{X}		σ		CH1		CH2		CH3		\bar{X}		σ	
		MS ^e	FID ^f																		
17	β - bisabolene ^a	1,56	1,68	1,22	1,48	0,66	0,48	1,15	1,21	0,45	0,64
18	β - gurjunene ^a	0,15	0,43	0,28	0,36	0,22	0,40	0,09	0,05
19	δ - cadinene ^{a,b}	1,50	1,34	1,58	1,05	1,35	1,30	1,48	1,23	0,12	0,16	3,30	2,23	3,61	3,20	3,45	3,35	3,45	2,92	0,16	0,61
20	β - sesquiphellandrene ^{a,b}	0,25	0,28	0,29	0,18	0,27	0,23	0,03	0,07	0,52	0,72	0,58	0,47	0,36	0,39	0,49	0,53	0,11	0,17
21	α - cis copaene 8ol ^a	0,68	0,68	0,45	0,49	0,64	0,20	0,59	0,46	0,12	0,24
22	Spathulenol ^a	1,02	1,09	0,37	0,20	0,12	0,22	0,50	0,50	0,46	0,51
23	γ - selinene ^a	12,00	11,16	10,55	10,05	11,55	12,61	11,37	11,27	0,74	1,28
24	Chromolaenin ^{a,b}	46,01	44,19	45,30	41,13	49,21	44,06	46,84	43,13	2,08	1,73	19,96	20,72	17,56	16,60	16,94	16,75	18,15	18,02	1,60	2,34
25	2-Methoxy-4-methyl-4phenyl-2,5-cyclohexadien-1-onea	0,34	0,40	0,39	0,42	0,37	0,41	0,04	0,01
26	Alloaromadendrene ^b	0,31	0,33	0,45	0,36	0,38	0,34	0,10	0,02
27	γ - muurolene ^b	0,82	0,93	0,88	0,92	0,71	0,72	0,81	0,86	0,09	0,12
28	α - himachalene ^b	1,30	1,69	0,76	0,52	1,03	1,10	0,38	0,83
29	bicyclogermacrene ^b	6,87	4,07	7,94	6,63	7,42	6,90	7,41	5,87	0,54	1,56
30	caryophyllene oxide ^b	0,36	0,24	0,57	0,43	0,47	0,33	0,15	0,13
31	Viridiflorol ^b	18,35	16,07	15,50	15,07	18,13	15,88	17,32	15,67	1,59	0,53
32	No Identificado	2,98	2,17	3,44	4,32	3,21	3,25	0,33	1,52
33	α - cadinol ^b	0,59	0,45	0,73	0,87	0,97	0,58	0,76	0,63	0,19	0,22
34	t - muurolol ^b	0,97	0,65	0,83	0,96	0,94	0,72	0,91	0,77	0,07	0,16
35	16 Kaurene ^b	0,58	0,20	0,89	0,67	0,74	0,43	0,22	0,33



No	COMPUESTOS	DB5						HPINOWAX															
		CH1	CH2	CH3	\bar{X}	σ	CH1	CH2	CH3	\bar{X}	σ												
36	No Identificado	1,58	1,37	0,72	0,55	1,15	0,96	0,61	0,58		
TOTAL							95,99	90,17	TOTAL						98,05	88,47							

a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS

b= Compuestos identificados solo en la columna HP-INOWAX

c = Índice de Kovats determinados experimentalmente.

d = índice de Kovats de acuerdo a la referencia bibliográfica.

e = % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en DB5 y HP-INOWAX (MS)

f = %promedio calculado en base al %del área de picos reportados en DB5 y HP-INOWAX (FID)

\bar{X} = Promedio

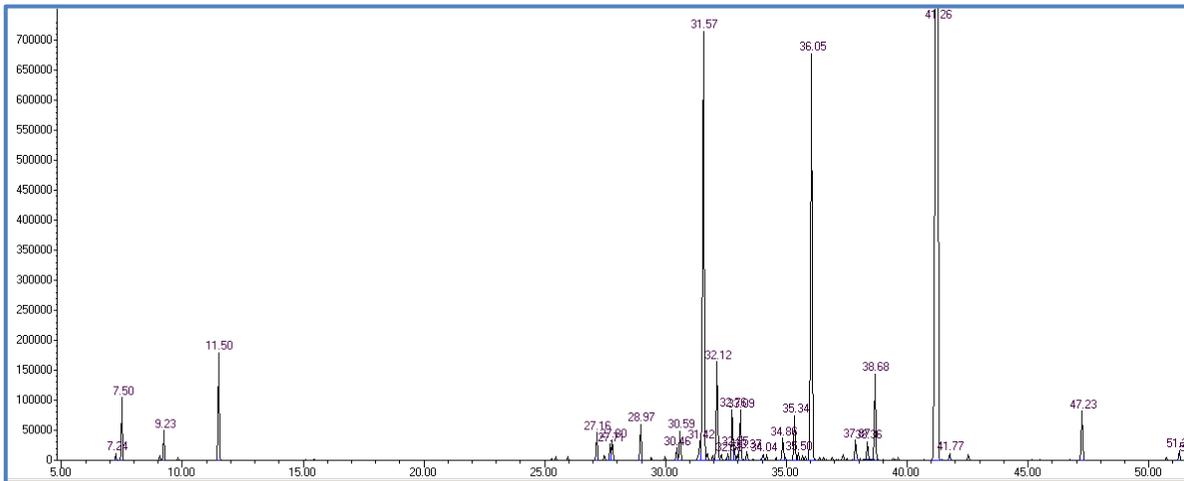
IK^{REF} , Literatura: ^gref 1, ^href 2, ⁱref 3, ^jref 4, ^kref 5, ^lref 6, ^mref 7, ⁿref 8, ^oref 9, ^pref 10, ^qref 11, ^rref 12, ^sref 13, ^tref 14, ^uref 15, ^vref 16, ^wref 17 (anexo V)



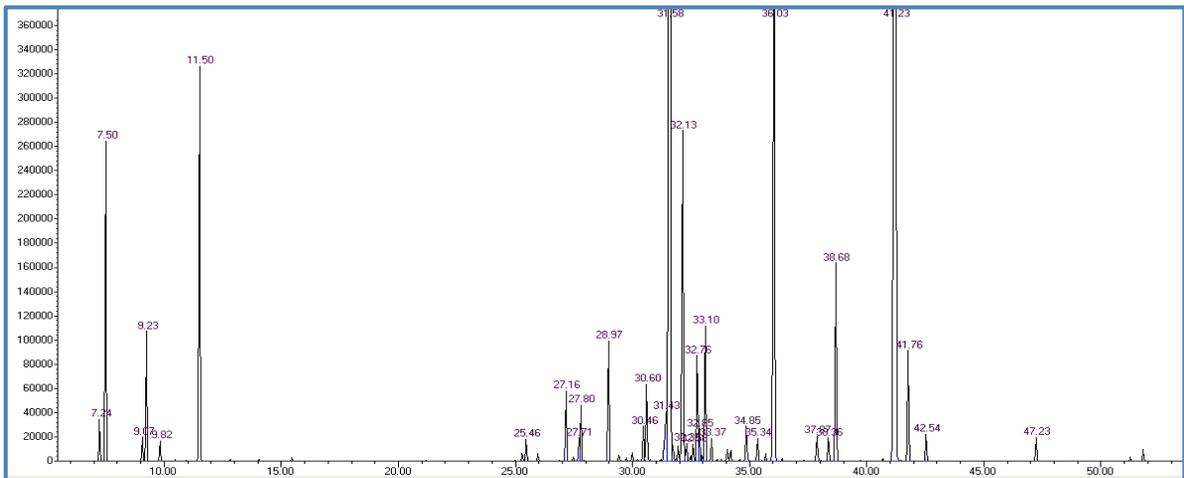
En la siguiente figura se muestran algunos cromatogramas obtenidos del aceite esencial de *C. laevigata* en la columna DB5-MS.

Figura 33. Cromatogramas del aceite esencial de *Cromolaena laevigata* de las tres recolecciones realizadas en DB5-MS. a) Primera Recolección, b) Segunda Recolección, c) Tercera Recolección.

a)

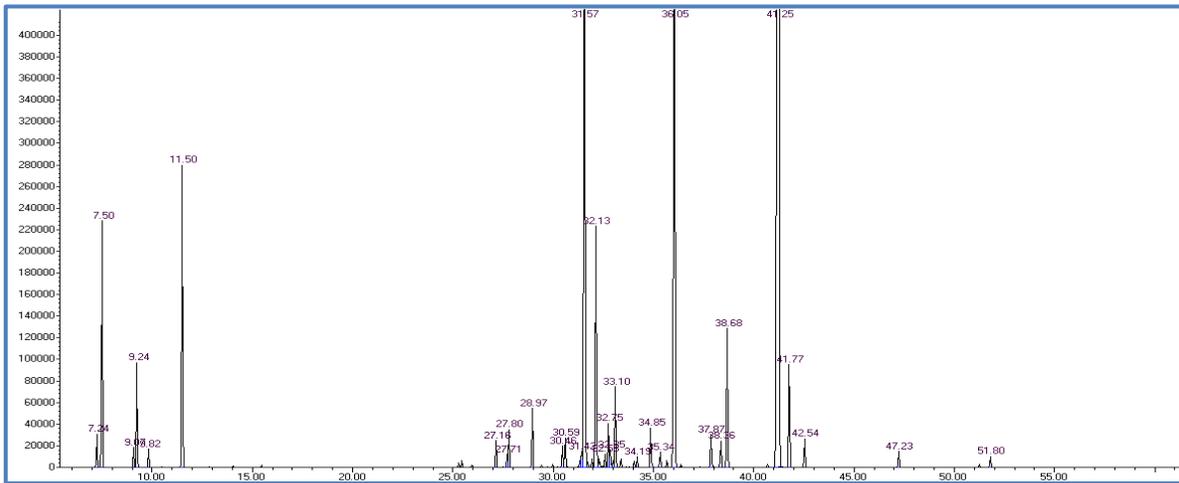


b)





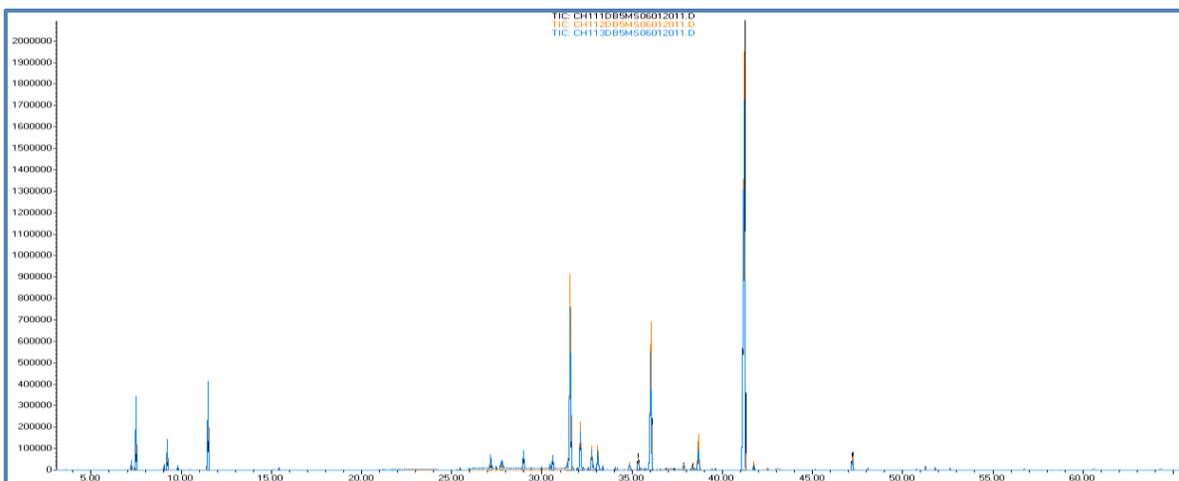
c)



En la figura 35 se muestran los cromatogramas sobrepuestos de los tres aceites esenciales obtenidos por cada recolección respectivamente, dichos cromatogramas son el resultado de la inyección realizada en DB5-MS, e indican gráficamente la presencia de los mismos compuestos en todos los aceites pero con una pequeña variación en cuanto a porcentaje del compuesto.

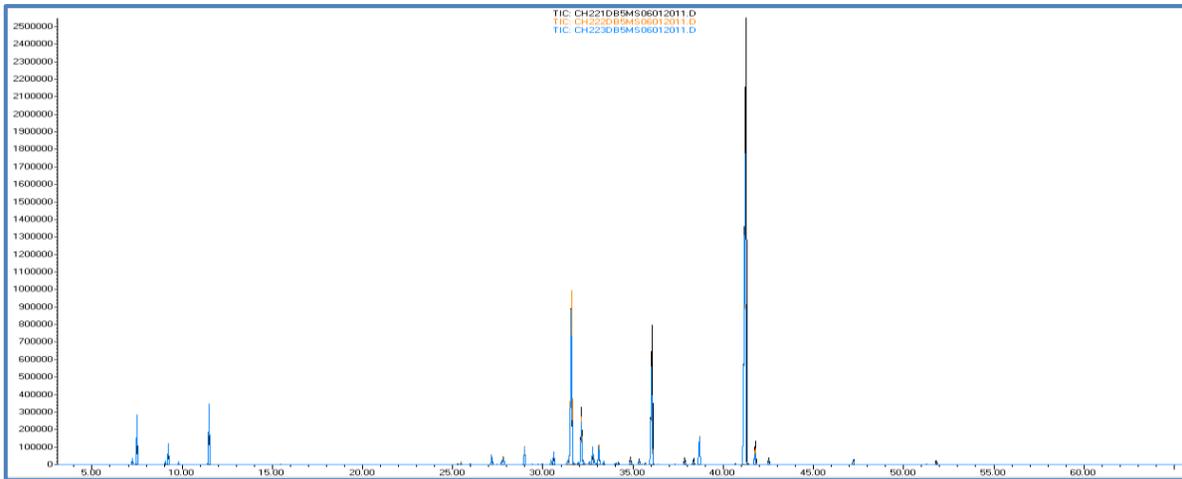
Figura 34. Cromatogramas de los aceites esenciales obtenidos en DB5-MS: a) Primera recolección, b) Segunda recolección, c) Tercera recolección.

a)

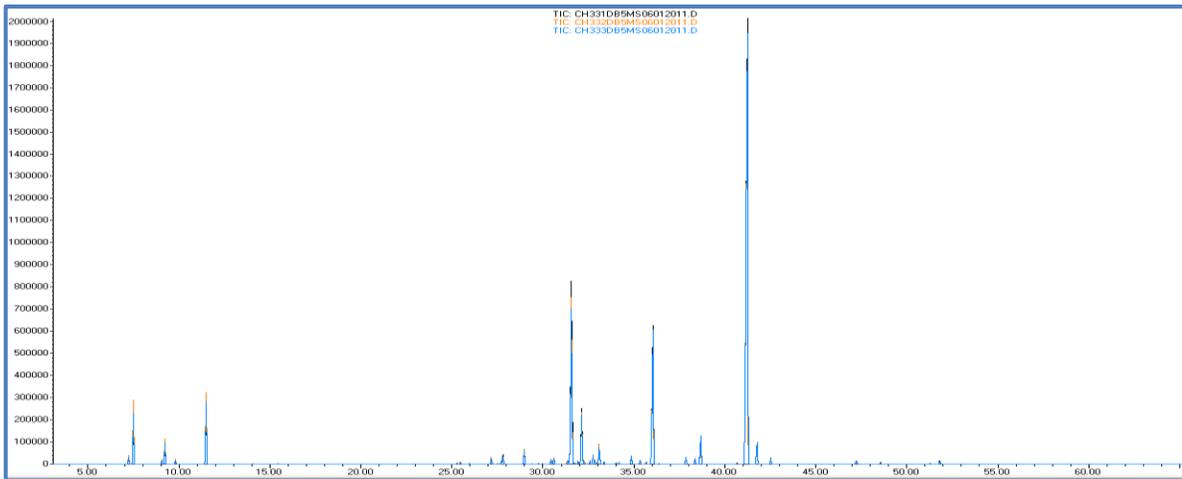




b)



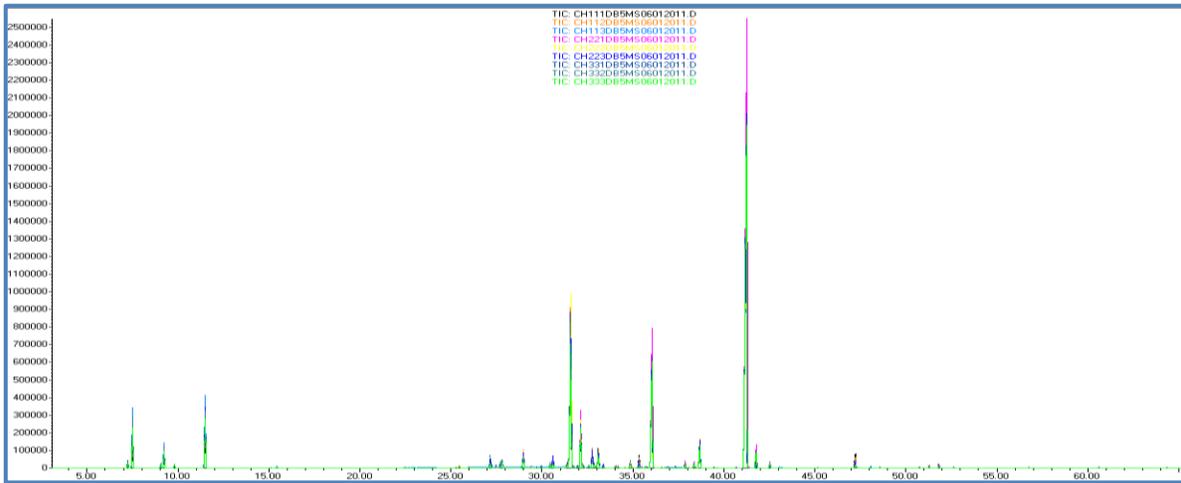
c)



En la figura 35 se indican los cromatogramas sobrepuestos de los nueve aceites esenciales obtenidos en las tres recolecciones realizadas. Así como en los cromatogramas anteriores aquí se presenta la recopilación de todos los aceites esenciales en los cuales se puede comprobar la presencia de una pequeña variación gráfica del porcentaje entre los compuestos.



Figura 35. Cromatogramas de los nueve aceites esenciales obtenidos en las tres recolecciones realizadas.

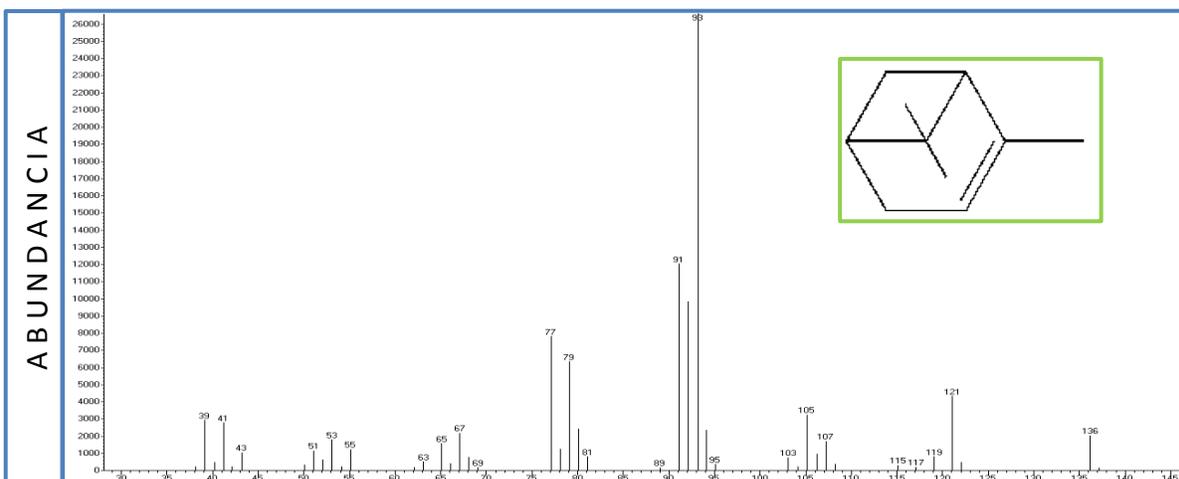


4.6. Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *Chromolaena laevigata*

Los espectros que se muestran a continuación corresponden a los compuestos más representativos presentes en el aceite esencial de *Chromolaena laevigata*.

α Pinene

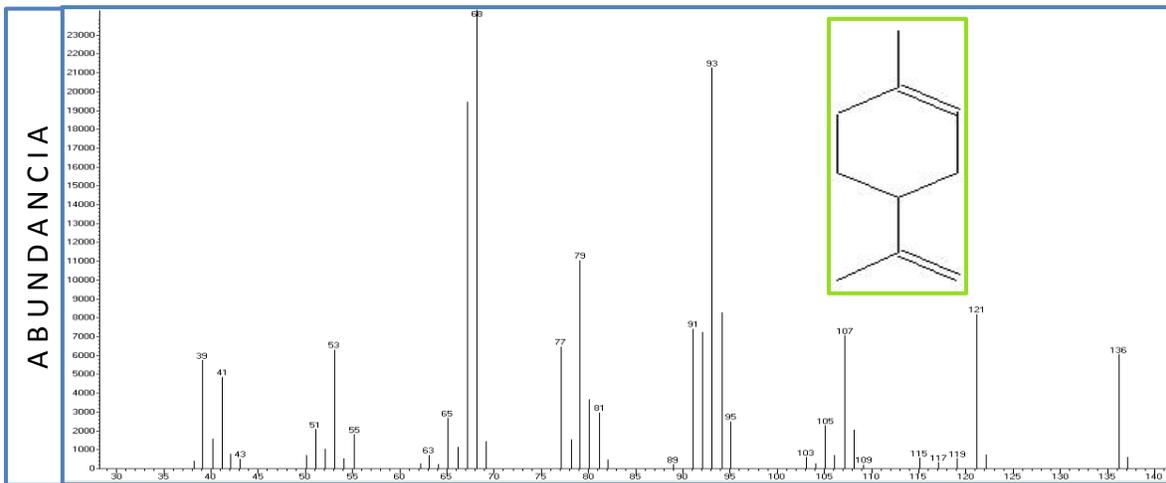
136(7.60), 121(16.24), 119(3.01), 117(0.72), 115(1.10), 107(6.40), 105(12.17), 103(2.81), 95(1.36), 93(100), 91(45.22), 89(0.57), 81(3.00), 79(23.84), 77(29.33), 69(0.68), 67(8.15), 65(5.89), 63(1.86), 55(4.60), 53(6.74), 51(4.33), 43(3.90), 41(10.44), 39(10.97).





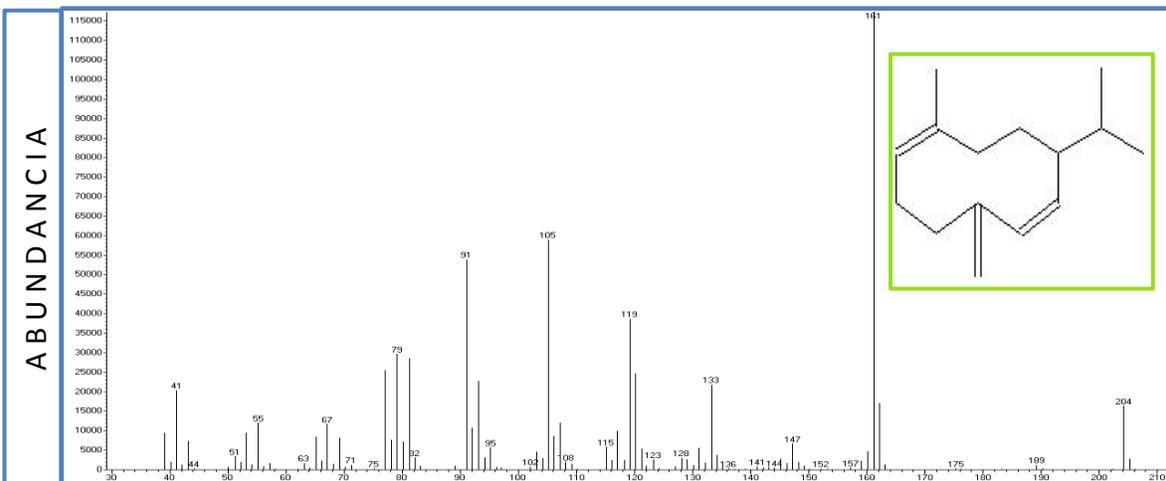
Limonene

136(24.84), 121(33.66), 119(2.17), 117(1.36), 115(2.31), 109(0.88), 107(28.98), 105(9.34), 103(2.45), 95(10.28), 93(87.40), 91(30.44), 89(0.96), 81(12.20), 79(45.39), 77(26.60), 68(100), 65(11.04), 63(2.92), 55(7.43), 53(25.89), 51(8.54), 43(2.10), 41(19.94), 39(23.61).



Germacrene D

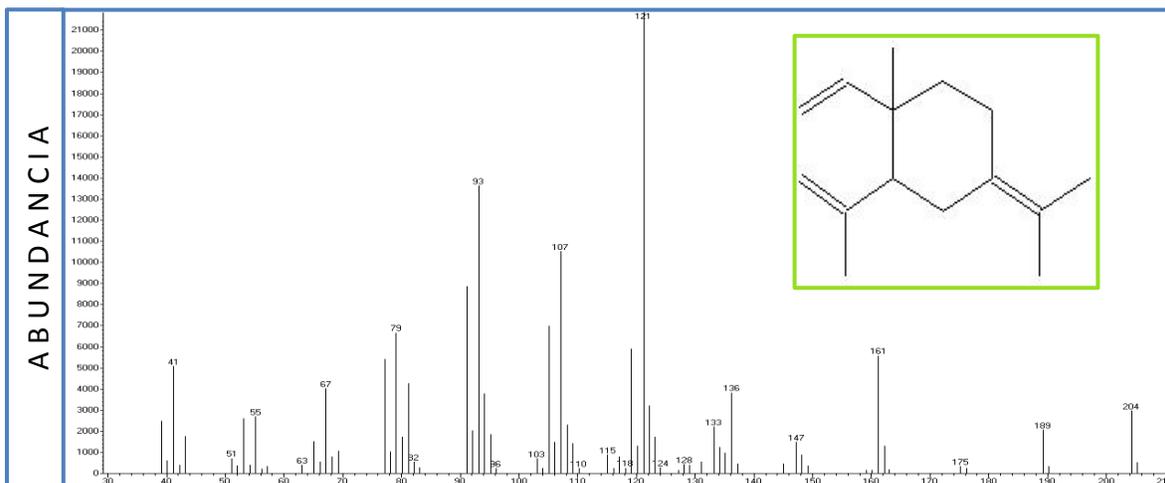
204(13.92), 189(0.97), 175(0.27), 161(100), 157(0.35), 152(0.20), 147(5.65), 144(0.35), 141(0.68), 136(0.24), 133(18.53), 128(2.51), 123(2.15), 119(32.93), 115(4.94), 108(1.63), 105(50.14), 102(0.55), 95(4.81), 91(45.90), 82(2.61), 79(25.21), 75(0.21), 71(1.0), 67(9.91), 63(1.38), 55(10.18), 51(2.88), 44(0.21), 41(17.31).





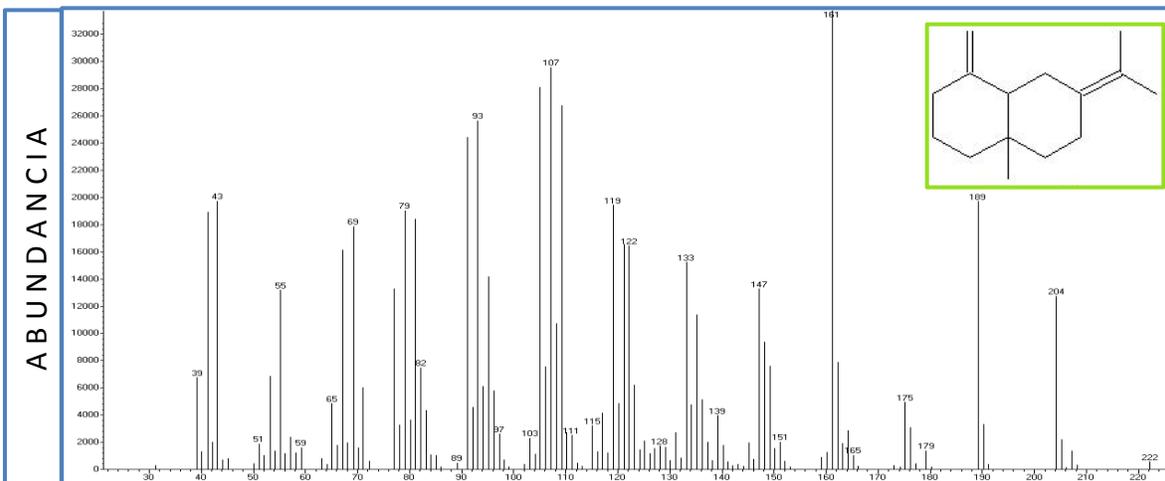
γ Elemene

204(13.54), 189(9.33), 175(1.48), 161(25.47), 147(6.77), 133(10.09), 128(1.88), 124(1.18), 121(100), 118(1.13), 115(3.95), 110(1.09), 107(48.09), 103(3.13), 96(1.04), 93(62.32), 82(2.47), 79(30.46), 67(18.36), 63(1.73), 55(12.26), 51(3.22), 41(23.22).



γ Selinene

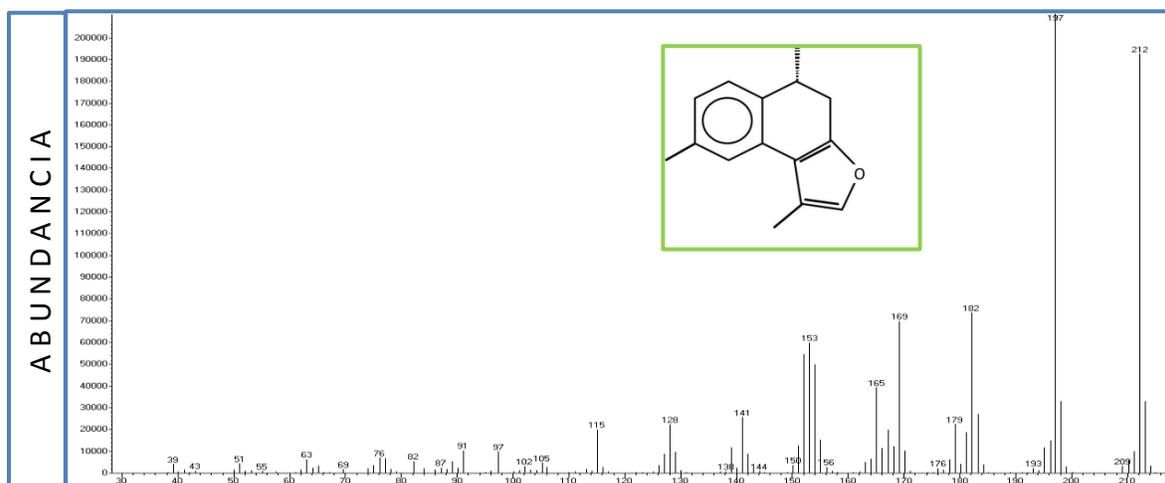
222(1.63), 204(37.73), 189(58.39), 179(4.00), 175(14.57), 165(3.09), 161(100), 151(5.98), 147(39.34), 139(11.69), 133(45.13), 128(5.07), 122(48.71), 119(57.58), 115(9.52), 111(7.42), 107(87.60), 103(6.80), 97(7.69), 93(75.98), 89(1.39), 82(22.11), 79(56.37), 69(52.93), 65(14.33), 59(4.71), 55(39.08), 51(5.53), 43(58.44), 39(20.02).





Chromolaenin

212(91.58), 197(100), 193(1.02), 182(34.86), 179(10.55), 176(0.99), 169(32.37), 165(18.65), 156(1.17), 153(28.60), 150(1.61), 144(0.41), 141(12.23), 138(0.29), 128(10.34), 115(9.35), 105(2.03), 102(1.36), 97(4.48), 91(4.99), 87(1.08), 82(2.55), 76(3.18), 69(0.66), 63(2.78), 55(0.42), 51(1.91), 43(0.47), 39(1.82).



En lo que respecta a estudios bibliográficos sobre la misma especie no fue posible encontrar información, pero se obtuvo información acerca de una especie del mismo género *Chromolaena odorata*²⁸ en la que se logró determinar la presencia de algunos constituyentes químicos como: -pineno (42,2%), germacreno D (9,7%),-copaen-4-ol (9,4%), (E) - cariofileno (5,4%), y geijerene / pregeijerene (7,5%), compuestos que se encontraron en nuestro análisis pero en proporciones diferentes a excepción del geijerene / pregeijerene que no se encontró en ninguno de los aceites estudiados.

²⁸ Owolabi M, Ogundajo A, Yusuf K, Lajide L, Villanueva H, Tuten J, Setzer W., Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria., (2010) 72-78.



4.7. Actividad Biológica del Aceite Esencial

4.7.1. Concentración Mínima Inhibitoria de Bacterias

Mediante el ensayo de bioactividad realizado para evaluar la susceptibilidad de las bacterias se determinó que el aceite esencial de la especie *Chromolaena laevigata* no presento actividad frente a ninguna de las bacterias utilizadas para los análisis realizados (Tabla 7), es decir todas las bacterias presentaron una CMI mayor a 1000 ug/ml, de esta manera se puede decir que es probable que el aceite esencial de *Chromolaena laevigata* a mayores concentraciones si inhiba el crecimiento bacteriano lo cual no es relevante para nuestro estudio ya que se debe tener en cuenta que las concentraciones muy altas tienen el riesgo de presentar toxicidad al momento de ser utilizadas.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente a las bacterias de prueba.

Concentración Mínima Inhibitoria (ug/ml) Bacterias							
ESPECIE EVALUADA	Ec	Kp	Pa	Pv	Sa	Ef	Ea
<i>Chromolaena laevigata</i>	NA						

Ec: *Escherichia coli*; **Kp:** *Klebsiella pneumoniae*; **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **Pv:** *Proteus vulgaris*; **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ea:** *Staphylococcus aureus*; **NA:** No Activo

Comparando los resultados con estudios realizados con el extracto de la misma especie se puede corroborar que ***Chromolaena laevigata*** no presenta ningún tipo de actividad frente a las bacterias a las que fue sometida como son *Echericha coli* y *Pseudomona aeruginosa*, mientras que para *Staphylococcus aureus* si presento actividad biológica¹⁸, dichas variables pueden deberse en un inicio a que en dicho estudio se utilizó el extracto de las hojas secas de la especie lo cual puede ser un factor muy importante en la presencia o ausencia de actividad, además de ello en los extractos se han identificado algunos compuestos que no fueron identificados

¹⁸ Flores M., D'Armas H., Herrera H., *Identification of some chemical constituents from the Chromolaena laevigata leaves by gas chromatography-mass spectrometric*. 2007, vol.15, no.3, p.421-432.



en el aceite esencial, de ahí que dicha variabilidad puede deberse a que las condiciones y el mismo producto de partida utilizado para los ensayos fueron tratados de maneras muy diferentes.

Por otro lado de acuerdo a un estudio realizado con una planta del mismo género *Chromolaena odorata* se determinó que para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* presentaron una *CMI mayor a 1000* µg/mL, resultados que presentan relación total a los resultados obtenidos en nuestro estudio.

4.7.2. Concentración Mínima Inhibitoria de Hongos

A continuación se muestran las concentraciones de inhibición

Tabla 9. Concentraciones de inhibición

Concentraciones de Inhibición ug/ml	
A	1000
B	500
C	250
D	125
E	62.5
F	31.25
G	15.62
H	7.81

De acuerdo a la placa TC₉₆ el orden de cada una de las letras corresponde al valor de inhibición del aceite esencial:
A: 1000 ug/ml, B: 500 ug/ml, C: 250 ug/ml, D: 125 ug/ml, E: 62.5 ug/ml, F: 31.25 ug/ml, G: 15.62 ug/ml, H: 7.81 ug/ml.

Se evaluó la actividad del aceite esencial de *Chromolaena laevigata* frente a tres hongos, en dicho estudio se determinó que el aceite esencial si presenta actividad frente a *Trichophytum rubrum* y *Trichophytom Mentagrophytes* como se muestra en la tabla 9 y 10 respectivamente; mientras que para *Aspergillus Niger* no presentó actividad alguna (Tabla 11). De acuerdo a estudios realizados con una especie del mismo género *Chromolaena odorata*²⁸ se determinó que dicha especie si presenta actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* (CIM = 78 mg / ml), resultados que podemos atribuir a que dicho estudio fue realizado con otra

²⁸ Owolabi M, Ogundajo A, Yusuf K, Lajide L, Villanueva H, Tuten J, Setzer W., Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria., (2010) 72-78.



especie y quizá bajo otras condiciones de extracción del aceite esencial, así mismo se encontraron otros compuestos como el geijerene y pregeijerene (7.5%) entre otras variantes que pudieron ser los responsable de dichas variables.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente *Trichophytum rubrum*.

CMI (ug/ml) <i>Trichophytun rubrum</i>		
	Code	inhibicion
1ra. Recolección: 3 destilaciones	CH111	125
	CH112	125
	CH113	125
2da. Recolección: 3 destilaciones	CH121	250
	CH122	125
	CH123	125
3ra. Recolección: 3 destilaciones	CH131	125
	CH132	125
	CH133	125

CH: *Chromolaena laevigata*; 1^{er} N° de cada código representa el lugar de recolección; el 2^{do} N° representa la recolección y la 3^{er} N° representa la destilación

Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite ensayado frente *Trichophytom Mentagrophytes*.

CMI (ug/ml) <i>Trichophyton Mentagrophytes</i>		
	Code	inhibicion
1ra. Recolección: 3 destilaciones	CH111	250
	CH112	250
	CH113	250
2da. Recolección: 3 destilaciones	CH121	250
	CH122	250
	CH123	250
3ra. Recolección: 3 destilaciones	CH131	250
	CH132	125
	CH133	250

CH: *Chromolaena laevigata*; 1^{er} N° de cada código representa el lugar de recolección; el 2^{do} N° representa la recolección y la 3^{er} N° representa la destilación.

Capítulo V.
Conclusiones



V CONCLUSIONES

- ⊙ El estado fenológico con el que se obtuvo mayor rendimiento de aceite esencial es durante la foliación.
- ⊙ La materia presenta un mayor rendimiento cuando se encuentra en estado fresco.
- ⊙ Se logró obtener un rendimiento del 0,18%, es decir que obtuvimos los volúmenes necesarios para la realización de las pruebas planteadas.
- ⊙ En cuanto a la composición química se determinaron 26 compuestos en la columna DB5-MS, los mismos que fueron identificados mediante los índices de Kovats y los espectros de masas, los compuestos identificados representan el 96.5%.
- ⊙ Los compuestos mayoritarios en la columna DB5-MS fueron: Chromolaenin (46.84%), Germacrene D (15,37%), γ -selinene (11,52%), γ -elemene (4,3%), limonene (3,94%), α -pinene (2,85%), β -cadinene (1,48%), β -caryophyllene (1,31%), β -pinene (1,18%), β -bisabolene (1,15%).
- ⊙ En la columna HP-INOWAX se determinaron 26 compuestos de los cuales 23 fueron identificados.
- ⊙ Los compuestos mayoritarios presentes en la columna HP-INOWAX fueron: germacrene D (20,57), viridiflorol (16,92), limonene (6,20), α -pinene (4,60), β -cadinene (3,45), β -caryophyllene (2,59), β -pinene (2,14).
- ⊙ El aceite esencial de *Chromolaena laevigata* no presentó ningún tipo de actividad frente a las bacterias.



- © *Chromolaena laevigata* si presento actividad frente a dos de los tres hongos evaluados, cuando se evaluo la ctividad frente a *Trichuphytum rubrum* se evidencio una inhibición a 125 ug/ml.

- © Por otro lado la evaluación realizada de aceite esencial de *Chromolaena laevigata* frente a *Trichophytom Mentagrophytes* presento una inhibición a 250 ug/ml.

Capítulo VI.
Recomendaciones

VI RECOMENDACIONES

- © Verificar si en la zona de recolección existe abundante población silvestre con el fin de evitar la extinción en la zona de estudio.

- © Realizar pruebas previas para determinar cuáles son las mejores condiciones en las que se puede destilar la materia vegetal, es decir tratar de establecer en qué estado fenológico hay un mayor rendimiento de aceite esencial.

- © En lo posible trata de realizar la selección y recolección de la materia vegetal teniendo en cuenta que las condiciones de recolección sean las mismas en todas las recolecciones para evitar errores futuros.

- © Si existe interés científico o industrial de realizar estudios futuros sobre esta especie propongo que se obtienen resultados muy buenos en cuanto a rendimiento de aceite esencial cuando la materia es recolectada en estado de foliación y destilada en fresco, esto de acuerdo a la experiencia realizada.

Capitulo VII.

Anexos



ANEXO I

DETERMINACION DE HUMEDAD

Principio:

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

Material

- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

Procedimiento

- ⊙ Pesar en una capsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gramo de la muestra; seguidamente colocarla durante 15min en la lámpara ULTRA X.
- ⊙ Enfriar la capsula en el desecador por 15 min. aproximadamente, hasta que la temperatura de la capsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- ⊙ Colocar la capsula nuevamente en la estufa durante 15 min, enfriar en el desecador y pesar.
- ⊙ Repetir el procedimiento hasta que el peso de la capsula sea constante.

Cálculo

$$Hm = (m1 - m2 / m1 - Cv) * 100$$

Dónde:

Hm = % de humedad

C.V. = peso de la capsula vacía (gr).

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

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

**ANEXO II****CALCULO DEL RENDIMIENTO**

Se realizó algunas pruebas con lo cual se logró determinar que el rendimiento del aceite esencial es menor en la materia vegetal seca en comparación con el rendimiento en materia vegetal fresca, por lo tanto las los ensayos se realizaron con materia fresca.

- © Se tomó el peso total de la materia vegetal fresca y se determinó su humedad anexo 1.

P = 2950gr.

Hm= 50 %

V = 4,6 ml

Cálculo:

$$R = (\text{vol} / \text{P.M}) \times 100$$

R= rendimiento

Vol= volumen obtenido en la destilación

P.M= peso total de la muestra destilada

- © Se realizó varias experiencias en las cuales se determinó que el mayor rendimiento se lo obtiene en estado fresco.



ANEXO III

DETERMINACION DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

Principio:

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

Nota:

- © Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- © La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

Aparatos:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°C +/- 0.2°C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

Procedimiento:

- © **Pignómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de la balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.



- © **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C. Ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

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

Expresión de resultados:

La densidad relativa se la expresa con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

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

m0 = masa en gramos del picnómetro vacío.

m1 = masa en gramos del picnómetro con agua.

m2 = masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresará los resultados con tres decimales.



ANEXO IV

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

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

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

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

Aparatos:

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

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

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

**Modo de operación:**

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

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida.

Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Nota:

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



ANEXO V

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INDICE DE KOVATS

1. Adams R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Ms Spectrometry*, 2009, 4th Edition.
2. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S. *Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) 1999*, Schum. Flavour Fragr. J., 14, 411-414.
3. Elias, V.O.; Simoneit, B.R.T.; Cardoso, J.N. *Analysis of volatile sesquiterpenoids in environmental and geological samples J. Hi. Res. Chromatogr.* 1997, 305-309.
4. Adams, R.P.; González Elizondo, M.S.; González Elizondo, M.; Slinkman, E., *DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico*, Biochem. Syst. Ecol., 2006, 34, 205-211
5. Jelen H.H.; Mirocha C.J.; Wasowicz E.; Kaminski E., *Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes*, Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61, 11.
6. Haznagy-Radnai, E.; Szigle, Sz.; Mathe, I., *Analysis of the essential oil of Downy woadwort (*Stachys Germanica* L.)*, Acta Fac. Pharm. Univer. Comenianae, 2007, 54, 78-83.
7. Sharififar, F.; Mozaffarian, V.; Moradkhani, S., *Comparison of antioxidant and free radical scavenging activities of the essential oils from flowers and fruits of *Otostegia persica* Boiss.*, Pakistan J. Biol. Sci., 2007, 10, 21



8. Source: Siani, A.C.; Ramos, M.F.S.; Menezes-de-Lima, O., Jr.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Fernandez-Ferreira, E.; Soares, R.O.A.; Rosas, E.C.; Susunaga, G.S.; Guimarães, A.C.; Zoghbi, M.G.B.; Henriques, M.G.M.O. *Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium J. Ethnopharmacol.* 1999, 57-69.
9. Loayza I, Abujder, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Ida Jean F; *Essential oils of baccharis salicifolia, b. latifolia and b. dracunculifolia*; vol 38, No 2, pp 381-389, 1995.
10. Choi, H.-S. *Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil.* 2003, J. Agric. Food Chem.
11. Szafranek, B., Chrapkowska, K., Ska, M.P., and Szafranek, J.. *Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties.* 2005, J. Agric. Food Chem.