

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA
DE DOS VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES ANDINOS *Clinopodium
nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers**

AUTOR:

PABLO ANDRÉS GUERRA CAJAS

TUTOR:

PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

Quito, febrero del 2016

Cesión de derechos de autor

Yo, Pablo Andrés Guerra Cajas con documento de identificación N° 1725949257, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA DE DOS VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES ANDINOS *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



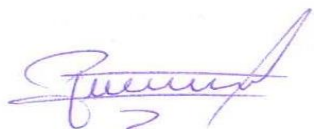
Pablo Andrés Guerra Cajas
1725949257

Quito, febrero del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA DE DOS VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES ANDINOS *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. realizado por Pablo Andrés Guerra Cajas, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2016



Paco Fernando Noriega Rivera

C.I: 0602421323

Dedicatoria

Todo esfuerzo y logros realizados a lo largo de mi carrera, además de este trabajo, quiero dedicar especialmente a mis padres. Ellos son mi principal apoyo y quienes están conmigo en todo momento. Sin ustedes nada de esto podía ser posible, gracias por darme el mejor ejemplo.

A mis hermanos Gabriela y José Antonio por siempre estar conmigo.

A mis abuelos Blanca, Washington, Mercedes y Sixto por permanecer siempre conmigo, preocuparse en todo momento y apoyarme.

A mi familia y amigos. Gracias

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme realizar el presente trabajo de investigación. Agradecimiento especial a mi tutor, Dr Paco Noriega Rivera, quien creyó en mí para formar parte de su grupo de investigación. Por todas sus enseñanzas y apoyo para realizar la investigación.

A los docentes Wilson Tapia y Germania Karolys por su amistad y apoyo incondicional. A Christian Larenas y Edison Osorio, por el apoyo brindando en la realización del proyecto.

A todos, Gracias.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	3
Marco conceptual.....	3
1.1. Descripción botánica de las especies en estudio	3
1.1.1. <i>Baccharis latifolia</i> (Ruiz & Pav.) Pers.	3
1.1.1.1. Familia Asteraceae	3
1.1.1.2. Género Baccharis	4
1.1.1.3. Clasificación botánica	4
1.1.1.4. Descripción Botánica	5
1.1.1.5. Usos etnobotánicos	6
1.1.1.6. Estudios farmacológicos y químicos.....	6
1.1.2. <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunt) Kuntze.....	7
1.1.2.1. Familia Lamiaceae	7
1.1.2.2. Género Clinopodium.....	7
1.1.2.3. Clasificación botánica	8
1.1.2.4. Descripción botánica.....	8
1.1.2.5. Usos etnobotánicos	9
1.1.2.6. Estudios farmacológicos y químicos.....	10
1.2. Aceites esenciales.....	10
1.2.1. Definición	10
1.2.2. Propiedades físicas y químicas	11
1.2.3. Usos	11
1.2.4. Aceites esenciales como fuente de antioxidantes	12

1.2.5. Investigaciones de los aceites esenciales en estudio.....	13
1.2.6. Importancia económica.....	14
1.2.7. Métodos de extracción de aceites esenciales	15
1.3. Actividad antioxidante y métodos de evaluación.....	17
1.3.1. Antioxidante: Definición y modo de acción	17
1.3.2. Radicales libres: Definición y modo de acción	18
1.3.3. Métodos de evaluación de actividad antioxidante	19
1.3.3.1. Método DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)	19
1.3.3.2. Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfúrico)	20
1.3.3.3. El método de decoloración del β -caroteno (β -caroteno test)	21
1.3.4. Evaluación de la composición química	22
1.3.4.1. Cromatografía de gases acoplada a masas (GC MS)	23
1.3.5. Estudios bioautográficos.....	24
1.3.5.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	24
Capítulo 2	26
Materiales y métodos	26
2.1. Material vegetal	26
2.2. Proceso de extracción de aceites esenciales	26
2.3. Cromatografía de gases acoplada a masas.....	27
2.4. Identificación química de aceites esenciales	27
2.5. Valoración de la capacidad captadora de radicales libres método DPPH	28
2.6. Valoración de la capacidad captadora de radicales libres método ABTS	30
2.7. Tratamiento estadístico para los métodos DPPH y ABTS.	31
2.8 β -caroteno test	32

2.9 Método bioautográfico: Cromatografía en capa fina (TLC-DPPH).....	34
Capítulo 3.....	36
Resultados y discusiones.....	36
3.1. Extracción de aceites esenciales	36
3.2. Identificación de la composición química	36
3.3. Valoración capacidad captadora de radicales libres métodos DPPH y ABTS	40
3.3.1. Método DPPH.....	40
3.3.3. Método ABTS.....	42
3.3.4. Evaluación comparativa de los métodos DPPH y ABTS	44
3.4. β -caroteno test	47
3.5. Método Bioautográfico.....	50
Discusión.....	52
Conclusiones	54
Recomendaciones.....	55
Referencias.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía <i>Baccharis latifolia</i>	5
Tabla 2. Taxonomía <i>Clinopodium nubigenum</i>	8
Tabla 3. Composición química del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> y <i>Baccharis latifolia</i>	37
Tabla 4. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> -DPPH.	40
Tabla 5. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> -DPPH.	41
Tabla 6. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Baccharis latifolia</i> -DPPH.	41
Tabla 7. Capacidad captadora de radicales libres de BHA-DPPH.	42
Tabla 8. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> -ABTS.	43
Tabla 9. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> -ABTS.	43
Tabla 10. Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de <i>Baccharis latifolia</i> -ABTS.	44
Tabla 11. Capacidad captadora de radicales libres de BHA-ABTS.....	44
Tabla 12. Comparación de los valores promedio IC ₅₀ según los métodos DPPH y ABTS.	45
Tabla 13. Evaluación de Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> -β caroteno test.....	48

Tabla 14. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Clinopodium nubigenum</i> - β caroteno test.	48
Tabla 15. Evaluación de la Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Baccharis latifolia</i> - β caroteno test.	49
Tabla 16. Evaluación de la Actividad antioxidante de BHA- β caroteno test.	49

Índice de figuras

Figura 1. Destilador por arrastre de vapor (40 L)	17
Figura 2. Reacción del radical DPPH con agente antioxidante	20
Figura 3. Oxidación de ABTS por parte de persulfato de potasio generando el radical ABTS y su reacción con un compuesto antiradical (AOH).	21
Figura 4. Oxidación del ácido linoleico generando un radical peróxido en su carbono 13.....	22
Figura 5. Comparación de valores IC ₅₀ de aceites esenciales por los métodos DPPH y ABTS	45
Figura 6. Gráfica de medias de los valores IC ₅₀ . Método DPPH.....	46
Figura 7. Gráfica de medias de los valores IC ₅₀ . Método ABTS	47

Resumen

En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante de dos aceites esenciales de especies andinas *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación. Se utilizó el método β -caroteno test para la evaluación directa de actividad antioxidante, además se evaluó la capacidad captadora de radicales libres por los métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico) (ABTS). El análisis e identificación química de ambos aceites se realizó por cromatografía de gases acoplada a masas (GC MS), detectando en el aceite de *Clinopodium nubigenum* 55 compuestos , de los cuales 45 fueron identificados, los compuestos mayoritarios fueron acetato de carvacrol (42,17%), carvacrol (20,66 %), pulegona (6,3%), timol (5,54%) y p-cimeno (5,2%). En el aceite esencial de *Baccharis latifolia* se detectaron 19 compuestos, de los cuales 18 fueron identificados, los compuestos mayoritarios fueron α -felandreno (18,11%), limoneno (17,04%), norhalkendin (9,50%) y andro encecalinol (5,41%). De los aceites en estudio, *Clinopodium nubigenum* presentó una actividad antioxidante significativa similar al del aceite esencial de *Thymus vulgaris* usado como referente natural, en el aceite de *Baccharis latifolia* la actividad fue moderada. Para identificar a las moléculas responsables de la actividad antioxidante se usó el método bioautográfico TLC-DPPH. Dichas moléculas fueron reveladas por cromatografía de gases acoplada a masas (GC MS).

Palabras clave: *Clinopodium nubigenum*, *Baccharis latifolia*, aceite esencial, actividad antioxidante, GC MS.

Abstract

This investigation reports the antioxidant activity of essential oils of two Andean species *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze and *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., which were obtained by hydro-distillation. β -carotene test was the direct method for the antioxidant activity evaluation, besides the free radical scavenging capacity was evaluated by the methods 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic) acid (ABTS). The chemical analysis and identification of both essential oils was conducted by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC MS), detecting 55 compounds in *Clinopodium nubigenum*, 45 of them were identified, the majority compounds were carvacrol acetate (42, 17%), carvacrol (20.66%), pulegone (6.3%) thymol (5.54%) and p-cymene (5.2%). In *Baccharis latifolia* essential oil 19 compounds were detected, 18 of them were identified, the majority compounds were α -phellandrene (18.11%), limonene (17.04%), norhalkendin (9.50%) and andro encecalinol (5.41%). *Clinopodium nubigenum* showed significant antioxidant activity similar to the essential oil of *Thymus vulgaris* used as natural reference. In *Baccharis latifolia* oil activity was moderate. TLC-DPPH method was used to identify the responsible molecules for the antioxidant activity. These molecules were revealed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC MS).

Keywords: *Clinopodium nubigenum*, *Baccharis latifolia*, essential oil, antioxidant activity, GC MS.

Introducción

Un antioxidante es toda aquella molécula capaz de evitar o prevenir el proceso oxidativo de otras moléculas, actuando como donador de electrones. (Cano & Marino, 2005) Ante la falta de moléculas antioxidantes en el organismo, ya sea por baja producción, factores externos negativos y especialmente en personas con edades avanzadas, se puede generar estrés oxidativo, que es el resultado de un exceso de radicales libres en el cuerpo humano, lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades cancerígenas, cerebrovasculares, neurodegenerativas, entre otras (Mora, Soporte Nutricional Universal, 2002).

Los aceites esenciales son compuestos líquidos volátiles sintetizados por las plantas, los cuales se pueden obtener de diferentes partes de la misma (Martínez A. , 2001). Los aceites esenciales tienen gran variedad de componentes o principios activos como compuestos fenólicos, terpenos, e hidrocarburos que están relacionados con la actividad antioxidante y cuentan con uso muy extenso en las industrias cosméticas, alimenticias y farmacéuticas (Iglesias, 2006).

Hoy en día, las plantas han ganado particular interés de estudio en referencia a los usos etnobotánicos para encontrar fuentes naturales de compuestos antioxidantes. El Ecuador posee gran diversidad de especies vegetales, muy utilizadas en medicina tradicional y ancestral por diferentes etnias; contradictoriamente se evidencia la falta de estudios científicos que comprueben su actividad o función concreta, una de ellas la antioxidante. En la región andina del Ecuador se encuentran varias especies nativas

que pueden ser interesantes para dar continuidad a estudios relacionados con la identificación y evaluación de aceites esenciales con actividad antioxidante.

Es por eso que la presente investigación planteó como objetivo principal evaluar la actividad antioxidante de aceites esenciales de dos plantas andinas: *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers, por los métodos DPPH, ABTS y β -caroteno test, además de la identificación química de los aceites esenciales por cromatografía acoplada a masas (GC MS), así como la identificación de las moléculas responsables de la actividad antioxidante por Cromatografía en capa fina (HPTLC-DPPH). La evaluación y comparación se realizó con el referente natural, aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Es ahí donde se propuso la hipótesis nula: la media de los IC₅₀ de los aceites esenciales en estudio son estadísticamente similares con las del referente natural. Como hipótesis alternativa: la media de los IC₅₀ de los aceites esenciales en estudio no son estadísticamente similares con las del referente natural.

Ante lo expuesto anteriormente, es sumamente importante valorar materias vegetales como posibles fuentes naturales de antioxidantes, para ser utilizados en las formulaciones de las industrias de alimentos y fármacos, con el fin de reemplazar a los compuestos sintéticos que tienen ciertas restricciones por algunos estudios que dan su posible relación con enfermedades carcinogénicas.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1. Descripción botánica de las especies en estudio

Baccharis latifolia y *Clinopodium nubigenum* son especies andinas con mucho valor por sus usos etnobotánicos. Dichas especies son las utilizadas en la presente investigación. A continuación se detallan todos los aspectos importantes de ambas especies.

1.1.1. *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

1.1.1.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae) es una de las familias del reino vegetal con mayor potencial económico debido a sus extensos cultivos para diferentes fines. Abarca aproximadamente más de 1.000 géneros y 20.000 especies (Krarup & Moreira, 1998). En el Ecuador la familia Asteraceae generalmente comprende arbustos o hierbas, ocupando el segundo lugar de especies endémicas. Se conocen alrededor de 360 especies propias de nuestro país distribuidas principalmente en Los Andes, aunque también se localizan en la Costa, Amazonía y Galápagos (Barriga, Montúfar, & Tye, 2011).

Son plantas y raramente arbustos o árboles cosmopolitas, herbáceos anuales o perennes que pueden presentar o no látex (Herbario Universidad de Navarra, 2008). Utilizadas ampliamente en jardinería, alimentación y medicina (Herbario Universidad de Valencia, 2006).

1.1.1.2. Género *Baccharis*

Dentro de la familia Asteraceae, el género *Baccharis* es el que ocupa mayor cantidad de especies, aproximadamente 500. Es un género extenso y diversificado, cuyo origen es América del Norte, Centro y Sur (Valarezo, y otros, 2013). Se pueden encontrar desde el sur de los Estados Unidos hasta el extremo austral de Chile y Argentina (Rubio, 2013).

Conocidas como las “chilcas”, son consideradas malezas que poseen gran similitud entre especies. El género *Baccharis* es un arbusto glabro que puede llegar a medir aproximadamente 1 y 2 m de altura, con ramas largas y delgadas con hojas ovaladas-lanceoladas dentadas de color verde claro en su envés, de 5 cm de longitud y 2 cm de ancho (Rubio, 2013).

Especies del género *Baccharis* son muy utilizadas en medicina tradicional, especialmente en algunas culturas de América del Sur gracias a la diversidad de funciones biológicas que poseen. Se detalla actividad antiinflamatoria (Abad, y otros, 2006), gastroprotectora, analgésica en migrañas, dolores corporales y menstruales. También se detallan usos terapéuticos para limpiados, efectos antioxidantes, reumáticos (Abad & Bermejo, 2007), antisépticos y antibacteriales (Simonsen, y otros, 2009).

1.1.1.3. Clasificación botánica

Nombre común: Chilca, Chilca larga

Tabla 1.

Taxonomía *Baccharis latifolia*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Baccharis</i>
Especie:	<i>B. latifolia</i>

Nota: Tomado de Persoon, C. H. (1807). *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. En Tropicos

1.1.1.4. Descripción Botánica

La chilca (*Baccharis latifolia*) es una de las 46 especies del Género *Baccharis* que está ampliamente distribuida en el Ecuador, en provincias como Pichincha, Imbabura, Cañar, Cotopaxi, Chimborazo, Bolívar, Azuay, Loja, Napo, Sucumbíos y Zamora Chinchipe (Valarezo, y otros, 2013).

Puede crecer en terrenos y zonas secas, cerca de carreteras, lugares alejados y arenosos, desde los 2400 a 3200 m.s.n.m. Es un arbusto de aspecto glabro altamente ramoso, que puede medir desde 1,5 m hasta los 4 m de altura, cubiertos con puntos glandulosos. Sus hojas son lanceoladas opuestas, con margen cerrado-dentado y resinosas, que llegan hasta el ápice logrando tener una longitud entre 10 y 12 cm y un ancho de 3 a 6 cm. Ramos estriados y resinosos; la inflorescencia surge de las axilas de las ramas, varias flores pentámeras muy pequeñas con pétalos blancos de forma obovada, capítulos masculinos con 20 a 22 flores estaminadas, capítulos femeninos con 120 a 130 flores pistiladas (Gupta, 1995). El fruto es una cápsula ovoide y sus semillas son oblongas con arilo blanco (Aragadvay, 2009).

1.1.1.5. Usos etnobotánicos

En varios países en donde se encuentra la chilca, se detallan usos medicinales tradicionales para dolores de estómago, hepáticos y problemas renales, además uso en fracturas, reumatismo (Busmann & Glenn, 2011), diarreas, insomnio, asma, diabetes y tratamientos antiinflamatorios (Sequeda-Castañeda, Célis, & Luengas-Caicedo, 2015). También cumple funciones desinflamatorias contra la bronquitis y el catarro (Aragadvay, 2009).

En el Ecuador, la chilca es utilizada por las diferentes etnias con diversos fines medicinales ancestrales. Los Mestizos, en la provincia de Pichincha utilizan las hojas asadas para curar y aliviar las torceduras y dislocaciones de huesos, diarreas, hemorroides, dolores de cabeza y muelas. Los Kichwa de la Sierra-Loja utilizan el extracto de la planta para tratar heridas con inflamación; además, para las dolencias e inflamaciones de los órganos sexuales femeninos internos. Algunas etnias pertenecientes a las provincias de Imbabura y Napo utilizan la chilca para tratar heridas e infecciones de la piel (de la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008).

1.1.1.6. Estudios farmacológicos y químicos

Las hojas de *Baccharis latifolia* contienen aceite esencial, resina, derivados del germacreno, diterpenos, labdanos, clerodanos, limoneno, d-germacreno, δ -cadineno, β -cubebeno, epi- α -bisabolol (Sequeda-Castañeda, Célis, & Luengas-Caicedo, 2015), galotaninos, leucoantocianidinas, compuestos fenólicos, esteroides, cumarinas, alcaloides, triterpenos (friedelina) y flavonoides como la rutina y quercetina (Vadémecum colombiano de plantas medicinales, 2008); (Gupta, 1995).

En Bolivia, utilizando los extractos acuosos y orgánicos de diferentes especies del género *Baccharis*, determinaron la actividad antiinflamatoria moderada de *Baccharis*

latifolia midiendo la capacidad de inhibición sobre algunos precursores inflamatorios (Abad, y otros, 2006); (Gonzales, Villca, & Loza, 2007). El extracto metanólico inhibió la producción de especies reactivas de oxígeno (Pérez García, Marín, Adzet, & Cañigüeral, 2001). Además, se determinó la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 por los extractos de hexano, diclorometano y acuoso (Abad, y otros, 2006). Otro estudio realizado en Perú demostró la efectividad antihelmíntica de *Baccharis latifolia* sobre los parásitos *Syphacia obvelata* y *Aspiculuris tetraptera* (Salazar, y otros, 2007).

1.1.2. *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze

1.1.2.1. Familia Lamiaceae

Es una familia cosmopolita que abarca 240 géneros y 5.600 especies (Herbario de la Universidad de Valencia). Familia característica por tener su cáliz o corola divididos en dos partes iguales en forma de labios. En esta familia se encuentran especies muy representativas como el romero, orégano y albahaca (E. Caicedo & S. Otavalo, 2007). La familia Lamiaceae comprende especies que pueden ser arbustos, hierbas o árboles, generalmente con tallos de forma cuadrangulares y un característico olor a menta. Dentro del Ecuador se han registrado aproximadamente 27 géneros y 219 especies, de las cuales un poco más del 13% son endémicas (Barriga, Montúfar, & Tye, 2011).

1.1.2.2. Género *Clinopodium*

Género con 271 especies descritas y 142 de ellas son aceptadas. Comprende plantas herbáceas, ligeramente aromáticas, leñosas en su base, perennes, rizomatosas. Hojas simples, enteras y pelosas. Al igual que las hojas sus tallos generalmente son pelosos. Cáliz y corola bilabiados (Asnatura, 2004).

Distintas etnias utilizan ciertas especies en medicina tradicional para tratar dolores de estómago, cólicos, diarreas, gastritis, vómito, infecciones, inflamaciones, deposición verde, entre otros malestares (Jerves Andrade, y otros, 2014); (Ansaloni, y otros, 2010). También se han desarrollado estudios con especies pertenecientes al género *Clinopodium*, determinando actividad antibacterial (Stefanovic, Stankovic, & Comic, 2011) y antifúngica (Cárdenas Verdezoto, 2014).

1.1.2.3. Clasificación botánica

Nombre Común: Sunfo, sunfillo, surumba.

Tabla 2.

Taxonomía *Clinopodium nubigenum*

Reino:	Vegetal
División:	Angiospermas
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Clinopodium</i>
Especie:	<i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze

Nota: Tomado de E. Caicedo & S. Otavalo. (2007). *Tesis de Grado: DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE DESHIDRATACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE TÉ DE SUNFO, Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze. Ibarra - Ecuador: Universidad Técnica del Norte

1.1.2.4. Descripción botánica

El sunfo (*Clinopodium nubigenum*) es una hierba terrestre y aromática que habita en los andes ecuatorianos, y que puede desarrollarse a partir de 3500 a 4500 m.s.n.m (E. Caicedo & S. Otavalo, 2007). Especie presente en las provincias: Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura Loja, Napo, Pichincha y Tungurahua (Jørgensen &

León Yáñez, 1999). Esta planta rastrera puede alcanzar aproximadamente 15 cm de altura y es posible identificarla por su característica de estar recubierta de pelos pequeños blancos en sus hojas. El tallo es cuadrangular y de color café rojizo. Su corteza es ligeramente descascarada (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009).

Las hojas son simples opuestas, ovadas y están aglomeradas en los tallos. El ápice es recto, con su base truncada, borde entero o ligeramente sinuoso. Pueden llegar a medir 4 mm de largo y 3 mm de ancho aproximadamente (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009).

Las flores son pequeñas, irregulares, tubulares y solitarias con un tamaño que puede variar de 3 hasta a 5 mm, zigomorfas, labiadas y vistosas de color lila muy claro con pequeñas manchas oscuras en su centro (Missouri Botanical Garden, 2009). Poseen 5 sépalos de color verde y 5 pétalos diferentes uno de otro, estambres basifijos con filamentos curvos. El fruto es seco indehiscente y tetraquenio (E. Caicedo & S. Otavalo, 2007).

1.1.2.5. Usos etnobotánicos

El sunfo es una planta silvestre muy utilizada en medicina tradicional y ancestral, la cual se oferta para tratar diferentes problemas de salud. En la provincia del Carchi, generalmente se realiza fusiones aromáticas con el fin de aliviar algunos malestares generales, tales como, dolores estomacales, contrarrestar el frío, inflamaciones (Ansaloni, y otros, 2010) e incluso para los niños que se orinan en la cama (Céron, 2006). En el Ecuador cada comunidad utiliza con diferentes fines, por ejemplo, en Saraguro se utiliza para tratar los resfriados. En las provincias del Azuay, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Pichincha y Tungurahua se utiliza para la incontinencia urinaria en los niños, afecciones estomacales (de la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008), disentería y síndromes menstruales (Gilardoni, y otros, 2011).

1.1.2.6. Estudios farmacológicos y químicos

En el sunfo se puede encontrar algunos principios activos, principalmente en su aceite esencial. Carvacrol, timol, borneol, limoneno, ácido butírico, valérico y acético y p-cimeno, nerol, geraniol, entre otros (Lituma Ulloa & Molina Díaz, 2008).

En un estudio realizado, se determinó que el sunfo posee actividad analgésica (Lituma Ulloa & Molina Díaz, 2008). Además, se han detallado los usos etnofarmacéuticos para afecciones estomacales y gastritis. También se logró evidenciar el potencial antibacterial, inhibiendo el desarrollo de *Staphylococcus aureus* (Jerves Andrade, y otros, 2014).

1.2. Aceites esenciales

A continuación se detallan todos los aspectos importantes de los aceites esenciales, iniciando desde su definición, importancia, usos y su relación con la actividad antioxidante.

1.2.1. Definición

Se define como aceite esencial a todas aquellas sustancias líquidas volátiles generadas en el metabolismo secundario de las plantas, encargadas de dar los aromas, muchas veces agradables y en ciertos casos desagradables. Generalmente son sustancias destilables con arrastre de vapor de agua (Jesús Palá, 2002).

1.2.2. Propiedades físicas y químicas

Son sustancias líquidas y volátiles a temperatura ambiente, recién destilados no poseen color o pueden ser un poco amarillentos, poseen olores muy concentrados que pueden ser agradables o desagradables, densidad inferior a la del agua, elevado índice de refracción, solubles en solventes orgánicos y alcoholes. Liposolubles y poco solubles en agua (Martínez A. , 2001). Los aceites esenciales pueden llegar a tener más de 100 componentes, pudiendo tener compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (León & Robles, 2009). Los aceites esenciales ante la diversidad de compuestos que poseen, se los cataloga en 4 grandes grupos: hidrocarburos terpénicos y alifáticos, derivados del benceno y compuestos misceláneos (Noriega P. F., 2009).

1.2.3. Usos

Alrededor de 3000 aceites esenciales son utilizados a nivel mundial, de los cuales 300 tienen importancia económica y comercial (Noriega P. F., 2009). Principalmente se utilizan en:

- **Industria cosmética:** Especialmente en la cosmética natural, se utiliza en la fabricación de perfumes, aceites para masajes, jabones, champús o cremas y lociones. Comúnmente se utiliza aceite de romero, manzanilla, cedro, lavanda, entre otros (Ortuño, 2006).
- **Industria farmacéutica:** Utilizados como componentes en la formulación de diversos medicamentos. Recientemente muy utilizada la aromaterapia (Cerpa, 2007). Un ejemplo claro es el aceite de limón utilizado para dar sabor a preparaciones farmacéuticas (Gennaro, 2003).

- Industria Alimenticia: Utilizados como saborizantes de productos comestibles, carnes, bebidas gaseosas, entre otros (Fontenla Razzetto, 2006). También se utilizan como conservantes. Aceites esenciales de canela, naranja y limón son algunos de los más conocidos (Gennaro, 2003).
- Otros: Presentes en formulaciones para pinturas, alimentos para animales e insecticidas en el sector agrícola (Cerpa, 2007). Otro sector que ha incrementado el uso de aceites esenciales es la producción de licores, utilizando aceites de hierba luisa, menta, estragrón, hinojo, entre otros (Ortuño, 2006).

Su uso se rige a la composición química y características físicas que poseen, lo cual favorece e influye en las formulaciones de cada industria en que los utilizan (Fontenla Razzetto, 2006).

1.2.4. Aceites esenciales como fuente de antioxidantes

Especies de los géneros *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia*, poseen una elevada actividad antioxidante debido a su interesante composición química. En aceites esenciales de ciertas especies de los géneros mencionados, como el tomillo o el orégano, se encuentran compuestos fenólicos tales como timol y carvacrol, moléculas con potencial actividad antioxidante (Muñoz, y otros, 2007). Pizzale y otros (2002), determinaron elevada actividad antioxidante en *Origanum onites* y *Origanum undercedens*, cuya actividad se puede atribuir al carvacrol. Dentro del mismo estudio, a *Salvia fruticosa* también se le atribuye una importante actividad antioxidante.

En una investigación para evaluar la actividad antioxidante e identificación química de 13 plantas, determinaron que ciertas especies poseen actividad antioxidante. Compuestos importantes fueron identificados, los cuales otorgan dicha actividad. En

apio (limoneno 74,6%), jazmín (acetato de bencilo 22,9%), enebro (α -pineno 33,7%), perejil (miristicina 44%), rosa (citronelol 34,2%), y ylang-ylang (germacreno 19,1%) (Wei & Shibamoto, 2007). Otro estudio realizado a 11 aceites esenciales mediante la prueba de capacidad captadora de radicales libres DPPH y el método de decoloración del β -caroteno determinó la representativa actividad antioxidante de *Chromolaena odorata*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* y *Curcuma longa*. (Sacchetti, y otros, 2005)

El estudio continuo de aceites esenciales, genera la posibilidad de encontrar fuentes veraces de antioxidantes. Investigaciones del aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* (Noriega, y otros, 2015), *Ocotea quixos* (Bruni, y otros, 2004) son un claro ejemplo de aceites esenciales con función biológica antioxidante.

1.2.5. Investigaciones de los aceites esenciales en estudio

Se encontraron 29 compuestos presentes en el aceite esencial de *Baccharis latifolia*, de los cuales limoneno, β -felandreno, sabineno, β -pineno y α -pineno son sus principales compuestos (Valarezo, y otros, 2013).

Otros estudios con el aceite esencial han demostrado actividad antimicrobiana, siendo antagonista de bacterias como *Staphylococcus aureus* (Salcedo, Pillco, Rodrigo, Sterner, & Almanza, 2003); (Bussmann, Glenn, & Sharon, 2010), y alta efectividad antagonista sobre hongos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* (Valarezo, y otros, 2013), y *Aspergillus fumigatus* (Zapata, Durán, Stashenko, Betancur-Galvis, & Mesa Arango, 2010).

En un estudio realizado en Brasil se realizó la identificación química del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*, identificando 70 compuestos. Los compuestos mayoritarios fueron pulegona, mentofurano, isopulegona, α -copaeno, 1 - octen -3- il

acetato, limoneno, p-cimeno, piperitenona, β -pineno, y 1,6- octadien-3,7-dimetil 3-ol. Además se demostró la actividad antimicrobiana del aceite esencial, el cual inhibe el desarrollo de *Candida albicans* (Gilardoni, y otros, 2011). Mediante GC MS se identificó como componente mayoritario al acetato de carvacrol en una especie de Loja, Ecuador (Ruiz, Malagón , Zaragoza, & Eduardo, 2010). También se ha demostrado el efecto antagonista sobre *Staphylococcus aureus* (Stefanovic, Stankovic, & Comic, 2011).

1.2.6. Importancia económica

Aproximadamente 300 aceites esenciales tienen importancia comercial (Noriega P. F., 2009). A pesar del incremento en el interés de manejar a los aceites esenciales como fuente económica, son pocos los países líderes en manejar los negocios. Los principales países exportadores son Estados Unidos, India, Francia, Brasil, Reino Unido, entre otros (TECNOVA, 2013).

Económicamente son muy rentables, generando ingresos económicos muy elevados. El continente americano es el principal exportador por volumen de aceites esenciales, seguido del continente asiático. Europa ocupa el primer lugar en ganancias por exportaciones con un valor de 858 millones de dólares, seguido del continente americano con 810 millones de dólares y Asia con 654 millones de dólares. El valor promedio de pago por kilogramo de aceite es 14,87 dólares, este valor puede variar dependiendo las condiciones comerciales establecidas entre los países y su cercanía (USAID, 2011).

Únicamente 18 de los 300 aceites esenciales con importancia económica generan casi el 50% del valor total generado. Aceites esenciales como el de rosa, albahaca, jazmín,

laurel, mandarina, lavanda, menta y naranja son las de mayor importancia y crecimiento económico dentro de las industrias de bebidas, golosinas, lácteas, cosméticas, farmacéuticas, entre otros (Ortuño, 2006).

1.2.7. Métodos de extracción de aceites esenciales

Prensado: El material vegetal se coloca en una prensa para ser exprimido manual o mecánicamente. La emulsión impura que se obtiene (agua-aceite) es separada, generalmente por centrifugación. Este método es funcional en especies que tengan la esencia en las células superficiales y en grandes cantidades, tal es el caso de los cítricos. Variedades de naranja y limón son un claro ejemplo (Noriega P. F., 2009).

Con solventes volátiles: La muestra seca y molida se coloca con solventes como alcohol o cloroformo, los cuales solubilizan al aceite esencial. Tiene la desventaja de extraer sustancias como grasas y ceras, obteniendo una esencia impura (Martínez A. , 2001). Tiene la desventaja de ser muy costoso, contaminante y alto riesgo de alterar la composición química del aceite esencial. Por todas las razones mencionadas, industrialmente no es utilizado y básicamente se utiliza a nivel de laboratorio (Esquivel & Vargas, 2007).

Método de enflorado: El material vegetal, generalmente flores, se pone en contacto con un aceite de origen vegetal, el cual actúa como vehículo extractor solubilizando la esencia. Posteriormente la grasa se separa por métodos físicos o químicos, generalmente con alcohol caliente. Muy utilizado en la obtención de esencias florales de rosa, jazmín, azahar, entre otros (Martínez A. , 2001).

Extracción con fluidos supercríticos: El material vegetal cortado en trozos o molido, es colocado en una cámara de acero inoxidable, en la cual circula un fluido en estado supercrítico, generalmente CO₂. Las esencias son solubilizadas y arrastradas, mientras el fluido en estado supercrítico se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la temperatura y presión ambiente (Rodríguez Álvarez, Alcaraz Meléndez, & Real Cosío, 2012). Es ecológicamente limpio, alto rendimiento, no altera la composición química del aceite. Su principal desventaja son los altos costos de inversión. Muy utilizado en investigaciones dedicadas a la obtención de aceites esenciales para elaborar alimentos funcionales, por ejemplo, estudios en romero, naranja y orégano (Esquivel & Vargas, 2007).

Destilación por arrastre de vapor de agua: La muestra vegetal fresca, es colocada en una placa con pequeñas perforaciones dentro de un destilador (Figura 1), en el cual es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. La esencia se volatiliza, arrastrada corriente arriba se condensa y forma dos fases. La fase acuosa es separada y se obtiene el aceite esencial. Esta técnica es muy utilizada a nivel industrial, especialmente perfumería, donde se logra obtener esencias muy puras y en gran cantidad (Wankat & Pozo, 2008). Posee grandes beneficios como: bajo costo de inversión, alto rendimiento, aceite esencial puro y libre de solvente, uso a nivel industrial y de laboratorio (Esquivel & Vargas, 2007).

Destilador por arrastre de vapor (40 L).



Figura 1.

Laboratorios CIVABI – Universidad Politécnica Salesiana.

Tomado por: P. Guerra, 2015

1.3. Actividad antioxidante y métodos de evaluación

La actividad antioxidante es un papel sumamente importante que es necesaria para evitar el desarrollo de enfermedades. Existen métodos de evaluación que identifican el potencial antioxidante de alguna sustancia. Los aspectos más importantes se detallan a continuación.

1.3.1. Antioxidante: Definición y modo de acción

Un antioxidante es toda molécula natural o sintética cuya función es retardar o disminuir el efecto de radicales libres para proteger un sistema biológico. Actuando como donador de electrones estabiliza radicales de oxígeno, nitrógeno, lipídicos, entre otros (Cano &

Marino, 2005). Estas moléculas se las puede obtener a partir de fuentes naturales o sintéticas, es decir, se generan y son propias del organismo o se las puede obtener como parte de una dieta o por medio de algún suplemento alimenticio (Patiño, 2006).

La ingesta de alimentos, especialmente frutas y verduras, así como el organismo que produce moléculas antioxidantes de manera natural, son las dos únicas fuentes para generar estabilidad en el cuerpo ante la presencia de radicales libres. Para cada radical libre que se genere en el organismo existe una molécula antioxidante capaz de contrarrestarlo. Esto ocurre cuando la molécula antioxidante otorga un electrón a una molécula que tenga un electrón desapareado, logrando estabilizarla para evitar que reaccione con moléculas que generen daños en las células y desencadenen cualquier tipo de enfermedad (Causse, 2010).

1.3.2. Radicales libres: Definición y modo de acción

Un radical libre se define como un átomo o molécula altamente inestable que contiene uno o más electrones desapareados por lo cual es altamente reactivo (Mora, Soporte Nutricional Universal, 2002). Al poseer un electrón desapareado o libre tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar una estabilidad electroquímica (Avello & Suwalsky, 2006).

Los radicales libres reaccionan de manera muy rápida con sustancias químicas orgánicas o inorgánicas tratando de obtener el electrón que les hace falta para llegar a un equilibrio. Atacan a las células y descomponen los ácidos nucleicos y todas las otras moléculas presentes en la membrana celular (Kumar, Cotran, & Robbins, 2006). Es así que se genera un estrés oxidativo, el cual se define como la alteración en el equilibrio a favor de moléculas oxidantes (radicales libres) sobre las antioxidantes, generando diferentes tipos de enfermedades por daños causados en las células (Repetto Jiménez & Repetto Kuhn).

1.3.3. Métodos de evaluación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se puede evaluar directamente o analizando la actividad secuestradora de radicales libres. Los métodos DPPH y ABTS son parámetros para determinar la actividad antioxidante, midiendo la actividad secuestradora o captadora de radicales libres (Pérez, Vargas, Martínez, García, & Hernández, 2003).

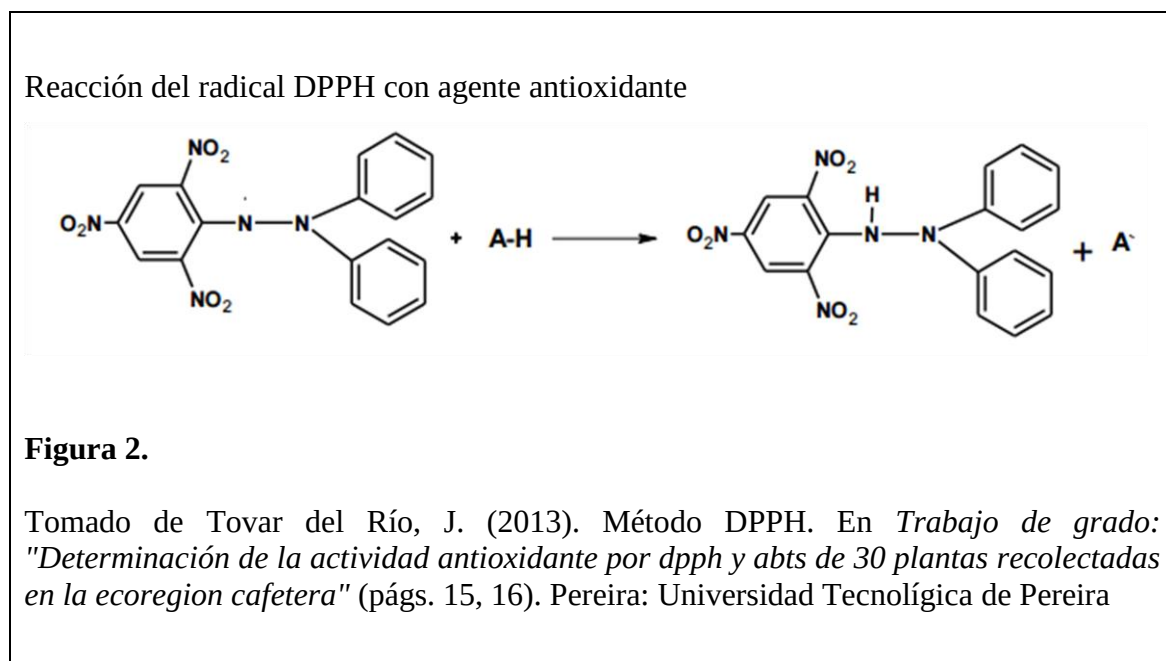
Los métodos para evaluar la actividad antioxidante tienen como fundamento comprobar que un compuesto antioxidante evite la oxidación de un sustrato oxidable por parte de un agente oxidativo (Coba, Mayacu, & Vidari). Un ejemplo es el método de decoloración del β -caroteno, el cual mide la actividad antioxidante del aceite esencial disminuyendo o no la decoloración oxidativa de la emulsión β -caroteno (Padilla, Rincón, & Bou-Rached, 2008). La inhibición o reducción del proceso oxidativo depende de la actividad antioxidante y concentración del compuesto o muestra (Fernández Pachón, Villano, Troncoso, & García Parrilla, 2006).

1.3.3.1. Método DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)

Método desarrollado por Brand-Williams y otros (1995) pero que ha sufrido ciertas adaptaciones por autores según la información que quieren obtener. El reactivo DPPH es un radical de nitrógeno disponible comercialmente, sumamente sencillo de realizar y aplicar, esto gracias a que únicamente se requiere un espectrofotómetro UV (Torrenegra Alarcón, 2014).

Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH, por antioxidantes. La solución de DPPH disuelta en metanol o etanol, reacciona con el sustrato antioxidante, el cual dona un átomo de hidrógeno (Figura 2), cambiando de

color violeta a amarillo el reactivo DPPH. El cambio de color debe ser monitoreado al instante y 30 minutos, con agitación continua con la ayuda de un espectrofotómetro, esto para la determinación de los parámetros de las propiedades antioxidantes (Tovar del Río, 2013).



1.3.3.2. Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfúrico)

Metodología desarrollada por RE y otros (1998) y descrita por Kuskoski y otros (2004). El proceso consiste en la formación de un compuesto cromóforo verde-azulado generado por la radicalización del reactivo ABTS por la reacción con persulfato de potasio, esto a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. El radical ABTS formado se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre $0,70 \pm 0,2$ a una longitud de onda de 754 nm. La reacción completa del reactivo ABTS con el agente antioxidante se puede observar en la Figura 3. Al igual que el método DPPH, el cambio de color es monitoreado por medio de un espectrofotómetro UV para

determinar los parámetros de actividad antioxidante. La medición se la realiza al instante (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini, & Fett, 2005).

Oxidación de ABTS por parte de persulfato de potasio generando el radical ABTS y su reacción con un compuesto antiradical (AOH).

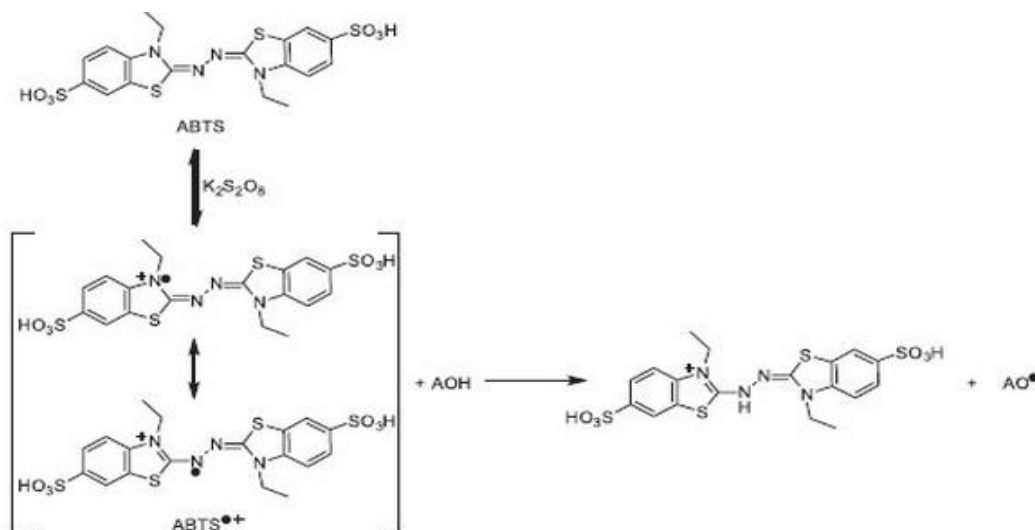


Figura 3.

Tomado de De Oliveira, S., Alves de Souza, G., Rodrigues, C., Alves Silva, T., Silva Sobral, E., Aparecida Fávero, O., Romoff, P. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3)

1.3.3.3. El método de decoloración del β -caroteno (β -caroteno test)

La prueba del β -caroteno test se la realiza en base al método de Miller (1971). Esta técnica mide la capacidad de ciertas sustancias o extractos de impedir la oxidación del β -caroteno en una emulsión con ácido linoleico (Pérez, Vargas, Martínez, García, & Hernández, 2003).

La técnica se fundamenta en la decoloración por oxidación del β -caroteno en presencia de ácido linoleico, esto en una emulsión acuosa con tween 20 como agente emulsificante. La decoloración ocurre cuando el β -caroteno reacciona con los radicales

libres generados por el ácido linoleico o metil lineolato (Rojano, y otros, 2008). Como se puede observar en la figura 4, los radicales libres se generan por degradación oxidativa del ácido linoleico (en su carbono 13) en presencia de un incremento de temperatura (Taga, Miller, & Pratt, 1984).

Oxidación del ácido linoleico generando un radical peróxido en su carbono 13

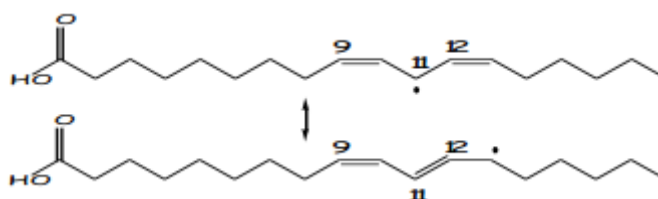


Figura 4.

Tomado de Taga, S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928-931

Las lecturas en las absorbancias disminuyen si los radicales peróxidos del ácido linoleico oxidan al β -caroteno. La presencia de sustancias antioxidantes evita la decoloración oxidativa de la emulsión por la neutralización de los radicales libres (Taga, Miller, & Pratt, 1984).

1.3.4. Evaluación de la composición química

Para evaluar e identificar la composición química de aceites esenciales es muy común utilizar técnicas cromatográficas, que son métodos físicos para separar mezclas moleculares, las cuales se distribuyen entre dos fases, una fase fija o estacionaria y una

fase móvil (García Bermejo & Silva García, 2006). Los componentes atraviesan la fase estacionaria a diferentes velocidades y se separan con el paso del tiempo. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado “tiempo de retención” (Angurell, y otros, N.E).

Para llevar a cabo la separación cromatografía, según el dispositivo utilizado para obtener el contacto entre las fases móvil y estacionaria se diferencian dos tipos de técnicas: en columna y plana. En la cromatografía en columna se utiliza un tubo cilíndrico, en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria por la cual pasa la fase móvil, la cual puede ser un líquido o gas (helio) (Valcárcel Cases & Gómez Hens, 1998). Para separar e identificar compuestos se utiliza la cromatografía de gases acoplada a masas.

1.3.4.1. Cromatografía de gases acoplada a masas (GC MS)

La cromatografía de gases es una técnica de separación de mezclas muy complejas, en donde la muestra que se inyecta en la fase móvil (generalmente helio) pasa por la fase estacionaria que se encuentra fija en una columna. En cromatografía de gases, una vez que se han separado, detectado y cuantificados los componentes, únicamente se obtienen los tiempos de retención de los picos cromatográficos. Este dato no es útil para realizar la identificación química de los compuestos separados. Por su parte, la espectrometría de masas, únicamente puede identificar a los compuestos netamente puros, siendo incapaz de identificar componentes individuales de una mezcla sin separar sus componentes. La combinación de cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), da lugar a una técnica (GC MS) que permite la

separación y la identificación inequívoca de mezclas complejas (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.3.5. Estudios bioautográficos

La separación individual de compuestos para su identificación y estudio permite identificar de manera exacta la molécula que cumple la actividad biológica deseada. La cromatografía en capa fina (TLC), permite realizar este proceso separativo. A continuación se detalla el proceso.

1.3.5.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La técnica consta de un sistema de dos fases: la fase sólida o fase estacionaria, que es absorbente y aplicada en forma de capa fina sobre un soporte, que puede ser de vidrio o plástico. A través de la fase estacionaria recorre el solvente o fase móvil. La fase estacionaria, puede ser gel de sílice, óxido de aluminio, silicato de magnesio, celulosa o poliamidas. Como fase móvil generalmente se utilizan solventes orgánicos (Guarnizo Franco & Martínez Yepes, 2009).

Las muestras son aplicadas sobre la fase estacionaria con jeringas, micropipetas o capilares en un extremo de la placa. La placa preparada se coloca en un sistema cerrado o tanque cromatográfico en donde se encuentra el solvente. El solvente por capilaridad se desplaza a través de la fase estacionaria y genera la separación de moléculas. Cuando el solvente haya alcanzado el punto máximo, se retira la placa (Jorrín Novo, Abril Díaz, & Bárcena Ruiz, 2005).

El recorrido de las sustancias se realiza de manera ascendente, obteniendo una separación de moléculas que pueden ser observadas y reveladas con luz ultravioleta u otro tipo de revelado específico. Para la cuantificación e identificación de las

moléculas es necesario extraerlas del soporte con los disolventes adecuados y aplicar los procesos apropiados (García Bermejo & Silva García, 2006).

La relación entre el recorrido del soluto y el solvente desde el inicio de la placa se conoce como R_f . En condiciones determinadas, el valor de R_f es característico para cada compuesto. Para calcular el R_f se debe tomar en cuenta la distancia que recorrió el compuesto y dividirlo por la distancia recorrida por el solvente (Jorrín Novo, Abril Díaz, & Bárcena Ruiz, 2005).

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Ambas especies vegetales: sunfo (*Clinopodium nubigenum*) y chilca (*Baccharis latifolia*) fueron compradas en el Mercado Santa Clara del Distrito Metropolitano de Quito.

Las características que se tomaron en cuenta para la obtención del material vegetal fueron: buen estado del material vegetal, hojas y tallos frescos verdosos, libre de partículas extrañas y limpieza.

2.2. Proceso de extracción de aceites esenciales

Las hojas frescas y verdes separadas de las especies vegetales se destilaron mediante arrastre de vapor en un destilador de 40 litros de capacidad, que pertenece a los laboratorios del CIVABI – Universidad Politécnica Salesiana. El rendimiento de los aceites [% (p/p)] se calculó tomando en cuenta el peso del material fresco. Para eliminar los residuos de agua presentes en el aceite esencial se utilizó sulfato de sodio. La densidad se calculó con el método del picnómetro detallado por Atarés Huerta, 2011. Los datos utilizados fueron el peso del picnómetro de 1 mL vacío (m_p), el peso del picnómetro con el líquido de referencia (agua: m_{p+w}), el peso del picnómetro con el aceite esencial (m_{p+d}) y la densidad del agua (ρ_w : 1 g/cm³). La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{densidad aceite} = \frac{m(p+d)-m(p)}{m(p+w)-m(p)} * \rho_w$$

2.3. Cromatografía de gases acoplada a masas

El análisis de los aceites esenciales en estudio fue realizado mediante GC-MS. En el proceso se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3900 equipado con una columna Factor Four VF-5ms con fase estacionaria de 5 % -fenil - 95 % -dimetilpolisiloxano (30 m × 0,25 mm x 0,25 µm) y directamente acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturno 2100.

Para correr la muestra por GC-MS se realizó una dilución del aceite esencial en Diclorometano (10uL en 1mL). Se inyectó 2 uL de la dilución en el equipo (GC MS). El gas transportador fue helio (1 mL / min), con una relación de división (Split) de 1:50. La temperatura inicial de horno fue 45 ° C y luego se elevó a 100 ° C a una velocidad de 1 ° C / min. Finalmente se elevó a una temperatura de 250 ° C a una velocidad de 5 ° C / min, la cual se mantuvo por 15 minutos para concluir el proceso. El tiempo total de análisis fue de 90 minutos.

Las condiciones del Espectrómetro de masas (MS) fueron las siguientes: corriente de emisión (10 µAmp); voltaje de ionización (70 eV); rango de masas (35 a 400 Da); velocidad de barrido (1scan / min); temperatura trampa (220 ° C); temperatura de la línea de transferencia (260 ° C).

2.4. Identificación química de aceites esenciales

La comparación de espectros de masas se realizó utilizando la base de datos comercial de compuestos químicos NIST 2001. Adicionalmente, se calculó los índices de Kovats experimentales en base a los tiempos de retención estándar, de una serie de alcanos

alcanos C8-C30, los cuales fueron comparados con los índices de Kovats de la base de datos de moléculas de aceites esenciales de Adams (2007).

Para calcular los índices de Kovats experimentales en base a la serie de alcanos C8-C30 se utilizó la siguiente fórmula:

$$IKa=100 * \left(\frac{Trd-Trm}{TrM-Trm} \right) * (100 * Z) + (100 * n)$$

Donde:

Trd: Tiempo de retención de la molécula sin identificar

Trm: Tiempo de retención menor de la serie C8-C30

TrM: Tiempo de retención mayor de la serie C8-C30

Z: Constante 1

n: Número de átomos de carbono del alcano más pequeño

2.5. Valoración de la capacidad captadora de radicales libres método

DPPH

Se siguió el método del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH desarrollado por Brand-Williams y otros (1995) y modificado por Noriega y otros (2015). Como referente natural se utilizó aceite esencial de *Thymus vulgaris* y como control positivo Butilhidroxianisol (BHA) (1000 ppm).

Previo a realizar la práctica, se preparó el reactivo pesando 0.0196 g de DPPH y se colocó en 100 mL de alcohol al 96%. Luego se aforó a 500 mL en un frasco ámbar. De igual manera se realizó una dilución de los aceites esenciales con DMSO, 1 en 10 (20uL de aceite en 180uL de DMSO) para tomillo y sunfo. En chilca no se realizó

diluciones. A continuación se preparó soluciones para *Thymus vulgaris* y *Clinopodium nubigenum* (anexo 1), *Baccharis latifolia* (anexo 2).

El control positivo BHA de concentración 1000 ppm, se usó a diversas concentraciones en reacción con el reactivo DPPH (anexo 3).

Después de agregar 2,9 mL del reactivo DPPH a cada una de las soluciones, se agitó por 30 minutos a velocidad constante. Previo a la lectura se encendió el espectrofotómetro con alcohol al 96% a una longitud de onda de 517nm. Al final se midió las absorbancias de cada solución partiendo desde la menor concentración. Las lecturas se las realizó por triplicado para cada solución

El porcentaje de inhibición del radical libre de cada solución se calculó con la fórmula utilizada en la investigación de Noriega y otros (2015):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} * 100$$

Los resultados se expresaron calculando la cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración del radical DPPH a la mitad (IC₅₀). Este valor se calculó por regresión lineal o logarítmica, graficando la concentración del aceite versus el porcentaje de inhibición (Tovar del Río, 2013). Para observar los gráficos y ecuaciones: *Thymus vulgaris* (anexo 10), *Clinopodium nubigenum* (anexo 11), *Baccharis latifolia* (anexo 12) y BHA (anexo 13).

2.6. Valoración de la capacidad captadora de radicales libres método

ABTS

Se realizó la evaluación de actividad antioxidante según la metodología desarrollada por Re y descrita por Kuskoski (Re, y otros, 1999); (Kuskoski E. , Asuero, Parilla, Troncoso, & Fett, 2004). Como referente natural se utilizó aceite esencial de *Thymus vulgaris* y como control positivo BHA (1000 ppm).

Se preparó una solución madre de ABTS disolviendo 0,0275 g de ABTS en 25 mL de agua destilada. También se disolvió 0,1882 gr de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) en 10 mL de agua destilada. A la solución preparada de ABTS se le añadió 250 uL de la solución de $K_2S_2O_8$ para radicalizarla. Se la conservó en oscuridad por un día.

A continuación, se realizó una dilución de los aceites esenciales con DMSO, 1 en 50 (4 uL de aceite en 196 uL de DMSO) para tomillo y sunfo. En chilca se realizó una dilución 1 en 10 (20uL de aceite en 180uL de DMSO). A continuación se preparó soluciones para *Thymus vulgaris* y *Clinopodium nubigenum* (anexo 4), *Baccharis latifolia* (anexo 5).

El control positivo BHA de concentración 1000 ppm, se usó a diversas concentraciones en reacción con el reactivo radicalizado ABTS (anexo 6).

Antes de empezar la lectura, la solución radicalizada de ABTS que se preparó el día anterior se ajustó con alcohol al 96% a una longitud de onda de 754nm, hasta obtener una absorbancia de $0,700 \pm 0,02$ (el reactivo tiene un periodo de funcionalidad de 1 día). Una vez agregados los 0,9 mL del reactivo radicalizado ABTS a cada una de las soluciones, se mide inmediatamente las absorbancias partiendo desde la menor concentración. Previo a la lectura se encendió el espectrofotómetro con alcohol al 96%

a una longitud de onda de 754nm. Las lecturas se las realizó por triplicado para cada solución.

El porcentaje de inhibición del radical libre de cada solución se calculó con la fórmula utilizada en la investigación de Pérez y otros (2003):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} * 100$$

Al igual que el método DPPH, los valores IC₅₀ (cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración del radical ABTS a la mitad) se determinaron mediante las curvas de inhibición obtenidas al graficar la concentración del aceite versus el porcentaje de inhibición. (De Oliveira, y otros, 2014) Para observar los gráficos y ecuaciones: *Thymus vulgaris* (anexo 14), *Clinopodium nubigenum* (anexo 15), *Baccharis latifolia* (anexo 16) y BHA (anexo 17).

2.7. Tratamiento estadístico para los métodos DPPH y ABTS.

El análisis comparativo de la actividad captadora de radicales libres, en base a las medias de los IC₅₀ calculados por los métodos DPPH y ABTS, se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el programa estadístico R versión 2.12.2., para identificar la similitud de los aceites esenciales en estudio con el referente natural *Thymus vulgaris*. Los parámetros utilizados en la prueba son: probabilidad 0,05 y 3 repeticiones por muestra. Las hipótesis planteadas fueron:

- hipótesis nula: la media de los IC₅₀ de los aceites esenciales en estudio son estadísticamente similares con las del referente natural.

- hipótesis alternativa: la media de los IC₅₀ de los aceites esenciales en estudio no son estadísticamente similares con las del referente natural.

Si la probabilidad tiene un valor mayor a 0,05 se acepta la hipótesis nula. Al contrario, si el valor de la probabilidad es menor a 0,05 se acepta la hipótesis alternativa.

2.8 β -caroteno test

Se la realizó en base al método de Miller (1971) con ciertas modificaciones en las concentraciones. Como referente natural se utilizó aceite esencial de *Thymus vulgaris* y como control positivo BHA (1000 ppm). Se agregó 4 mL de una solución de β -caroteno en cloroformo (10mg mg/10mL) en un balón con 400 uL de ácido linoleico y 8 mL de Tween 20. Inmediatamente se llevó al rotavapor para evaporar el cloroformo (40°C por 15 min). Una vez evaporado el cloroformo, se añadió lentamente 1 litro de agua destilada con agitación constante hasta formar una emulsión lechosa. La solución blanco se preparó con 20 uL de ácido linoleico y 400 uL de Tween 20. Se añadió lentamente 50 mL de agua destilada a la emulsión obtenida. Simultáneamente se preparó una solución de TRIS HCL 0,1M, la cual se ajustó hasta obtener un pH de 7,4.

Para las soluciones de los aceites esenciales se realizó una dilución de 0,05 mL de aceite esencial en 1 mL de Tween 20 para Sunfo y Tomillo. En Chilca se realizó una dilución de 0,5 ml de aceite esencial en 1 mL de Tween 20. El control positivo BHA de concentración 1000 ppm, se usó a diversas concentraciones en reacción con la emulsión β -caroteno (Anexo 9). Todas las soluciones se colocaron en un frasco ámbar 3 mL.

A continuación se preparó las soluciones para *Thymus vulgaris* y *Clinopodium nubigenum* (anexo 7), *Baccharis latifolia* (anexo 8) y BHA (anexo 9). Se encendió el espectrofotómetro UV. Una vez que se agregó los 5 mL de la emulsión β -caroteno se midió las absorbancias a tiempo 0 partiendo desde la menor concentración. Inmediatamente se colocó todas las soluciones en una estufa a 50°C por 60 minutos. Una vez transcurridos los 60 minutos, se midió las absorbancias partiendo desde la menor concentración. Las lecturas se las realizó por triplicado para cada solución. La actividad antioxidante de los aceites esenciales y BHA se expresaron como porcentaje de inhibición de la oxidación de β -caroteno para cada concentración según la ecuación utilizada en la investigación de Padilla, Rincón & Bou (2008):

$$AA = \frac{DRC - DRs}{DRC} * 100$$

Donde:

DRC: Porcentaje de degradación del control. Es un valor constante

$$DRC = \frac{\ln(\frac{a}{b})}{60} * 100$$

a= absorbancia a tiempo 0 del blanco

b= absorbancia a 60 min de incubación del blanco

DRs: Porcentaje de degradación en presencia de la muestra.

$$DRs = \frac{\ln(\frac{a}{b})}{60} * 100$$

a= absorbancia a tiempo 0 del blanco

b= absorbancia a 60 min de incubación de las muestras

El cálculo del IC₅₀ (cantidad necesario para inhibir a la mitad la oxidación del β -caroteno) se determinó por las curvas de actividad antioxidante obtenidas al graficar la concentración de aceite esencial versus el porcentaje de actividad antioxidante. Para observar los gráficos y ecuaciones: *Thymus vulgaris* (anexo 18), *Clinopodium nubigenum* (anexo 19), *Baccharis latifolia* (anexo 20) y BHA (anexo 21).

2.9 Método bioautográfico: Cromatografía en capa fina (TLC-DPPH)

El estudio bioautográfico de los aceites esenciales se realizó mediante cromatografía de capa fina. Como referente natural se utilizó *Thymus vulgaris*. Se diluyó a todos los aceites con diclorometano (30 uL/mL). Se trabajó con un aplicador para TLC acoplado con un computador con el software winCATS, configurado para que fije 15 uL de aceite en la fase estacionaria (placas TLC de sílica gel 10cm x 10cm).

En una placa se fijó los 3 aceites esenciales (*Thymus vulgaris*, *Clinopodium nubigenum* y *Baccharis latifolia*) y en otra las especies en estudio por duplicado y triplicado para *Clinopodium nubigenum* y *Bacchais latifolia* respectivamente. A continuación se colocó las placas con la fase móvil (tolueno 93 mL; acetato de etilo 7 mL; éter de petróleo 20 mL) en una cámara para TLC. La fase móvil debe llegar hasta 1cm antes del borde. Las placas fueron retiradas y secadas a temperatura ambiente.

Con un aspersor se roció DPPH al 0,5% de concentración en toda la placa que contiene el referente natural. En el transcurso de 2 horas verificó si existe la decoloración de moléculas que representaron aquellas con actividad antioxidante. Se calculó el R_f (distancia que recorre el solvente/ distancia que recorre la molécula) de las moléculas que presentaron actividad antioxidante. El referente natural generó una reacción de coloración amarilla que significa actividad antioxidante positiva. La segunda placa se

colocó en un revelador para TLC a una longitud de onda de 254 nm para que todas las moléculas sean marcadas con lápiz. Se rasparon las moléculas cuyos Rf coincidieron con las moléculas antioxidantes de la primera placa. Cada fracción separada de moléculas antioxidantes se colocaron en tubos eppendorf independientes, a continuación se agregó 1 mL de diclorometano a cada tubo y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante se inyectó (2uL) en el GC MS a las mismas condiciones descritas anteriormente para la identificación de las moléculas antioxidantes.

Capítulo 3

Resultados y discusiones

3.1. Extracción de aceites esenciales

El rendimiento obtenido de los aceites esenciales fue de 0.27% (p/p) y 0,13% (p/p) para *Clinopodium nubigenum* y *Baccharis latifolia*, respectivamente.

La densidad del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* fue de 0.9483 g/cm³ y en *Baccharis latifolia* 0,9049 g/cm³.

3.2. Identificación de la composición química

En el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* se detectaron 19 compuestos, de los cuales fueron identificados 18, que representan el 99,65% de la composición total del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios fueron: acetato de carvacrol (42,17%), carvacrol (20,66 %), pulegona (6,3%), Timol (5,54%) y p-cimeno (5,2%).

En el aceite esencial de *Baccharis latifolia* se identificaron 55 compuestos, de los cuales fueron identificados 45, que representan el 96,1% de la composición total del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios fueron: α -felandreno (18,11%), limoneno (17,04%), norhalkendin (9,50%) y andro enecalinalol (5,41%). La tabla completa de composición química de ambos aceites se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3.Composición química del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* y *Baccharis latifolia*

NOMBRE DEL COMPUESTO	Ik ^b	IK ^a	<i>C. nubigenum</i>	<i>B. latifolia</i>	Método
α -tujeno	930	922	0,83 $\pm$ 0,19	0,25 $\pm$ 0,02	GC MS
α -pineno	939	929		2,74 $\pm$ 0,21	GC MS
canfeno	954	945		0,27 $\pm$ 0,03	GC MS
sabineno	975	969		0,66 $\pm$ 0,05	GC MS
β -pineno	979	974		1,84 $\pm$ 0,13	GC MS
mirceno	990	988		0,93 $\pm$ 0,06	GC MS
α -felandreno	1002	1006		18,11 $\pm$ 1,16	GC MS
δ -careno	1011	1007		1,85 $\pm$ 0,02	GC MS
α -terpineno	1017	1014	0,49 $\pm$ 0,14		GC MS
p-cimeno	1024	1022	5,2 $\pm$ 1,12	0,87 $\pm$ 0,05	GC MS
limoneno	1029	1025	0,91 $\pm$ 0,19	17,04 $\pm$ 0,90	GC MS
1,8-cineol	1031	1029		0,15 $\pm$ 0,02	GC MS
ocimeno z	1037	1043		2,07 $\pm$ 0,11	GC MS
γ -terpineno	1059	1054	3,33 $\pm$ 0,76		GC MS
terpinoleno	1088	1083		0,22 $\pm$ 0,02	GC MS
1-octen-3-il acetato	1112	1110	4,82 $\pm$ 0,51		GC MS
pulegona	1237	1236	6,3 $\pm$ 0,06		GC MS
timol	1290	1298	5,54 $\pm$ 0,42		GC MS
carvacrol	1299	1307	20,66 $\pm$ 1,73		GC MS
δ -elemeno	1338	1333	1,01 $\pm$ 0,02		GC MS

timol acetato	1352	1359	0,55 ± 0,08		GC MS
acetato de citronelilo	1352	1364	3,6 ± 0,12		GC MS
α-copaeno	1376	1377		0,16 ± 0,003	GC MS
carvacrol acetato	1372	1377	42,17 ± 1,21		GC MS
NI		1388	0,35 ± 0,08		GC MS
β-elemeneno	1390	1389		0,21 ± 0,05	GC MS
cipereno	1398	1399		0,13 ± 0,002	GC MS
metil euglenol	1403	1408		2,94 ± 0,50	GC MS
cariofileno	1419	1411	0,38 ± 0,03		GC MS
cariofileno z	1408	1412		2,99 ± 0,16	GC MS
γ- elemeneno	1436	1428		0,21 ± 0,01	GC MS
α-humuleno	1454	1452		0,47 ± 0,01	GC MS
aromadendreno <allo>	1460	1457		0,20 ± 0,01	GC MS
NI		1464		0,23 ± 0,01	GC MS
cadina-1(6),4-diene <trans>	1476	1476		0,30 ± 0,01	GC MS
γ-muuroleno	1479	1477	0,32 ± 0,004	1,20 ± 0,02	GC MS
aristolocheno	1488	1486		0,11 ± 0,002	GC MS
muurolo-4(14),5-dieno <trans>	1493	1488		0,20 ± 0,004	GC MS
biciclogermacreno	1500	1491	1,78 ± 0,13	1,42 ± 0,05	GC MS
NI		1494		0,58 ± 0,03	GC MS
α-muurolene	1500	1496		0,15 ± 0,01	GC MS
β-dihidro agarofuran	1503	1499		0,23 ± 0,01	GC MS
β-bisaboleno	1505	1507		0,13 ± 0,01	GC MS
δ-cadineno	1523	1516	1,31 ± 0,06	0,41 ± 0,08	GC MS
NI		1521		0,23 ± 0,01	GC MS
epiglobulol		1527		2,25 ± 0,05	GC MS

liguloxide	1536	1535		6,55 ± 0,28	GC MS
elemol	1549	1552		1,49 ± 0,11	GC MS
germacreno b	1561	1559		0,37 ± 0,02	GC MS
NI		1567		0,19 ± 0,01	GC MS
NI		1579		0,31 ± 0,01	GC MS
espatulenol	1578	1579	0,44 ± 0,04		GC MS
NI		1609		0,42 ± 0,05	GC MS
NI		1626		0,67 ± 0,05	GC MS
epi- α cadinol	1640	1631		0,54 ± 0,05	GC MS
cadin-4-en-7-ol <cis>	1636	1640		4,11 ± 0,23	GC MS
NI		1650		0,67 ± 0,05	GC MS
NI		1654		0,20 ± 0,02	GC MS
valerianol	1658	1656		0,27 ± 0,05	GC MS
7-epi- α - eudesmol	1663	1662		0,66 ± 0,10	GC MS
andro enecalinalol	1676	1671		5,41 ± 0,36	GC MS
α -bisabolol	1685	1694		0,86 ± 0,06	GC MS
cyperotundona	1695	1701		1,34 ± 0,10	GC MS
NI		1707		0,40 ± 0,03	GC MS
1,5-diacetilnaftaleno		1745		0,61 ± 0,05	GC MS
norhalkendin (cumarina)		1758		9,50 ± 0,67	GC MS
anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-9,10-dimethyl		1762		3,25 ± 0,34	GC MS
azulen-2-ol, 1,4-dimetil-7-(1-metiletil)		1786		0,44 ± 0,07	GC MS

Nota: ^a Índice de Kovats experimental calculado en base a los tiempos de retención estándar de una serie de alcanos alcanos C8-C30. ^b

Índice de Kovats teórico (Adams, 2007). NI: no identificado.

Elaborado por P. Guerra, 2015

3.3. Valoración capacidad captadora de radicales libres métodos DPPH y ABTS.

3.3.1. Método DPPH

Los resultados obtenidos de la actividad captadora de radicales libres (porcentaje de inhibición) en función de cada concentración de aceite y la concentración necesaria para reducir la concentración del radical DPPH a la mitad (IC_{50} uL/mL) se pueden observar para *Thymus vulgaris* (tabla 4), *Clinopodium nubigenum* (tabla 5), *Baccharis latifolia* (tabla 6) y BHA (tabla 7).

Tabla 4.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Thymus vulgaris*-DPPH.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,07	3,97	4,07	3,97
0,17	11,27	11,38	11,18
0,33	24,63	24,63	24,66
0,67	40,19	40,08	40,02
1,67	66,81	66,81	66,88
2,67	84,13	84,03	84,01
3,33	87,58	87,58	87,46
IC_{50} (uL/mL)	0,758	0,759	0,760

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 5.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*-DPPH.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,07	3,29	3,30	3,30
0,17	8,18	8,19	7,99
0,33	13,97	13,79	13,89
0,67	26,95	26,97	26,87
1,67	47,60	47,45	47,55
2,67	57,68	57,54	57,64
3,33	64,77	64,84	64,84
IC ₅₀ (uL/mL)	1,815	1,811	1,812

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 6.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Baccharis latifolia*-DPPH.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,00	0,00	0,00	0,00
0,67	4,81	4,91	4,81
1,67	7,52	7,72	7,63
3,33	14,73	14,72	14,73
6,67	24,97	24,95	24,87
16,67	48,69	48,85	48,69
26,67	64,16	64,09	64,26
33,33	74,61	74,74	74,82
IC ₅₀ (uL/mL)	20,82	20,80	20,78

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 7.

Capacidad captadora de radicales libres de BHA-DPPH.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
6,67E-04	9,44	9,42	9,62
1,67E-03	15,61	15,77	15,77
3,33E-03	33,53	33,65	33,65
6,67E-03	55,11	55,00	55,19
1,67E-02	82,47	82,50	82,50
2,67E-02	89,02	88,85	89,04
3,33E-02	90,37	90,38	90,58
IC ₅₀ (uL/mL)	5,93E-03	5,92E-03	5,91E-03

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

3.3.3. Método ABTS

Los resultados obtenidos de la actividad captadora de radicales libres (porcentaje de inhibición) en función de cada concentración de aceite y la concentración necesaria para reducir la concentración del radical ABTS a la mitad (IC₅₀ uL/mL) se pueden observar para *Thymus vulgaris* (tabla 8), *Clinopodium nubigenum* (tabla 9), *Baccharis latifolia* (tabla 10) y BHA (tabla 11).

Tabla 8.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Thymus vulgaris*-ABTS.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,04	21,67	21,81	21,67
0,10	35,84	36,12	35,84
0,20	42,32	42,42	42,32
0,40	55,80	55,71	55,63
1,00	81,06	81,26	81,23
1,60	88,40	88,42	88,23
2,00	92,32	92,33	92,32
IC ₅₀ (uL/mL)	0,2107	0,2103	0,2110

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 9.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*-ABTS.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,04	9,34	9,52	9,36
0,10	21,43	21,43	21,28
0,20	35,16	34,98	34,86
0,40	57,14	57,14	56,88
1,00	77,29	77,29	77,25
1,60	81,50	81,68	81,47
2,00	82,97	82,97	82,94
IC ₅₀ (uL/mL)	0,3372	0,3368	0,3386

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 10.

Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *Baccharis latifolia*-ABTS.

Concentración aceite esencial uL/ML	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0,20	8,23	7,94	8,23
1,00	25,95	25,40	25,95
2,00	31,96	31,43	31,65
5,00	65,19	65,08	65,19
8,00	76,90	76,83	76,58
10,00	83,54	83,49	83,54
IC ₅₀ (uL/mL)	2,17	2,20	2,18

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 11.

Capacidad captadora de radicales libres de BHA-ABTS.

Concentración aceite esencial uL/mL	% Inhibición 1	% Inhibición 2	% Inhibición 2
0	0	0	0
0,001	44,1340782	41,18	41,34
0,002	68,7150838	68,35	68,72
0,005	97,2067039	97,20	97,49
IC ₅₀ (uL/mL)	1,17E-03	1,25E-03	1,24E-03

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

3.3.4. Evaluación comparativa de los métodos DPPH y ABTS

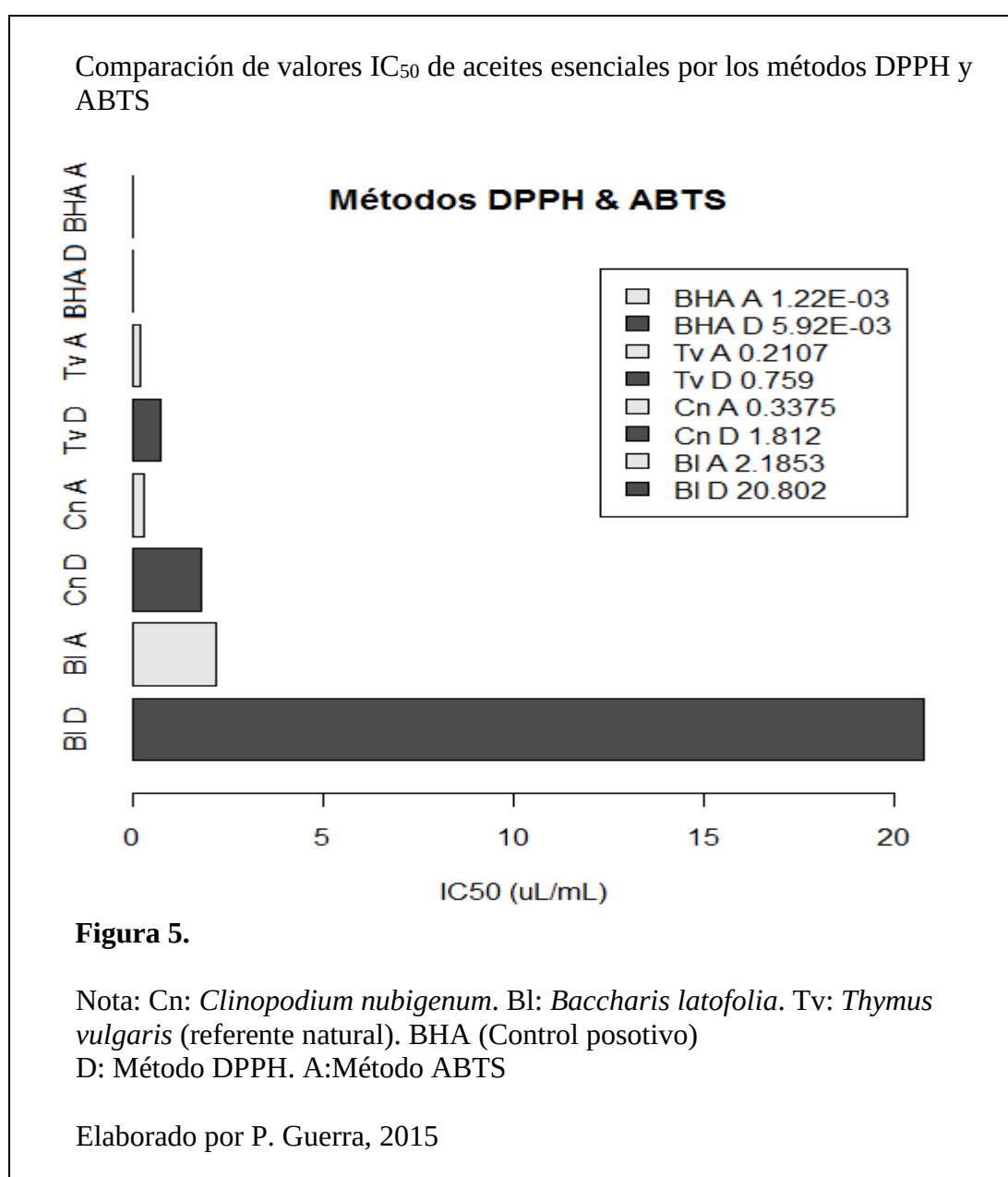
Los resultados obtenidos de los valores promedio IC₅₀ (mg/uL) calculados a partir de las curvas de inhibición, correspondientes a las pruebas DPPH y ABTS, se pueden observar en las siguientes tabla y figura.

Tabla 12.

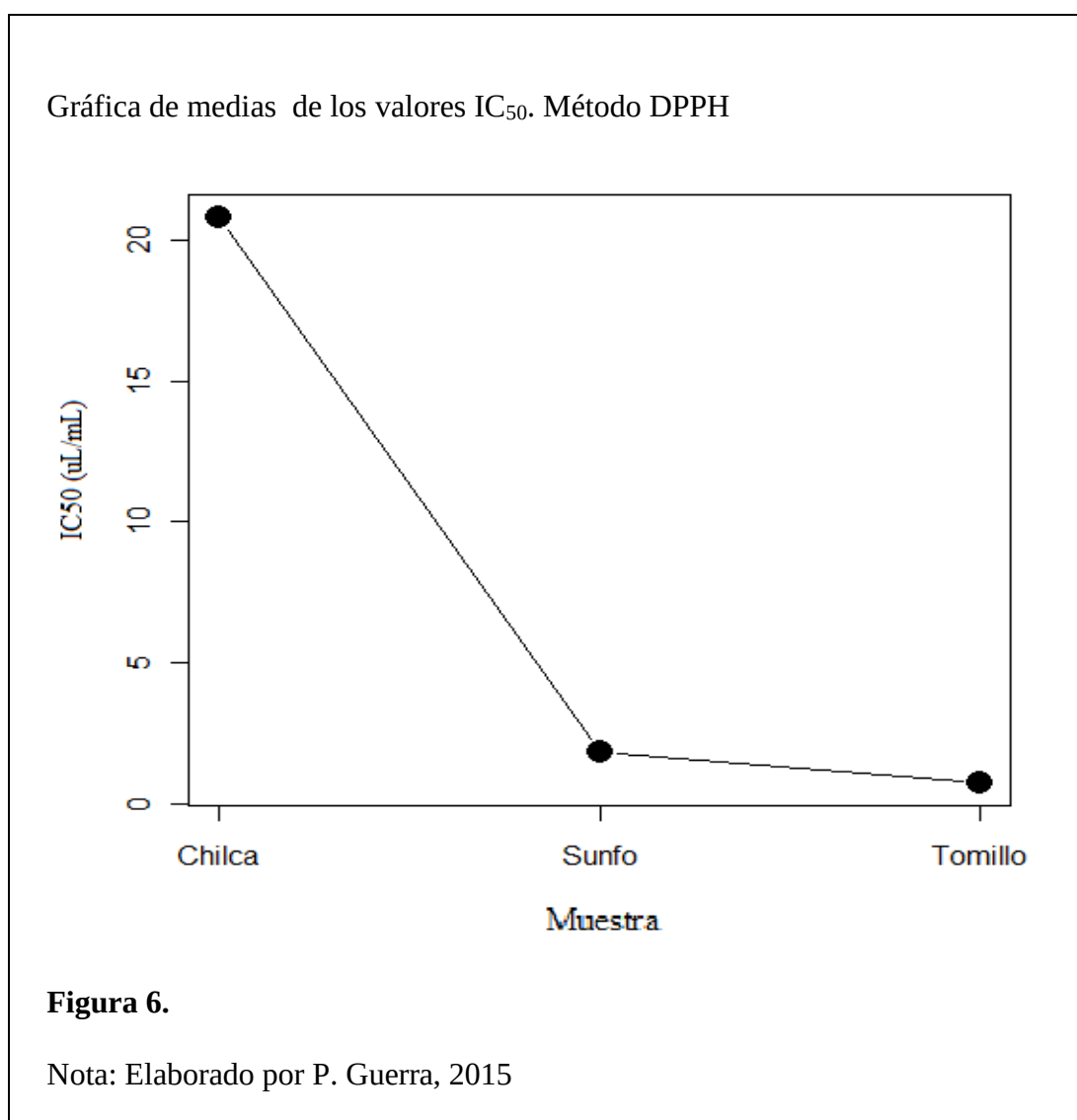
Comparación de los valores promedio IC₅₀ según los métodos DPPH y ABTS.

Aceite esencial	DPPH IC ₅₀ (uL/mL)	ABTS IC ₅₀ (uL/mL)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,759 ± 0,001	0,2107 ± 0,00033
<i>Clinopodium nubigenum</i>	1,812 ± 0,003	0,3375 ± 0,00095
<i>Baccharis latifolia</i>	20,802 ± 0,023	2,1853 ± 0,013
BHA	5,92E-03 ± 0,000013	1,22E-03 ± 0,00004

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015



Los resultados obtenidos por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los métodos DPPH y ABTS, dieron como resultado un valor de $p < 0,05$, por lo tanto no se rechaza la hipótesis alternativa: la media de los IC_{50} de los aceites esenciales en estudio no son estadísticamente similares con las del referente natural. A pesar de establecer una diferencia estadística, se puede observar en las gráficas de medias para ambos métodos, DPPH (figura 6) y ABTS (figura 7), el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* es el más cercano (en base a la media IC_{50}) al referente natural *Thymus vulgaris*.



Gráfica de medias de los valores IC₅₀. Método ABTS

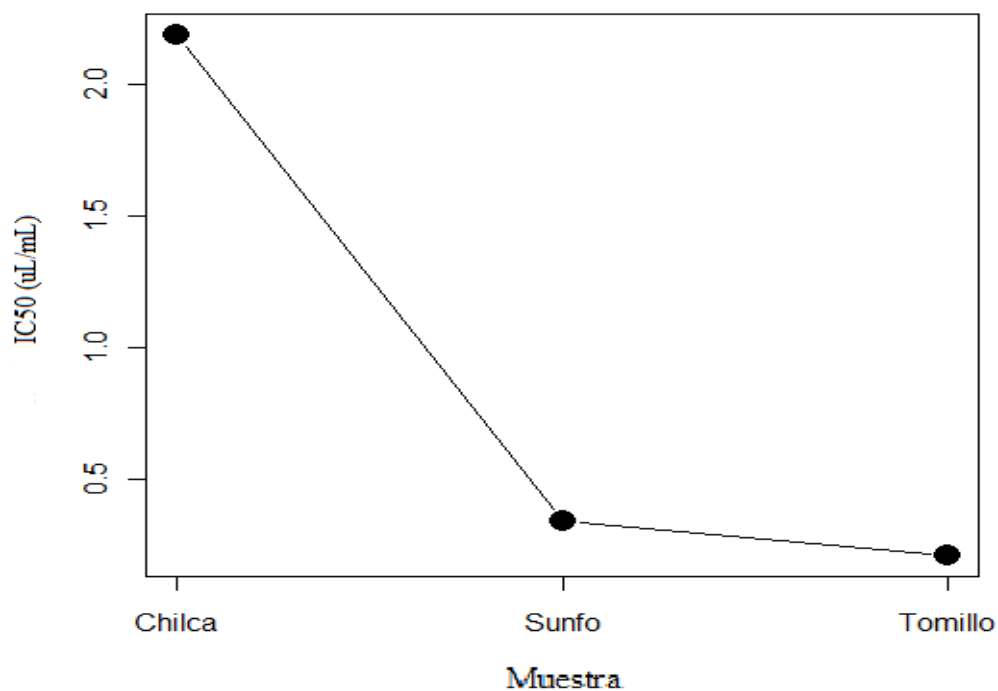


Figura 7.

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

3.4. β -caroteno test

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de cada concentración de aceite y la concentración necesaria para inhibir la oxidación del β -caroteno a la mitad (IC₅₀ uL/mL) se pueden observar para *Thymus vulgaris* (tabla 13), *Clinopodium nubigenum* (tabla 14), *Baccharis latifolia* (tabla 15) y BHA (tabla 16). El gráfico de medias IC₅₀ se pueden observar en la figura 8.

Tabla 13.

Evaluación de Actividad antioxidante del aceite esencial de *Thymus vulgaris*- β caroteno test.

Concentración uL/mL	% AA 1	% AA 2	% AA 3
0,0037	24,19	24,67	25,48
0,0092	38,13	39,01	40,65
0,0183	44,39	45,93	46,27
0,0366	55,57	56,45	56,92
0,0916	70,59	70,91	71,23
0,1465	68,04	68,38	68,72
0,1832	81,88	82,07	82,60
IC ₅₀ (uL/mL)	0,023	0,022	0,021

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 14.

Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*- β caroteno test.

Concentración uL/mL	% AA 1	% AA 2	% AA 3
0,0037	28,72	26,73	26,07
0,0092	36,06	34,02	33,70
0,0183	46,27	43,56	43,56
0,0366	55,27	53,74	53,74
0,0916	49,58	46,19	46,19
0,1465	53,58	51,47	51,47
0,1832	69,95	67,84	67,84
IC ₅₀ (uL/mL)	0,027	0,033	0,033

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 15.

Evaluación de la Actividad antioxidante del aceite esencial de *Baccharis latifolia*- β caroteno test.

Concentración uL/mL	% AA 1	% AA 2	% AA 3
0,026	40,56	40,43	40,43
0,064	46,20	45,88	46,08
0,128	52,44	52,72	52,91
0,256	52,08	51,81	51,97
0,641	67,61	67,74	67,69
1,026	89,79	89,58	89,85
1,282	92,05	92,03	92,07
IC ₅₀ (uL/mL)	0,071	0,072	0,071

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 16.

Evaluación de la Actividad antioxidante de BHA- β caroteno test.

Concentración uL/mL	% AA 1	% AA 2	% AA 3
2,56E-05	55,49	62,64	64,37
6,41E-05	77,28	80,75	80,65
1,28E-04	86,10	88,02	88,03
2,56E-04	86,38	88,26	88,28
6,41E-04	93,61	94,44	94,28
1,03E-03	95,97	96,53	96,37
1,28E-03	97,26	97,36	97,49
IC ₅₀ (uL/mL)	1,30E-05	5,324E-06	4,10948E-06

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Evaluación actividad antioxidante de aceites esenciales en estudio. Método β -caroteno test.

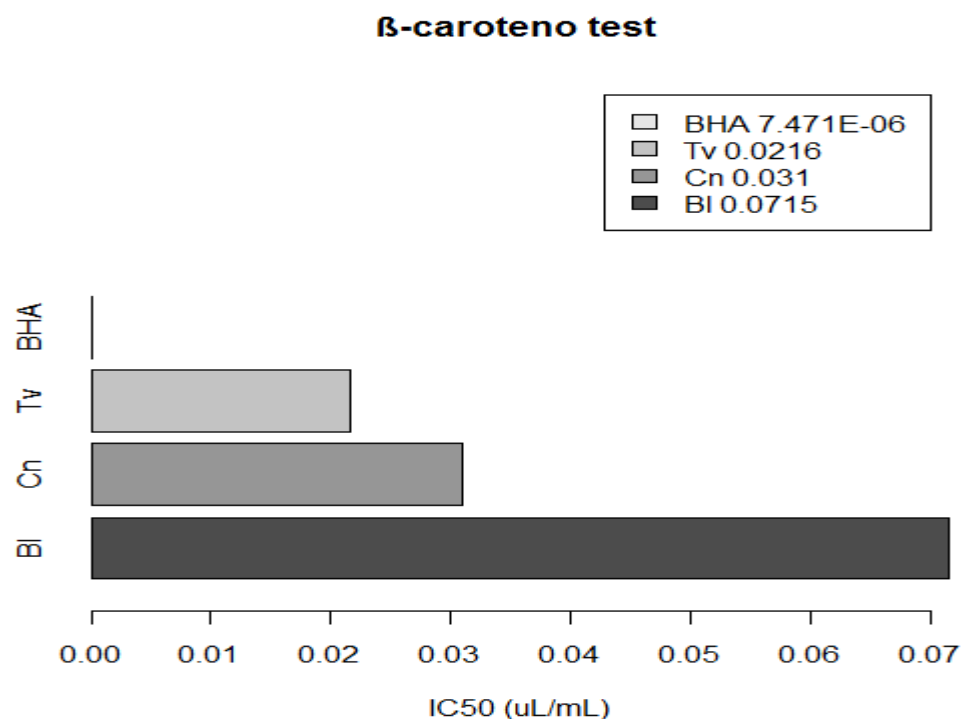


Figura 8.

Nota. Cn: *Clinopodium nubigenum*. Bl: *Baccharis latifolia*. Tv: *Thymus vulgaris* (referente natural). BHA (Control posotivo)
D: Método DPPH. A: Método ABTS

Elaborado por P. Guerra, 2015

3.5. Método Bioautográfico

Las moléculas antioxidantes positivas se evidenciaron por el cambio de color (violeta a amarillo) de la placa TLC-DPPH, tal como se observa en la figura 9. La identificación de las moléculas antioxidantes y sus respectivos Rf se detallan en la siguiente tabla.

Cromatografía en capa fina de aceites esenciales.



Figura 9.

Nota. A: Tomillo (*Thymus vulgaris*). B: Sunfo (*Clinopodium nubigenum*). C: Chilca (*Baccharis latifolia*).

Elaborado por P. Guerra, 2015

Tabla 17.

Rf de moléculas antioxidantes de aceites esenciales en estudio.

Rf	<i>Clinopodium nubigenum</i>	<i>Baccharis latifolia</i>
0,47		Aristolocheno Cariofileno Z
0,54	Carvacrol	Cadin-4-en-7-ol <cis>

Nota: Elaborado por P. Guerra, 2015

Discusión

La identificación química del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* realizada en esta investigación, concuerda con el estudio realizado por Ruiz y otros (2013), determinando como compuesto mayoritario al acetato de carvacrol. En comparación con otros estudios, se evidencia una diferencia significativa en la composición química, ya que se ha identificado como compuestos mayoritarios al timol, carvacrol (El-Seedi, y otros, 2008), o pulegona. Estos cambios en la composición química podrían adjudicarse a las diferencias climáticas, composición de suelos, ciclos vegetativos, edad de la planta y condiciones de cultivo que se otorguen (Gilardoni y otros, 2011). Hay que destacar que la investigación hecha por Ruiz y otros (2013), se realizó en con muestra vegetal de Ecuador y para este caso la composición química es similar.

La identificación de la composición química del aceite esencial de *Baccharis latifolia* concuerda con la realizada por Valarezo y otros (2013), determinando como compuesto mayoritario al limoneno. Existen pocas variaciones en la composición química que pueden darse por los factores explicados anteriormente.

En los estudios de valoración de la capacidad captadora de radicales libres DPPH y ABTS, así como en la prueba de evaluación antioxidante β caroteno test, *Clinopodium nubigenum* presentó la mejor actividad. *Baccharis latifolia* presentó una actividad antioxidante moderada en las 3 evaluaciones aplicadas. No se registran estudios de esta índole en ambas especies, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación serían los primeros, destacándose al aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* como una nueva matriz natural con potencial antioxidante.

Las moléculas antioxidantes identificadas en esta investigación fueron carvacrol en *Clinopodium nubigenum* y en *Baccharis latifolia* aristolocheno, cariofileno Z y Cadin-4-en-7-ol <cis>. El carvacrol es una molécula ya relacionada con actividad antioxidante, muy común en especies como el tomillo y variedades de orégano (Muñoz, y otros, 2007); (Cárdenas , y otros, 2007).

Conclusiones

De los aceites esenciales en estudio, *Clinopodium nubigenum* presentó la mejor efectividad en las pruebas para evaluar la capacidad captadora de electrones y capacidad antioxidante. *Baccharis latifolia* obtuvo un desempeño moderado.

En ambas especies la identificación química de los aceites esenciales es muy similar con algunas investigaciones realizadas en la Región Andina.

Los compuestos identificados en *Baccharis latifolia*, a las que se adjudica la actividad antioxidante, no se detallan en ninguna investigación como responsables de dicha actividad, lo que daría una importancia significativa a esta investigación.

Recomendaciones

Ambas especies poseen una composición química que puede relacionarse con la actividad antioxidante. Destacan en esta investigación los excelentes resultados descritos para el aceite esencial de *Clinopodium nubigenum*. Para el caso particular de esta planta se recomienda profundizar en las aplicaciones que podrían definirse desde el punto de vista industrial, como una matriz química para los sectores farmacéutico, alimenticio y cosmético.

Referencias

- Herbario de la Universidad de Valencia. (s.f.). *Familia Labiaceae*. Valencia, España.
- Abad, M. J., & Bermejo, P. (2007). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7),76-96.
- Abad, M. J., Bessa, A. L., Ballarín, B., Aragón, O., Gonzales, E., & Bermejo, P. (2006). Anti-inflammatory activity of four Bolivian Baccharis species (Compositae). *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), 338-344.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4ta ed.). Illinois, USA: Allured, Carol Stream.
- Aguilar, Z., Ulloa, C., & Hidalgo, P. (2009). *Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta-Ecuador*. Zuleta - Ecuador: Ministerio del Ambiente. Obtenido de Guía de plantas útiles de los páramos de Zuleta - Ecuador: http://www.ecociencia.org/archivos/guia_plantas-091128.pdf
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarès, I., LLor, N., Muñoz Torrero, D., . . . Velasco Dolores. (N.E). *Cromatografía*. Obtenido de Universidad de Barcelona: Operaciones básicas del Laboratorio de Química: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia.html>
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Peñaherrera, E., Orellana, A., Tobar, V., & De Witte, P. (2010). Estudio preliminar sobre plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades de las provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal. *Revista Tecnológica-ESPOL.*, 23(1).
- Aragadvay, S. (2009). *Tesis de grado: "Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de Chila (Baccharis latifolia) y*

- Hierbamora (Solanum nigrum)*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Asnatura. (2004). *Género Clinopodium*. Recuperado el 25 de Julio de 2015, de Asnatura: <http://www.asturnatura.com/genero/clinopodium.html>
- Atarés Huerta, L. (2011). *Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Scielo*.
- Baratta, M., Damien Norman, H., Deans, S., Figueiredo, A., Barroso, J., & Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*.
- Barriga, P., Montúfar, R., & Tye, A. (2011). Familia Asteraceae y Lamiaceae. En S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa, & H. Navarrete, *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (2da Edición ed., págs. 139, 367). Quito: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., . . . Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. *Food chemistry*, 85(3), 415-421.
- Bussmann, R. W., & Glenn, A. (2011). Fighting pain. Traditional Peruvian remedies for the treatment of Asthma, Rheumatism, Arthritis and sore bones. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 10(3), 397-412.

- Bussmann, R., Glenn, A., & Sharon, D. (2010). Antibacterial activity of medicinal plants of Northern Peru-can traditional applications provide leads for modern science. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 9(4), 742-753.
- Cano, A., & Marino, A. (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. *International Journal of Food Properties*. DOI: 10.1080/10942910500269584, 521-528.
- Cárdenas , C., Stashenko, E., Castañeda, M., Blanco, K., Muñoz, A., Kouznetsov, V., & Reyes, J. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica.*, 1(33), 125-128.
- Cárdenas Verdezoto, J. E. (2014). *Tesis: "Control biológico de Fusarium en hortalizas de la parroquia de San Joaquín"*. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay.
- Causse, C. (2010). *Los secretos de salud de los antioxidantes*. Barcelona - España: Editorial Hispano Europea.
- Céron, C. (2006). *Plantas Medicinales de los Andes Ecuatorianos*. Quito - Ecuador: Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador.
- Cerpa, M. (2007). Los aceites esenciales. En *Tesis doctoral: "Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización"* (págs. 1,2,3). Valladolid, España: Universidad de Valladolid.
- Coba, P., Mayacu, L., & Vidari, G. (s.f.). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. 11(1), 22-30.
- de la Torre, L., Navarrete , H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Baccharis latifolia*, *Clinopodium nubigenum*. En *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. (págs. 217,385). Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador &

Herbario AUU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.

De Oliveira, S., Alves de Souza, G., Rodrigues, C., Alves Silva, T., Silva Sobral, E., Aparecida Fávero, O., . . . Romoff, P. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3).

E. Caicedo & S. Otavalo. (2007). *Tesis de Grado: Determinación de temperatura y tiempo de deshidratación para la elaboración de té de sunfo, Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze*. Ibarra - Ecuador: Universidad Técnica del Norte.

El-Seedi, H., Khattab, A., Gaara, A., Mohamed, T., Hassan, N., & El-kattan, A. (2008). Essential oil analysis of *Micromeria nubigena* HBK and its antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*(20(5)), 452-456.

Esquivel, A., & Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha*, 20(4) , 41-48.

Fernández Pachón, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & García Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2).

Fontenla Razzetto, G. (2006). Usos y aplicaciones de los aceites esenciales. En *TESIS: Caracterización del aceite esencial de "Lanche" (Myrcianthes rhopaloides (H.B.K) Mc Vaugh) proveniente del distrito de Chalaco, provincia de Morropón - Piura, obtenido por dos métodos de destilación"* (págs. 10,11). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.

- García Bermejo, M. J., & Silva García, M. (2006). Cromatografía. En *Laboratorio de Bioquímica: Técnico Superior en Laboratorio de Diagnóstico Clínico* (págs. 25,26,27,28). Sevilla, España: MAD, S.L.
- García García, R., & Palou García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 45,47.
- García, L., García, L., Rojo, D., & Sánchez, E. (2001). Plantas con actividad antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*.
- Gennaro, A. (2003). Usos antioxidantes. En *Remington Farmacia* (20 ed., pág. 1187). Médica Panamericana.
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., . . . Vita, P. (2011). *Phytochemical researches and antimicrobial activity of Clinopodium nubigenum Kunth (Kuntze) raw extracts*. Curitiba, Brasil: Rev. bras. farmacogn. vol.21 no.5 .
- Gonzales, E., Villca, T., & Loza, R. (2007). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género Baccharis: B. articulata, B. dracunculifolia, B. salicifolia, B. ulcina, B. latifolia, B. pentlandii, B. obtusifolia, B. subalata. *Revista Boliviana de Química.*, 24(1), 41-44.
- Guarnizo Franco, A., & Martínez Yepes, P. (2009). Cromatografía en capa fina. En *Experimentos de Química Orgánica*. (págs. 101-105). Armenia, Quindío, Colombia: Elizcom.
- Gupta, M. (1995). Baccharis latifolia (R. & P.) Pers. En *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas* (1ra Edición ed., págs. 81,82). Santafé de Bogotá, Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacéutica: Convenio Andres Bello.

- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor*. Universidad Politécnica de Cataluña.
- Herbario Universidad de Navarra. (2008). *Familia Compositae (Asteraceae)*. Recuperado el 24 de Julio de 2015, de UNAVARRA.ES: <http://www.unavarra.es/herbario/htm/Compositae.htm>
- Herbario Universidad de Valencia. (2006). *Asteraceae*. Recuperado el 24 de Julio de 2015, de HerbariVirtual: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/2076.html>
- Iglesias, J. (2006). Diseño de ingredietnes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización en productos derivados de la pesca. Santiago de Compostela, España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Jerves Andrade, L., León , F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., . . . Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research.*, 8(45), 1310-1320.
- Jesús Palá, P. (2002). Aceites esenciales. En *Tesis doctoral: "Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género Eryngium L., EN LA PENÍNSULA IBÉRICA"* (pág. 21). Madrid: Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.
- Jørgensen, P. M., & León Yáñez, S. (1999). *Clinopodium nubigenum*. En *Catálogo de plantas vasculares del Ecuador* (Vol. 75, pág. 519). Quito; St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden.
- Jorrín Novo, J., Abril Díaz, M., & Bárcena Ruiz, J. (2005). *Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina*.

Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales.

Krarup, C., & Moreira, I. (1998). *Hortalizas de estación fría. Biología y diversidad cultural*. Recuperado el 24 de Julio de 2015, de Universidad Católica de Chile, VRA, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal: http://www7.uc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p018.html

Kumar, V., Cotran, R., & Robbins, S. (2006). *Patología Humana*. Madrid, España: Elsevier.

Kuskoski, E., Asuero, A., Parilla, M., Troncoso, A., & Fett, R. (2004). Antioxidant activity in anthocyanic pigments. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)*.

Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. M., Mancini, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4).

León, A., & Robles, A. (2009). Aceites esenciales. En *Tesis: "Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta extractora de aceites esenciales"* (pág. 23). Ibarra, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica del Norte.

Lituma Ulloa, L., & Molina Díaz, V. (2008). *Tesis: "Determinación del efecto analgésico del tipo (Clinopodium nubigenum)"*. Cuenca: Universidad de Cuenca.

Martínez, A. (2001). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod.*, 59(1), 77-79.

Missouri Botanical Garden. (2009). *Mobot*. Obtenido de <http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Clinopodium%20nubigenum>

- Mora, R. (2002). Soporte Nutricional Universal. Bogotá, Colombia: Editorial Médica Panamericana.
- Mora, R. (2002). Soporte Nutricional Universal. Bogotá, Colombia: Editorial Médica Panamericana.
- Muñoz, A., Castañeda , M., Blanco , K., Cárdenas , C., Reyes, J., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et Technica*, vol. XIII, núm. 33, 125,126.
- Noriega , P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Aillon , C., Cabezas , D., . . . Manfredini, S. (2015). Chemical Composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(4), 29-31.
- Noriega, P. F. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja*, 10(2), 3-15.
- Ortuño, M. (2006). Aceites esenciales. En *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes* (Primera ed., pág. 117). España: Aiyana.
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición.*, 58(3), 303-308.
- Patiño, J. (2000). Radicales libres de oxígeno. En *Lecciones de cirugía* (págs. 87,88,89). Bogotá, Colombia: Panamericana.
- Patiño, J. (2006). Metabolismo, Nutrición y Shock. Bogotá - Colombia: Editorial Médica Internacional.

- Pérez García, F., Marín, E., Adzet, T., & Cañigüeral, S. (2001). Activity of plant extracts on the respiratory burst and the stress protein synthesis. *Phytomedicine.*, 8(1), 31-38.
- Pérez, R. M., Vargas, R., Martínez, F. J., García, E. V., & Hernández, B. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*, 44(1), 5-21.
- Persoon, C. H. (1807). *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. Recuperado el 23 de Julio de 2015, de Tropicos: <http://www.tropicos.org/Name/2700275>
- Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E., & Conte, L. (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 82(14), 1645-1651.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Repetto Jiménez, M., & Repetto Kuhn, G. (s.f.). Estrés Oxidativo. En *Toxicología fundamental* (4ta ed., pág. 182). Díaz de Santos.
- Rodríguez Álvarez, M., Alcaraz Meléndez, L., & Real Cosío, S. M. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*.

- Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*, 15(1), 173-181.
- Rubio, P. (2013). *Tesis: Diseño y elaboración de un lipo gel antiinflamatorio de Baccharis teindalensis Kunt. (CHILCA)*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- Ruiz, S., Malagón, O., Zaragoza, T., & Eduardo, V. (2010). Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggersii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676-691.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632.
- Salazar, W., Cárdenas, J., Núñez, M., Fernández, I., Villegas, L., Pacheco, L., & Untiveros, G. (2007). Estudio fitoquímico y de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Euphorbia huanchahana* Y *Baccharis salicifolia*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 150-157.
- Salcedo, L., Pillco, A., Rodrigo, G., Sterner, O., & Almanza, G. (2003). Isolation of flavonoids and study of the toxic and antibacterial activity of *Baccharis latifolia* extracts. *Revista Boliviana de Química*, 20, 43-48.
- Sequeda-Castañeda, L., Célis, C., & Luengas-Caicedo, P. (2015). Phytochemical and therapeutic use of *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.(Asteraceae). *PharmacologyOnline*, 14-17.

- Simonsen, H. T., Riedel, C., Gade, L. B., Jebjerg, C. P., Guzmán, A., & Molgaard, P. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Baccharis magellanica* (Lam.) Pers. and *Baccharis elaeoides* Remy from Chile. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 377-380.
- Stefanovic, O., Stankovic, M., & Comic, L. (2011). In vitro antibacterial efficacy of *Clinopodium vulgare* L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics. *Journal of Medicinal Plants Research*., 5(17), 4074-4079.
- Taga, S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928-931.
- TECNOVA. (2013). *Estudio sobre el uso de las plantas aromáticas y sus aceites esenciales en la industria agroalimentaria*.
- Torrenegra Alarcón, M. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de oregano (*Origanum vulgare*), oregano “borde blanco” (*Origanum vulgare* ssp) y oreganito (*Lippia alba* mill) cultivado en la zona norte del Departamento de Bolívar . Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Tovar del Río, J. (2013). Método DPPH. En *Trabajo de grado: "Determinación de la actividad antioxidante por dpph y abts de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera"* (págs. 15, 16). Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- USAID. (2011). *Aceites esenciales: análisis de la cadena de valor*.
- Vadémecum colombiano de plantas medicinales. (2008). *Baccharis latifolia*. 74-6.
- Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses , M., & Morocho, V. (2013). *Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from

Loja, Ecuador. Loja, Ecuador: Taylor & Francis: The Journal of Essential Oil Research.

Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1998). Cromatografía. En *Técnicas analíticas de separación* (págs. 335,336,337). Barcelona, España: Reverté, S.A.

Wankat, P., & Pozo, V. (2008). En *Ingeniería de procesos de separación* (pág. 234). Pearson Educación.

Wei, A., & Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(5), 1737-1742.

Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa Arango, A. C. (2010). Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family. *Revista iberoamericana de micología*, 27(2), 101-103.