



POSGRADOS

MAESTRÍA EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

OPCIÓN DE TITULACIÓN:

TESIS

TEMA:

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ESTUDIOS BIOAUTOGRÁFICOS DE
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA
ESPECIE CLINOPODIUM BROWNEI
(SW.) KUNTZE

AUTOR(ES)

LISSETTE CAROLINA CALDERÓN
MALDONADO

ANDREA GIOMAYRA OJEDA SHAGÑAY

DIRECTOR:

PACO NORIEGA

QUITO – ECUADOR
2022



Autor(es):



Andrea Giomayra Ojeda Shagñay
Ingeniera en Biotecnología de los RR. NN
Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por
la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.
aojedas@ups.edu.ec |



Lissette Carolina Calderón Maldonado
Ingeniera en Biotecnología de los RR. NN
Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la
Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.
lcalderonm2@ups.edu.ec

Dirigido por:



Paco Fernando Noriega Rivera
Químico
Doctor en Ciencias Farmacéuticas
pnoriega@ups.edu.ec |

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2022 | © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO | ECUADOR – SUDAMÉRICA

Lissette Carolina Calderón Maldonado-Andrea Giomayra Ojeda Shagñay
*Composición Química y Estudios Bioautográficos de Actividad biológica
de la especie Clinopodium brownei (Sw.) Kuntze* |

DEDICATORIA

Las plantas tienen una maravillosa relación con el Sol; absorben los rayos solares y sintetizan compuestos orgánicos que son utilizados por las demás formas de vida.

Así fluye la energía solar hacia la tierra y es almacenada en la materia vegetal en forma de energía química fuente de todos los procesos vitales...

Richard Evans y Albert Hofmann

Plantas de los Dioses

A mis padres Washington y Yadira, por su paciencia y apoyo en cada decisión que he tomado. A mis hermanas por acompañarme en cada aventura y a mis sobrinos por ser mi alegría. A mis amigos por creer en mí y ayudarme a descubrirme.

A las personas que protegen a la naturaleza y sus secretos.

A mi madre María y a mi hermano David, por ser mi soporte y motivación. A mis amigos por su compañía, risas y enseñanzas. Y a los individuos que gracias a sus conocimientos mantienen vivas las prácticas de medicina tradicional a través de las plantas medicinales.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana y a los Laboratorios de Ciencias de la Vida, por brindarnos las herramientas necesarias para poder haber llevado a cabo esta investigación. A sí mismo al personal técnico y docente por tener siempre la disposición de ayudarnos.

A nuestro tutor, PhD. Paco Noriega por su acompañamiento y paciencia, por compartirnos sus valiosos conocimientos en el campo de la fitoquímica y farmacognosia.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	11
Abstract	13
1. Introducción	15
2. Determinación del Problema.....	17
3. Marco teórico referencial.....	18
3.1 Familia Lamiaceae.....	18
3.2 Género <i>Clinopodium</i>	18
3.3 <i>Clinopodium brownei</i> (Sw.) Kuntze.....	19
3.3.1 Clasificación Taxonómica	19
3.3.2 Descripción botánica y ecología	20
3.3.3 Etnobotánica	21
3.4 Fitoquímica	21
3.5 Actividad biológica.....	22
3.6 Aceites esenciales	23
3.7 Actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de aceites esenciales del Ecuador	24
3.8 Métodos de extracción	28
3.8.1 Prensado en frío.....	28
3.8.2 Extracción con solventes volátiles	29
3.8.3 Extracción con fluidos supercríticos	30
3.8.4 Destilación con vapor de agua.....	30
3.8.5 Destilación con agua	31
3.8.6 Destilación con agua y vapor de agua	31
3.9 Análisis de la composición química	31
3.9.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	31
3.9.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	32
3.10 Actividad antimicrobiana.....	33
3.10.1 Método de difusión en disco	33
3.10.2 Método modificado de pozos de agar	34
3.10.3 Método de dilución en agar.....	34
3.10.4 Método de dilución en caldo.....	34

3.11 Actividad antioxidante de aceites esenciales	35
3.12 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante	36
3.12.1 DPPH	37
3.12.2 Método de captación del radical ABTS.....	38
3.12.3 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)	39
3.12.4 Método FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power)	40
3.13 Ensayos Bioautográficos	41
3.14 Bioautografía por contacto.....	41
3.14.1 Bioautografía directa	42
3.14.2 Bioautografía por inmersión o por superposición de agar.....	42
3.14.3 Ensayos bioautográficos antioxidantes	43
3.15 Citotoxicidad	43
3.15.1 Ensayo de colorante sal de MTT	44
3.15.2 Ensayo de colorante azul de tripano	45
4. Materiales y metodología.....	46
4.1 Recolección de material vegetal.....	46
4.2 Destilación	46
4.3 Análisis de composición química	46
4.3.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en columna apolar	46
4.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en columna polar	47
4.3.3 Identificación de los compuestos	48
4.4 Actividad antioxidante.....	48
4.4.1 Método DPPH	49
4.4.1.1 Preparación de soluciones.....	49
4.4.1.2 Modificación para microplacas.....	49
4.4.1.3 Determinación capacidad antioxidante.....	50
4.4.2 Método ABTS	51
4.4.2.1 Modificación para microplacas.....	51
4.4.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante.....	52
4.4.3 Análisis estadístico de datos.....	53
4.5 Actividad antimicrobiana.....	53
4.5.1 Preparación del inóculo bacteriano y fúngico	53
4.5.2 Soluciones de los aceites esenciales.....	54
4.5.3 Preparación del colorante cloruro de trifeniltetrazolio TTC	54

4.5.4 Inoculación en microplacas	54
4.5.5 Determinación de los porcentajes de inhibición.....	55
4.5.6 Análisis estadístico de datos.....	56
4.6 Bioautografía antioxidante	56
4.6.1 Preparación de las muestras	56
4.7 Bioautografía antimicrobiana	57
4.7.1 Reactivación de cepas.....	57
4.7.2 Estandarización del medio de cultivo.....	58
4.7.3 Preparación del medio de cultivo.....	58
4.7.4 Inoculación en la placa CCF	58
4.8 Identificación de compuestos bioactivos	59
4.9 Evaluación de la citotoxicidad	59
4.9.1 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica.....	59
4.9.2 Preparación de soluciones de aceite de <i>C. brownei</i>	60
4.9.3 Inoculación en microplaca.....	60
4.9.4 Determinación de porcentaje de viabilidad y de la CI_{50}	61
5. Resultados y discusión.....	63
5.1 Rendimiento del aceite esencial por hidrodestilación	63
5.2 Análisis de la composición química	64
5.2.1 Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en columna apolar.....	64
5.3 Determinación de la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas en columna polar.....	66
5.4 Determinación de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS....	68
5.5 Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución en caldo	70
5.6 Bioautografía antioxidante DPPH	72
5.7 Bioautografía antimicrobiana	74
5.8 Evaluación de la citotoxicidad	76
6. Conclusiones.....	79
Referencias	81
Anexos	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química columna apolar TR5MS del aceite esencial de las hojas y tallos de <i>Clinopodium brownei</i>	64
Tabla 2. Composición química columna DB5-Wax del aceite esencial de las hojas y tallos de <i>Clinopodium brownei</i>	66
Tabla 3. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Clinopodium brownei</i> y el control natural <i>Thymus vulgaris</i>	68
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y categorización del aceite esencial.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes aéreas de <i>Clinopodium brownei</i>	20
Figura 2. Reacción DPPH*	37
Figura 3. Sal de amonio ABTS.....	39
Figura 4. Ejemplo de reacción del método ABTS usando como antioxidante Trolox. 39	
Figura 5. Reducción de 2,4,6-TrpiridilTriazina Férrica (TPTZ)	41
Figura 6. Diagrama de ensayo DPPH en microplaca	50
Figura 7. Diagrama de ensayo ABTS en microplaca	52
Figura 8. Diagrama del ensayo para actividad antimicrobiana.....	55
Figura 9. Diagrama de ensayo de citotoxicidad	61
Figura 10. Actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Clinopodium brownei</i> frente al control natural de <i>Thymus vulgaris</i>	69
Figura 11. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), comparación entre el aceite esencial de <i>C. brownei</i> y <i>T. vulgaris</i>	71
Figura 12. Ensayo bioautográfico antioxidante de DPPH del aceite esencial de <i>C. brownei</i>	73
Figura 13. Ensayo bioautográfico antimicrobiano del aceite esencial de <i>Clinopodium brownei</i> frente a la bacteria Gram positiva <i>Listeria grayi</i> . Rf = 0.937 correspondiente a cariofileno	75
Figura 14. Ensayo bioautográfico antimicrobiano del aceite esencial de <i>Clinopodium brownei</i> frente a la bacteria gram negativa <i>Proteus vulgaris</i> . Rf = 0.937 correspondiente a cariofileno.....	75
Figura 15. Curva dosis respuesta.....	77

[COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTUDIOS
BIOAUTOGRÁFICOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA
ESPECIE
CLINOPODIUM BROWNEI (SW.) KUNTZE]

AUTOR(ES):

[LISSETTE CALDERÓN MALDONADO
ANDREA GIOMAYRA OJEDA SHAGÑAY]

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la composición química del aceite esencial de *Clinopodium brownei* (Sw.) Kuntze, Lamiaceae. Esta planta medicinal nativa del Ecuador, es utilizada tradicionalmente para tratar resfriados, problemas digestivos, espanto y como repelente de insectos. El material vegetal fue recolectado en la región Amazónica y el aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación. Además, se evaluó la actividad biológica del aceite esencial mediante ensayos químicos, microbiológicos y de viabilidad celular. Y se determinó las moléculas responsables de la bioactividad a través de estudios bioautográficos.

Se identificaron 23 compuestos en el aceite esencial, de los cuales los más abundantes fueron: cinamato de etilo (21,4 %), pulegona (20,76 %), cinamato de metilo (16,68 %), cariofileno (8,17 %) y mentona (7,51 %). En cuanto a la evaluación de la capacidad antioxidante a través de los métodos DPPH y ABTS se obtuvieron los siguientes valores de actividad CI_{50} $1,7709 \pm 0,26$ mg/mL y CI_{50} $0,0558 \pm 0,002$ mg/mL, respectivamente. Respecto a la evaluación antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo, se determinó que las cepas más sensibles fueron *Listeria grayi* ATCC 1912, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Candida albicans* ATCC 10231, cuyos CMI's fluctúan entre 0,5 y 5 mg/mL, por lo que se considera que el aceite posee una actividad inhibitoria moderada.

Las pruebas bioautográficas señalan a los fenilpropanoides: cinamato de metilo y cinamato de etilo, como los compuestos responsables de la actividad antioxidante y al cariofileno como la molécula involucrada en la inhibición del crecimiento microbiano.

El ensayo de viabilidad celular demostró que el aceite esencial tiene una capacidad citotóxica cercana al 100 % a una concentración de 500 ppm en células mononucleares de sangre periféricas.

Los ensayos realizados con el aceite esencial de *C. brownei* permitieron comprobar el uso terapéutico del aceite. Estableciéndose diferentes grados de bioactividad para esta planta; esto podría constituir un punto de partida para su potencial aplicación como fitofármaco.

Palabras clave:

Clinopodium brownei, fenilpropanoides, bioautografía antioxidante bioautografía antimicrobiana, citotoxicidad.]

ABSTRACT

In the present study, the chemical composition of the essential oil of *Clinopodium brownei* (Sw.) Kuntze, Lamiaceae, was determined. This medicinal plant native to Ecuador, is traditionally used to treat colds, digestive problems, fright and as an insect repellent. The plant material was collected in the Amazon region and the essential oil was obtained by hydrodistillation. In addition, the biological activity of the essential oil was evaluated through chemical, microbiological and cell viability assays. And the molecules responsible for the bioactivity were determined through bioautographic studies.

There were 23 compounds identified in the essential oil, of which the most abundant were: ethyl cinnamate (21.4%), pulegone (20.76%), methyl cinnamate (16.68%), caryophyllene (8, 17%) and mentona (7.51%). Regarding the evaluation of the antioxidant capacity through the DPPH and ABTS methods, the following activity values were obtained $IC_{50} 1.7709 \pm 0.26$ mg/mL and $IC_{50} 0.0558 \pm 0.002$ mg/mL, respectively. Respect to the antimicrobial evaluation using the broth microdilution technique, it was determined that the most sensitive strains were *Listeria grayi* ATCC 1912, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 and *Candida albicans* ATCC 10231, whose MICs fluctuate between 0.5 and 5 mg/mL, therefore inhibitory activity is considered moderate.

Bioautographic tests point to the phenylpropanoids: methyl cinnamate and ethyl cinnamate, as the compounds responsible for the antioxidant activity and caryophyllene as the molecule involved in the inhibition of microbial growth.

The cell viability assay showed that the essential oil has a cytotoxic capacity close to 100% at a concentration of 500 ppm in peripheral blood mononuclear cells.

The tests carried out with the essential oil of *C. brownei* made it possible to verify the therapeutic use of the oil. Establishing different degrees of bioactivity for this plant; this may constitute a starting point for its potential application as a phytopharmaceutical.

Key words:

Clinopodium brownei, phenylpropanoids, antioxidant bioautography, antimicrobial bioautography, cytotoxicity.

1. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está basada principalmente en la aplicación del conocimiento de plantas medicinales con fines terapéuticos. A pesar de que la industria farmacéutica ha tenido un gran avance tanto en la producción como en investigación y desarrollo de nuevos fármacos, en Ecuador las plantas medicinales siguen formando parte del tratamiento de enfermedades comunes, sobre todo en zonas rurales en donde el acceso a sistemas de salud y medicamentos sintéticos resulta difícil. Las plantas medicinales y los conocimientos ancestrales son de gran importancia para las farmacéuticas al momento de investigar y desarrollar nuevos fármacos, dado que también se han desarrollado formas más eficientes de aprovechar los principios activos de las plantas (Hoogesteger, 1994). Muchas veces se considera a las plantas medicinales y a los fármacos como dos mundos opuestos, sin embargo, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos concluyó que el 67 % de los fármacos tiene su origen, en mayor o menor medida, en la naturaleza y aproximadamente el 25 % de estos fármacos derivan de plantas (Gallegos, 2016).

La mayoría de las plantas estudiadas a partir de su uso tradicional han demostrado poseer efectos antibacterianos, antifúngicos y antioxidantes, que permiten corroborar su uso. Esto debido a la biosíntesis de metabolitos biológicamente activos que contiene la materia vegetal, los cuales varían según el hábitat y condiciones edafológicas en donde crecen las plantas (Azuero et al., 2016).

La presente investigación tuvo como objetivo identificar la actividad biológica del aceite esencial de *C. brownei* recolectado en la Amazonia ecuatoriana y obtenido por hidrodestilación. Se estudió la capacidad antioxidante mediante técnicas de captación de radicales libres ABTS y DPPH.

Se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite a diferentes concentraciones frente a cepas de microorganismos Gram positivos, Gram negativos y levaduras, usando la

técnica de microdilución en caldo. También se determinó a través de técnicas bioautográficas los compuestos responsables de la actividad biológica. Además, se identificó la capacidad citotóxica *in vitro* del aceite esencial frente a células mononucleares de sangre periférica extraídas.

A través de esta investigación se determinó que *C. brownie*, posee una capacidad antioxidante moderada debido a tres compuestos que se encuentran en su aceite. También presenta capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, y posee una leve actividad citotóxica sobre células sanguíneas *in vitro*.

2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

Se conoce que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional con fines terapéuticos. El uso de plantas medicinales en países en vías de desarrollo como el Ecuador, constituye la principal fuente de atención sanitaria primaria. Por otro lado, hay que considerar que las plantas medicinales y sus productos derivados son fuente de moléculas terapéuticas, además son el punto de partida para la fabricación de fármacos sintéticos o semisintéticos. En nuestro país la producción y consumo de productos naturales y fitofármacos ha ido en aumento, esto debido a la alta biodiversidad vegetal; pues el 60% de plantas útiles registradas son de uso medicinal.

A pesar de que se cree que los productos elaborados en base a plantas son inocuos, gran parte de los extractos vegetales contienen sustancias tóxicas y moléculas con actividad biológica. De ahí la importancia de caracterizar químicamente los principios activos producidos por plantas, así como evaluar su actividad biológica y toxicidad. Los metabolitos secundarios naturales como los aceites esenciales son matrices químicas muy complejas, por lo que sus mecanismos de acción, blancos moleculares y bioactividad necesitan ser evaluados. Se sabe que tan solo el 15% de las plantas de uso medicinal han sido investigadas, aun cuando existe una creciente tendencia hacia la aplicación de fármacos naturales de baja toxicidad. En el Ecuador se reportan más de 3000 especies vegetales de uso medicinal; plantas aromáticas como *C. brownei* son empleadas para el tratamiento de diversas afecciones según el conocimiento tradicional. Es por esto el interés de evaluar mediante técnicas fitoquímicas y bioautográficas, la composición química del aceite esencial de esta especie, así como su actividad antibacteriana, actividad antioxidante y citotoxicidad.

3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 | FAMILIA LAMIACEAE

La familia Lamiaceae o Labiatae, está comprendida por plantas que suelen presentarse como hierbas anuales, bienales o perennes. Se caracterizan por ser aromáticas debido a la presencia de glándulas epidérmicas que producen aceites volátiles, esta particularidad hace que sean especies utilizadas con fines terapéuticos, cosméticos y culinarios (Venkateshappa & Sreenath, 2013).

De distribución cosmopolita, se han identificado 250 géneros y más de 7000 especies, entre los principales géneros podemos mencionar *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Plectranthus*, *Teucrium*, *Vitex*, *Thymus* y *Nepeta* (Karpiński, 2020).

En el Ecuador se han descrito alrededor de 27 géneros y 219 especies que se encuentran principalmente en bosques andinos, páramos y valles interandinos sobre los 1000 m., aunque también se las ha observado en bosques costeros secos, Galápagos y la Amazonía. Los géneros más representativos de lamiáceas en el país son *Salvia*, *Hyptis*, *Lepechinia*, *Clinopodium*, *Scutellaria* y *Stachys* (León-Yáñez et al., 2022).

3.2 GÉNERO *CLINOPODIUM*

Las plantas pertenecientes a este género son hierbas o arbustos perennes, de hojas simples pecioladas a sésiles, glabras a pubescentes, con tricomas simples o ramificados, márgenes dentados a enteros, las inflorescencias se ubican en las cimas axilares, opuestas, presentan a menudo flores solitarias pediceladas a sésiles; flores zigomorfas, bisexuales o estaminadas, corola blanca, azul, lavanda, roja o anaranjada, bilabiada, tubo recto a curvado y gradualmente dilatado (Cadena, 2017).

La distribución del género se da principalmente en zonas del sur y sureste de Europa, sin embargo, en América se ha encontrado alrededor de 50 especies. En el Ecuador se las puede encontrar a los 1500- 3000 m.s.n.m principalmente en la región Andina, pero también se ha reportado la presencia de especies en Costa y Amazonía. Se calcula que el número total de plantas del género *Clinopodium* en el país son 7, de las cuales 2 son endémicas; estas son *C. brownei*, *C. fasciculatum*, *C. mutabile*, *C. nubigenum*, *C. sericeum*, *C. taxifolium*, y *C. tormentosum* (León-Yáñez et al., 2022; Torre, 2008).

El género *Clinopodium* está compuesto por plantas de alto valor medicinal, esto debido a la presencia de moléculas como flavonoides, saponinas, triterpenoides, glucósidos terpénicos, terpenoides, aceites volátiles y fenilpropanoides, cuyos efectos terapéuticos son bien conocidos por ser inmunoreguladores, reductores de glucosa en sangre, antitumorales y antioxidantes (Liu et al., 2020).

3.3 *CLINOPODIUM BROWNEI* (SW.) KUNTZE

3.3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el International Plant Names Index (IPNI), la especie se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium brownei* (Sw.) Kuntze

3.3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ECOLOGÍA

Figura 1.

Partes aéreas de Clinopodium brownei



Fuente: Autoras, (2022).

Clinopodium brownei, también conocida como *Thymus brownei*, *Satujera brownei* o *Micromeria brownei*, es una especie herbácea, rastrera y aromática. De tallos cuadrangulares, hojas simples opuestas pequeñas y ovaladas de margen aserrado cubiertas de pubescencias; sus flores son de color lila claro y crecen solitarias en las axilas. Su crecimiento se produce extendiéndose libremente sobre los nudos, sin embargo, presenta brotes erectos de hasta 20 cm de alto durante la floración (Vandebroek & Picking, 2020).

Nativa del sureste de Estados Unidos, América central, Caribe y Sudamérica, está presente en países como México, Guatemala, Jamaica, Cuba, Colombia y Ecuador. Se propaga en zonas húmedas y cálidas, en Ecuador se la encuentra desde los 2500 m hasta los 3600 m, en las provincias de Azuay, Chimborazo, Loja, Pichincha y Tungurahua (Matailo et al., 2019). Sin embargo se han recolectado especímenes en la provincia de Los Ríos (150-220 m), Pichincha (1500 m) y Morona Santiago (831-979 m) (Calaway, 1979; Sparre, 1967; Bennett & Gómez, 1989).

3.3.3 ETNOBOTÁNICA

En Ecuador a *C. brownei* se la conoce popularmente como: “Tipo pequeño”, “Warmi poleo” o “Poleo de la tierra” y es usada por pueblos kichwas de la sierra principalmente en forma de decocción para tratar malestares respiratorios y digestivos. Además, esta planta se emplea como expectorante en el tratamiento de la gripe, bronquitis y asma. Las hojas y flores se usan en casos de diarrea, dolor menstrual y de estómago; en forma de cataplasma se usa para aliviar síntomas alérgicos (Armijos et al., 2021; Vandebroek & Picking, 2020).

Esta planta es usada en la medicina tradicional en varios países de la región: en México se la conoce como “Póleo” o “Maltazín morado” y es utilizada en casos de infecciones gastrointestinales, caries, dolor de oído y de cabeza, tuberculosis, anginas, fiebre y poliomielitis. En Jamaica se la denomina “Pennyroyal” y es aprovechada como una planta para el cuidado de la salud de la mujer, ya que se cree que ayuda a limpiar el útero. En el Caribe se emplea para tratar problemas bronquiales, calambres estomacales, diarrea, náuseas y flatulencia, en algunos casos en conjunto con otras plantas se la usa para inducir el aborto. También se ha reportado su uso como calmante nervioso, dolor de cabeza y para aliviar picaduras de insectos (Cadena, 2017; Vandebroek & Picking, 2020).

En Colombia, Venezuela y Argentina es utilizada como condimento y se emplea en la medicina popular por su efecto carminativo, digestivo, colagogo, espasmolítico, expectorante, diurético y antiséptico (Vandebroek & Picking, 2020).

3.4 FITOQUÍMICA

Los estudios fitoquímicos para esta especie se centran en la composición del aceite esencial, algunos ensayos se han llevado a cabo para su caracterización química; en una investigación realizada en Venezuela se determinó que los compuestos predominantes en el aceite esencial son pulegona (64,3 %), mentona (20,2 %), isomentona (3,4 %) e isopulgona (2,4 %) (Rojas & Usubillaga, 2000). Así mismo un

estudio realizado por Jaramillo et al., en 2010, determinó que la composición química volátil de extractos y aceite esencial de *Satureja brownei* (Sw.) Briq. colombiana es en su mayoría pulegona (54-71 %), otros compuestos encontrados en alta proporción fueron mentona (16 -32 %), isomentona (3-5 %), isomentol (2 %) y trans- β -cariofileno (2-3 %).

Otro estudio realizado en el Ecuador permitió identificar alrededor de 31 compuestos del aceite volátil de *C. brownei*, siendo pulegona (48,44 %), mentona y β -acorenol (3,41 %) los componentes principales. Las fracciones del aceite volátil más abundantes son monoterpenos oxigenados (86,06 %) y sesquiterpenos oxigenados (5,36 %). En cuanto a la composición enantiomérica, se reporta la presencia de B-pineno, sabineno, 3-octanol, mentona pulegona y acetato de metilo (Matailo et al., 2019).

3.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Estudios de la bioactividad de *Clinopodium brownei* han reportado que esta especie posee actividad antioxidante gracias a los terpenos presentes en el aceite esencial (Jaramillo et al., 2010). En cuanto a la actividad antimicrobiana se determinó que el aceite esencial de *S. brownei* posee acción antibacterial alta frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y débil-moderada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Aguilar et al., 2015).

Se ha determinado también la bioactividad del aceite volátil de esta planta frente a mecanismos de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa (BuChE), relacionada a la degradación de la acetilcolina asociada a la enfermedad de Alzheimer.

Dentro del género *Clinopodium* se han realizado estudios en el país en plantas como *Clinopodium nubigenum*, cuyo aceite esencial demostró ser un potente antioxidante debido a la presencia de ciertas moléculas como el acetato de carvacrol, timol, limoneno, δ -elemeno y γ -muroleno. Además, demostró ser un buen agente antimicrobiano siendo eficaz frente a *S. mutans*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* (Noriega, Mosquera, Osorio, et al., 2018).

Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts es una especie endémica del Ecuador de gran interés farmacológico, estudios han demostrado la presencia de fitoesteroles, ácido rosmarínico y hesperidina en extractos etanólicos. Además, se ha comprobado la actividad antioxidante y de angiogénesis (Moncayo, 2020; Tubon et al., 2020).

Otros estudios fitoquímicos han caracterizado los metabolitos del aceite esencial de *Clinopodium taxifolium* siendo el carvacrol metil éter, carvacrol y carvacril acetato los componentes principales. Para esta especie se reporta actividad hipoglucemiante ya que el extracto de acetato de etilo demuestra inhibición *in vitro* de la enzima α -glucosidasa. Otra de las propiedades comprobadas de esta planta es la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) y butilcolinesterasa (BChE) (Espinosa et al., 2020; Morocho et al., 2018).

3.6 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente homogéneas de hasta 100 compuestos de origen terpénico y no terpénico, se definen como el producto obtenido a partir de materia vegetal por un proceso mecánico, hidrodestilación, destilación al vapor o seca (Zuzarte & Salgueiro, 2015).

También conocidos como esencias, aceites volátiles, aceites etéreos o aetheroleum, los aceites esenciales se componen de una mezcla compleja de monoterpenos y sesquiterpenos principalmente, se ha identificado también hidrocarburos oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles. Dentro de los compuestos no terpénicos podemos mencionar los fenilpropanoides, ácidos grasos y sus ésteres; y de manera poco frecuente compuestos nitrogenados y azufrados. Sin embargo, la composición de los aceites puede variar debido a factores intrínsecos como variaciones sexuales, estacionales, ontogenéticas y genética; así como variaciones ecológicas y ambientales (factores extrínsecos) (Zuzarte & Salgueiro, 2015).

Los aceites volátiles son especialmente abundantes en las coníferas, lamiáceas, apiáceas, mirtáceas, rutáceas y asteráceas; y son metabolitos de gran potencial terapéutico debido a la actividad biológica que poseen sus constituyentes. Entre las acciones farmacológicas que poseen los aceites esenciales están: poder antiséptico, poder irritante, acción espasmolítica y sedante. Se han identificado también efecto colagogo y colerético, acción antirreumática, antiinflamatoria, antiflogística y efecto cicatrizante (García et al., 2015).

3.7 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE ACEITES ESENCIALES DEL ECUADOR

La investigación sobre el uso de plantas medicinales en nuestro país es un recurso importante, desde el punto de vista etnobotánico para su uso en la cotidianidad, así como desde la medicina, pues constituye el punto de partida para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

En este sentido el estudio de las plantas en el Ecuador se ha centrado en la caracterización fitoquímica, farmacológica y toxicológica de metabolitos secundarios. Tal es el caso de los aceites volátiles, sustancias presentes en diversas especies botánicas que presentan un alto potencial terapéutico.

Investigaciones realizadas en la región amazónica, han permitido identificar plantas como *Ocotea quixos* cuya actividad antioxidante destaca, al compararla con estándares naturales conocidos, como el tomillo. Esto se debe a la presencia de compuestos activos en el aceite esencial como: el trans-alfa-bergamoteno y el (E)-O-metoxicinamaldehído. En cuanto a la inhibición antimicrobiana, se observó actividad alta frente a microorganismos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria grayi*, *Micrococcus luteus*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton rubrum*, esto debido a la presencia de cinamil acetato en la fracción volátil (Noriega, Mosquera, Paredes, et al., 2018).

Otras especies amazónicas caracterizadas fitoquímicamente son: *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotepala*, *Piper leticianum*, *Piper augustum* y *Hedychium coronarium*. Los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *S. aspera* fue el germacreno-D, mientras que para *P. leticianum* y *P. augustum* fue el β -cariofileno. Para *H. coronarium* se reportó al eucaliptol como el compuesto principal. Respecto a la capacidad antioxidante, se determinó una baja actividad para todos los aceites, sin embargo, se observó un significativo efecto depurador de radicales relacionado al contenido de germacreno-D en *Siparuna macrotepala*. En cuanto a la actividad antimicrobiana se menciona que *H. coronarium*, es la especie que muestra mayor inhibición frente a *L. grayi*, *K. oxytoca* y *S. mutans*, siendo el 1,8-cineol y el terpinen-4-ol las moléculas responsables (Noriega et al., 2019).

Existen también estudios acerca de la genotoxicidad de los aceites esenciales de plantas del oriente ecuatoriano como: *Piper aduncum* (Matico) y *Piper obliquum* (Anís del Oriente), cuyo uso como genotóxico es posible bajo ciertas condiciones, presumiblemente por efecto de moléculas como el safrol. Además, se enfatiza el poder antifúngico por parte del dillapiol y alilbencenos presentes en el aceite volátil del matico (Guerrini et al., 2009).

Otras plantas aromáticas pertenecientes a la familia de las piperáceas han sido objeto de investigación; la especie *Piper carpunya* cuyo aceite esencial está constituido fundamentalmente por piperitona (26,2 %), limoneno (9,5 %), elemicina (7,2 %) y β -felandreno (5,6 %), demostró actividad antioxidante moderada que estaría más bien relacionada a los compuestos minoritarios del aceite. En cuanto a las pruebas antimicrobianas, se determinó una relación interesante en sinergia con el fluconazol frente a *C. albicans*; los resultados fueron prometedores ya que la carga microbiana disminuyó drásticamente al cabo de 2 horas. La genotoxicidad también fue evaluada concluyendo que el uso de este aceite volátil es seguro (Ballesteros et al., 2019).

Respecto al estudio de plantas de la región andina podemos citar la investigación realizada por Valarezo et al. (2015), para determinar la composición química del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia*, así como su actividad biológica. Los resultados obtenidos del screening fitoquímico determinaron que los compuestos más abundantes fueron: limoneno, germacreno-D y α -pineno. En cuanto a efecto antimicrobiano para esta especie se observó que existe inhibición moderada frente a *K. pneumoniae* y *E. fecalis*, mientras que en hongos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, la actividad del aceite fue alta.

Existen especies que llaman mucho la atención de los investigadores debido a las propiedades terapéuticas que tradicionalmente se les atribuye, este el caso de *Croton lechleri*, mejor conocida como “sangre de drago” cuya composición química y bioactividad ha sido estudiada en algunos de los metabolitos que produce. En lo que se refiere al aceite esencial de la corteza de esta planta, se determinó que los compuestos mayoritarios son el sesquicineol y el α -calacoreno, sin embargo, los compuestos relacionados a la actividad antioxidante son α -calacoreno, β -calacoreno y δ -cadaleno; mientras que en el efecto antimicrobiano la molécula involucrada es el sesquicineol, aunque la actividad fue baja, llama la atención que existe mayor efectividad frente a bacterias Gram negativas como *E. coli*. En cuanto a la toxicidad y propiedades mutagénicas; el aceite de *Croton lechleri* no es citotóxico y actúa como un protector mutagénico (Rossi et al., 2011).

El enfoque actual de las investigaciones acerca del perfil fitoquímico y bioactividad de los metabolitos secundarios busca establecer una relación entre el efecto biológico y la molécula responsable del mismo. En lo que concierne a los aceites esenciales es posible detectar las fracciones involucradas; pues no siempre los compuestos más abundantes son los que intervienen en los procesos celulares; y es precisamente esta información la que permite diferenciar quimiotipos de una misma especie. Un estudio que aborda la caracterización de un aceite esencial desde esta perspectiva es la realizada por Scalvenzi et al. (2017), en la especie neotropical *Myrcia splendens*, los resultados encontrados en lo referente a la composición química indican que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en

plantas de otras regiones. A pesar de que tanto el efecto antimicrobiano como el antioxidante fueron bajos, se puede destacar el potencial citotóxico *in vitro* frente a la línea celular MFC7. Por otro lado, el compuesto mayoritario en la esencia de *M. splendens* fue el trans-nerolidol, cuyas aplicaciones farmacológicas son mejorar la absorción cutánea de un fármaco.

La variación de la composición química de los metabolitos secundarios entre especímenes vegetales de una misma especie, se conoce como quimio-variabilidad, esta diversificación es producida ya sea por factores genéticos (variabilidad de cromosomas) o por factores epigenéticos (factores geográficos, climáticos y ambientales), estos cambios aunque sutiles no causan mayor efecto sobre la morfología de la planta, sin embargo pueden provocar grandes modificaciones en el fenotipo químico, dando origen a los quimiotipos. Este fenómeno es frecuente en los aceites esenciales producidas en plantas, pero no todas sufren este proceso de especiación, que influye en las propiedades químicas y biológicas del metabolito; afectando consecuentemente a las propiedades farmacológicas. En el Ecuador, se han identificado varios quimiotipos de plantas a través de la caracterización química de aceites esenciales, este es el caso del estudio realizado en los frutos del naranjo amargo del género *Citrus*, en esta investigación se analizó la composición química y la actividad biológica de 6 muestras de especies de la Amazonía: *Citrus nobilis* (CN), *Citrus aurantium* (CA), *Citrus limon* (CL1 y CL2) y una mezcla de *Citrus spp* (C1 y C2).

Se encontró entonces que para el aceite esencial de CA existe un quimiotipo atípico de sabineno/trans-E-ocimeno, para CL1 también se descubrió una composición atípica siendo el limoneno (52,7 %) y el linalol (15,1 %) los compuestos más abundantes en la muestra. Para CL2 se definió un quimiotipo de limoneno (24,1 %)/sabineno (36,1 %)/linalol (4,7 %), mientras que para la muestra de CN se determinó un quimiotipo γ -terpineno/linalol, en cuanto a la composición de las muestra de *Citrus spp*. C1 y C2, no se pudo determinar diferencias entre los quimiotipos reportados en literatura para la especie, sin embargo, se evaluó la bioactividad de la mezcla de aceites. La muestra C1, fue la que mostró mayor capacidad antibacterial y antioxidante. Se destaca además las propiedades antidematofíticas

de C1, CN y C2, siendo esta última la más interesante, concluyendo que la mezcla de estos aceites tiene mucho potencial para ser usados en preparaciones cosméticas (Guerrini et al., 2014)

La quimio biodiversidad de los aceites esenciales se ve expresada en los diversos quimiotipos existentes para una misma planta, resulta interesante que existan especies que a pesar de que crezcan en una zona geográficas de condiciones ambientales similares presentes perfiles químicos tan distintos; entre estas especies podemos mencionar a *Baccharis latifolia*, cuya caracterización fitoquímica presenta como componentes mayoritarios: limoneno (33,72 %), β -felandreno, sabineno (10,28 %), β -pineno (6,99 %), α -pineno (5,44 %), γ -curcumeno (5,44 %) y cubenol (4,85 %), resultados que difieren de los reportados para la misma, en otras zonas de la región andina; pues según bibliografía para *B. latifolia* recolectada en Bolivia, las moléculas mayoritarias en el aceite fueron: ; germacrona (41,8 %), limoneno (23,6 %), α -tuyeno (10,9 %), α pineno (6,3 %), γ -elemeno (10,3 %) y verboccidentafurano (5,6 %). Existen también diferencias entre la composición del aceite de plantas recolectadas en Colombia y Venezuela. Así como hay variabilidad en el screening fitoquímico, se ha identificado también distinta actividad biológica para la misma especie. Destacándose la propiedad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas para la especie de los andes colombianos, mientras que la especie recolectada en Loja es inactiva para bacterias, pero posee considerable actividad antifúngica (Valarezo et al., 2013).

3.8 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

3.8.1 PRENSADO EN FRÍO

Es un proceso mecánico muy utilizado en extracciones de aceites esenciales provenientes de la cáscara de cítricos, consiste en romper mediante presión o abrasión las glándulas sebáceas hasta que el aceite sea liberado, el producto obtenido será una emulsión con impurezas, razón por la cual deberá ser sometido a centrifugación, para su purificación. Los aceites obtenidos por este método tienden a presentar parafinas y ceras que pueden ser removidas a través de un

proceso de “dicernación”, para esto el aceite se conservará varios días en reposo (más de una semana) a una temperatura de -20 °C, posteriormente se centrifugará y conservará en atmósfera de gas inerte. Este tipo de extracción es característica para especies del género *Citrus* (Noriega, 2009; Rodríguez et al., 2012).

3.8.2 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES VOLÁTILES

Este método se emplea para extraer aceites termolábiles; los solventes comúnmente utilizados son el alcohol, hexano, etanol, éter de petróleo y metanol. Para esto la materia vegetal seca entra en contacto con el solvente y este es capaz de solubilizar el aceite esencial, sin embargo, se extraen al mismo tiempo otras sustancias, obteniéndose una matriz con impurezas. En este proceso es importante tener en cuenta el cálculo de las tasas de difusión, es decir la transferencia del producto de la fase sólida a la líquida; esto se realiza según la siguiente ecuación:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{S \cdot D (C_s - C)}{s}$$

Dónde (S) corresponde a la superficie de contacto entre la fase del coeficiente de difusión de soluto en la solución (D) y de la concentración del soluto en el líquido (C), al tiempo t y en la película líquida entorno al sólido que se está extrayendo C_s , antes que del espesor de la película líquida entorno al sólido (s). Es decir, la velocidad de transferencia de masa aumenta cuando la superficie de contacto S es mayor, dando como resultado un mejor rendimiento.

En cuanto a la purificación del aceite, se la puede realizar por a través de una destilación a al vacío a bajas temperaturas, para asegurar que se conserven los compuestos volátiles en la esencia (Noriega, 2009; Stratakos & Koidis, 2016)

Una de las limitaciones de esta técnica es la extracción de otros compuestos como ceras y pigmentos, de ahí la importancia de utilizar un solvente selectivo capaz de disolver las moléculas volátiles, pero con baja afinidad por sustancias indeseadas;

además, el solvente deberá ser inerte, es decir que no debería reaccionar con el producto extraído, también es deseable un disolvente inmiscible en agua, no inflamable y de bajo punto de ebullición. A escala de laboratorio la extracción con solventes se realiza con la ayuda de percoladores o extractores Soxhlet (Noriega, 2009)

3.8.3 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

El material vegetal es procesado y empacado en una cámara de acero inoxidable, a la cual se le inyectará un fluido en estado supercrítico, por lo general se utiliza anhídrido carbónico supercrítico ($\text{CO}_2\text{-SC}$), este actuará como el solvente que solubilizará y extraerá las esencias de la muestra. Posteriormente el solvente se eliminará por descompresión progresivamente hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente

El CO_2 en condiciones de alta presión se convierte en líquido, además es inerte y no genera residuos ya que puede pasar a estado de gas y evaporarse a condiciones normales de presión atmosférica y temperatura. Es por esto que este método se considera eficiente y seguro ya que durante la extracción no se producen residuos tóxicos, además se lleva a cabo a bajas temperaturas, evitando así la descomposición térmica de los compuestos (Rodríguez et al., 2012; Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

3.8.4 DESTILACIÓN CON VAPOR DE AGUA

Consiste en la vaporización de los componentes volátiles de una mezcla de dos líquidos inmiscibles por acción de una corriente directa de vapor de agua, que por un lado calentará la mezcla hasta la ebullición y disminuirá la temperatura al adicionar tensión de vapor, del vapor inyectado a los componentes volátiles del aceite. Posteriormente los vapores generados se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial, se separarán en un decantador o vaso florentino (Rodríguez et al., 2012).

3.8.5 DESTILACIÓN CON AGUA

El material vegetal en contacto con el agua a manera de suspensión alcanza la temperatura de ebullición produciendo vapores que se condensarán en una fracción acuosa. El producto obtenido de la destilación será un aceite inmiscible en agua, por lo que su separación se producirá por diferencia de densidades.

Una de las principales limitaciones de este método es la degradación térmica por lo que se recomienda realizar el proceso con agitación, así mismo para una mejor difusión, la materia prima debe ser pulverizada. Otra desventaja de esta técnica es que durante el proceso ciertas moléculas como los ésteres pueden sufrir hidrólisis, mientras que en el caso de los aldehídos y los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos pueden polimerizarse (Noriega, 2009).

3.8.6 DESTILACIÓN CON AGUA Y VAPOR DE AGUA

Este método consiste en exponer el material vegetal a un vapor húmedo, sin entrar en contacto directo con el agua, esto a través de un fondo falso sobre el cual reposará la planta. Los rendimientos mediante este método son mejores que las técnicas de destilación anteriormente citadas, esto debido a un mecanismo de recirculación del agua condensada, inclusive se puede reducir pérdidas de componentes polares, si el reflujo de agua es controlado (Noriega, 2009).

3.9 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

3.9.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

Esta técnica se basa en la separación e identificación de los compuestos de una mezcla, debido a las diferencias entre las propiedades físicas de las moléculas, a través de una serie de equilibrios entre la fase móvil y estacionaria. Para esto, se inyectará un volumen muy pequeño de la muestra con una microjeringa en un inyector donde será volatilizada, posteriormente un gas neutro impulsará los

vapores a través de una columna en una cámara de temperatura donde la muestra se mantendrá en estado gaseoso. Cabe mencionar que el interior de la columna esta recubierta por la fase estacionaria, que interactuará con los componentes del aceite, reteniendo a cada uno de una manera diferente, provocando salida ordenada de las moléculas. El tiempo que tardan los componentes en abandonar la columna es cuantificado por medio de un detector (tiempo de detección), así también la concentración respectiva. Finalmente, para la identificación de los componentes, se el equipo se acoplará a un espectrómetro de masas que ionizará las moléculas a medida que salen del detector, esto permitirá determinar la proporción entre el peso molecular y su carga eléctrica (Serda, 2013).

3.9.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Se coloca una pequeña cantidad de la muestra disuelta en un tubo de vidrio largo irá dentro del campo magnético del equipo. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical. Posteriormente lo que sucede dentro del equipo es que la radiación rf excitará a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN) (Vila, 1987).

El equipo de RMN permite analizar la composición de un aceite entero de los componentes más abundantes, además permite definir una huella metabolómica. Sin embargo, se considera una técnica comprobatoria frente a la cromatografía de gases (Rossi et al., 2011).

3.10 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los extractos de plantas, así como sus compuestos aislados han sido y siguen siendo ampliamente estudiados para la investigación de componentes naturales con aplicación farmacológica y para el control microbiano (Rivas et al., 2016).

Debido a la actual problemática producida por la resistencia bacteriana se han incrementado las investigaciones de nuevos medicamentos con capacidad antibacteriana, obtenidos principalmente a partir del estudio de extractos naturales como fuente de moléculas bioactivas (Ramírez & Marin, 2009).

Las técnicas para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos naturales sobre bacterias y hongos suelen ser similares, usualmente varía la forma en que se prepara el inóculo, el tipo de medio de cultivo en que se va a incubar, la temperatura y el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos dependerán del tipo de técnica que se emplee (Rivas et al., 2016).

3.10.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Esta técnica también conocida como método de Kirby-Bauer permite determinar de forma cuantitativa el efecto que tiene la muestra en investigación sobre un microorganismo específico. El método se fundamenta en la relación entre la concentración de sustancia o extracto que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo, mediante la medida del halo de inhibición producido por la sustancia en la superficie de la placa de agar que contiene la cepa inoculada de forma homogénea y el disco de papel filtro de 6 mm de diámetro que ha sido impregnado con la sustancia en estudio a una concentración conocida (Ramírez & Marin, 2009).

El diámetro del halo de inhibición que dé como resultado dependerá tanto de la sensibilidad del microorganismo como de la concentración de sustancia con la que se haya impregnado el disco, además también interviene la cantidad de agar de la

placa Petri, el pH, el tipo de medio de cultivo, los nutrientes de dicho medio, la capacidad de difusión de la sustancia en el medio, la temperatura, atmosfera, tiempo de incubación, la velocidad de crecimiento del microorganismo, el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento del inóculo (Shiva, 2007).

3.10.2 MÉTODO MODIFICADO DE POZOS DE AGAR

En esta técnica se siembra el inóculo en la superficie de agar que se requiera dependiendo de la cepa elegida, posteriormente se hacen pozos sobre la superficie del agar con la ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, en donde se colocan de 10 a 15 μ L del extracto y se incuba según los requerimientos de la cepa usada. Finalmente transcurrido el tiempo de incubación se miden los halos de inhibición (Rivas et al., 2016).

3.10.3 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

Para esta técnica se mezcla el extracto con el medio de cultivo en agar que se requiera según los requerimientos de la cepa para obtener una concentración final de la sustancia en el medio, a continuación, se siembra por extensión 1 mL de la cepa sobre la superficie del agar y se deja incubar por 24 según las necesidades del microorganismo posteriormente se evalúa el crecimiento o la ausencia de crecimiento (Ramirez & Marin, 2009).

3.10.4 MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

El método de microdulución en caldo es la técnica más útil para determinar MIC (concentración mínima inhibitoria), debido a que aumenta la sensibilidad para pequeñas concentraciones de muestra (Ramirez & Marín, 2009). En esta técnica se usan concentraciones crecientes del extracto o sustancia en estudio que se diluye en el medio de cultivo, estas diluciones se realizan en progresión geométrica en base 2 con el medio adecuado (usualmente medio Mueller Hinton), después se inocula el medio y se deja incubar por 24 horas para permitir el crecimiento del microorganismo, posteriormente se realiza la lectura y se determina la CMI, que es

la concentración mínima de extracto que reduce la viabilidad del microorganismo después de las 24 horas de contacto (Shiva, 2007).

Esta técnica se realiza en microplacas de 96 pocillos de fondo plano estériles en los que se estudian las diferentes concentraciones de extracto o sustancia, después de la incubación se observa la turbidez para evaluar el crecimiento del microorganismo o se añade bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-triazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). El MTT colorea las células vivas en un tono azulado, mientras que si no hay crecimiento celular se ve de color amarillo claro. Este compuesto ha sido usado principalmente para evaluar la actividad de la enzima deshidrogenasa que remueve el hidrogeno del sustrato para transferirlo a la coenzima y posteriormente al MTT el mismo que se reduce a formazan, el cual es una molécula insoluble en agua que se colorea y puede ser medida mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 a 570 nm (Ramirez & Marin, 2009).

3.11 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ACEITES ESENCIALES

Los radicales libres también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas que tienen uno o más electrones muy reactivos desapareados en su último orbital y estos pueden iniciar reacciones en cadena para obtener un electrón de otras moléculas y así poder completar su propio orbital. Estas moléculas son: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-)

Los ROS tiene la capacidad de producir daños oxidativos en las moléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas. Además, provocan daños fisiopatológicos que producen enfermedades como el cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares entre otras (Rivas et al., 2016).

Según Rivas et al (2016), los mecanismos de acción antioxidante son:

- Previniendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Facilitando la reparación del daño causado por los ROS
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de las moléculas antioxidantes
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas al ataque de ROS

3.12 MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Gran cantidad de productos obtenidos a partir de plantas medicinales como los aceites esenciales, los alcaloides y los polifenoles poseen un efecto antioxidante, por lo cual es necesario contar con ensayos que permitan evidenciar esta característica. Estos compuestos antioxidantes inhiben o retardan la oxidación de otras moléculas, evitando que se inicien reacciones en cadena de oxidación de los radicales (O. Montealegre, 2021).

La determinación de la actividad antioxidante de una sustancia biológica se puede hacer mediante dos vías dependiendo del tipo de información que se quiera obtener:

Determinación directa: Se obtiene una señal analítica cuando se emplea el radical como factor de cuantificación. Se adiciona la sustancia antioxidante antes o después de la generación del radical provocando la disminución de la señal. Entre estos se encuentra la técnica ABTS y DPPH.

Determinación indirecta: La presencia de radicales libres en una sustancia provoca la pérdida o aparición de un reactivo, por lo que si hay una sustancia antioxidante

se puede observar un aumento o disminución de la señal analítica. Entre estos está, el método ORAC, FRAP entre otros (Rivas et al., 2016).

3.12.1 DPPH

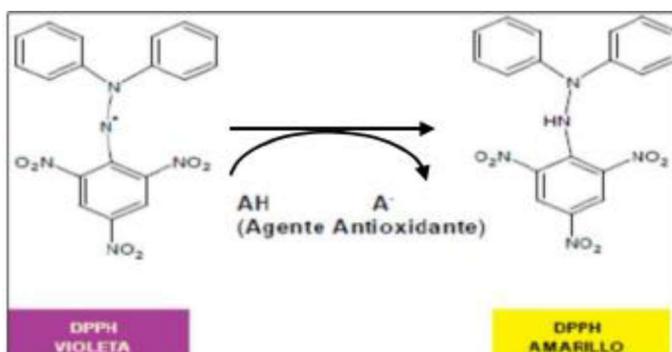
El compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrylhidrazyl (DPPH) es un polvo cristalino de color oscuro que está constituido de moléculas estables de radicales libres. En presencia de moléculas antioxidantes este radical libre reacciona mediante un proceso en que se da la donación de un átomo de hidrógeno por parte del compuesto antioxidante (Guija et al., 2015).

La evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica DPPH consiste en medir la reducción del radical estable DPPH a 520 nm. Se cuantifica la capacidad captadora de radicales libres mediante la absorbancia, cuando la solución de DPPH se encuentra con la sustancia antioxidante que va a donar el electrón da como resultado la forma reducida DPPH-H cuyo color violeta intenso va a ir disminuyendo en presencia del compuesto antioxidante u otro radical; al igual que va a ir disminuyendo la absorbancia (Rivas et al., 2016).

La cinética de esta reacción muestra que es de pseudo primer orden, en la que la absorbancia va a ir disminuyendo en función del tiempo debido a la captación del radical libre por el antioxidante (Guija et al., 2015).

Figura 2.

*Reacción DPPH**



Obtenido de: Gutiérrez & Armando, (2014).

3.12.2 MÉTODO DE CAPTACIÓN DEL RADICAL ABTS

El método para la medición de la actividad antioxidante ABTS es un ensayo que se fundamenta en la medición de la decoloración para antioxidantes tanto lipofílicos como hidrofílicos. En este método se debe formar el radical ABTS⁺ a partir de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilenbenzotiazolina-6-sulfónico)), con persulfato de potasio incubándolos a temperatura ambiente por un mínimo de 16 horas, después de formado el radical, este se ajusta de 0,700 ± 0,200 a 734 nm mediante espectrofotometría. Posteriormente se hace reaccionar este radical con la molécula antioxidante que será la donadora de hidrógeno (Montealegre, 2021); y se mide la absorbancia de la reacción en el primer minuto y al cabo de 6 minutos, a una longitud de onda de 734 nm (Rivas et al., 2016). El cálculo del porcentaje de inhibición se calcula a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición del radical ABTS} = \frac{A_b - A_m}{A_b} \times 100$$

Donde:

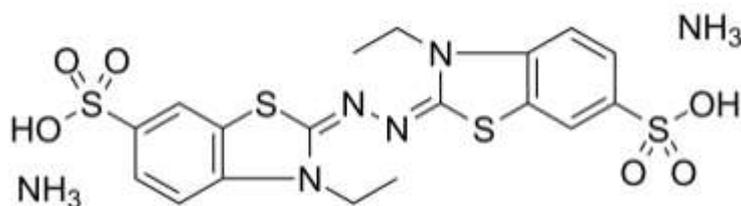
A_b =Absorbancia del blanco

A_m =Absorbancia de la muestra

En la Figura 3 podemos observar la estructura de la sal de amonio, mientras que en la Figura 4 se muestra la reacción antioxidante de ABTS

Figura 3.

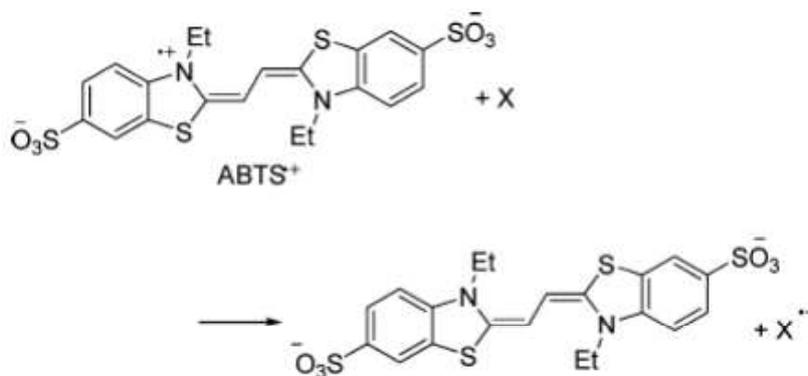
Sal de diamonio ABTS



Tomado de: E. Montealegre, 2021.

Figura 4.

Ejemplo de reacción del método ABTS usando como antioxidante Trolox



Tomado de: E. Montealegre, 2021.

3.12.3 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC)

Esta técnica se basa en medir la capacidad antioxidante en una muestra para proteger a la proteína del daño producido por los radicales libres. Este método ha sido ampliamente utilizado para determinar el contenido de antioxidantes que están presentes en los alimentos. En el método se mide la variación en la fluorescencia de una proteína debido a su desnaturalización causada por el daño oxidativo de los radicales libres (Rivas et al., 2016).

ORAC mide la degradación oxidativa de la molécula usada para producir fluorescencia (beta-ficoeritrina o fluoresceína) después de haber sido mezclada con productos que presenten radicales libres, considerando que los antioxidantes impiden la degeneración oxidativa de la molécula fluorescente. Esta defensa va disminuyendo a medida que transcurre el daño oxidativo. La disminución de la fluorescencia por desnaturalización de la proteína se mide mediante el uso de un fluorómetro.

En esta técnica se observa la reacción antioxidante durante todo el curso de la reacción y no solo en un momento específico y se puede usar tanto en antioxidantes solubles en agua como en antioxidantes solubles en grasa (Montealegre, 2021).

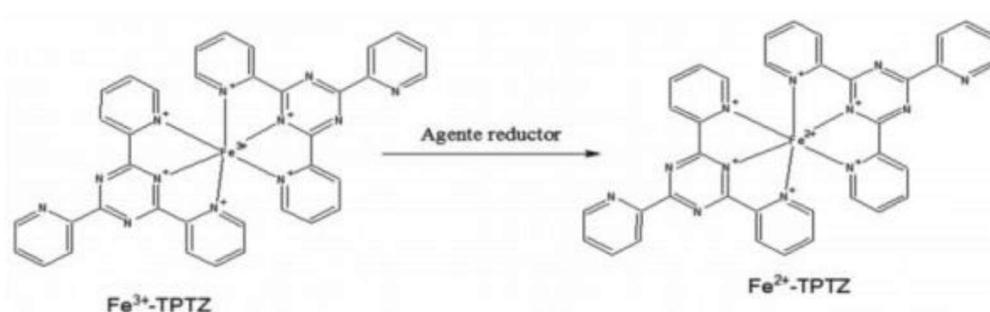
3.12.4 MÉTODO FRAP (FERRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

Esta técnica se fundamenta en la capacidad que tiene la molécula antioxidante de reducir el Fe^{3+} que se encuentra en el reactivo FRAP a Fe^{2+} que es menos antioxidante. El reactivo FRAP es un buffer ácido acético – acetato de sodio con un pH 3,6, TPTZ (2,4,6 TRI (2-piridril)-s-triazina) y Fe Cl_3 .

El método mide mediante espectrofotometría la reducción del complejo que se crea por un cromógeno regularmente de TPTZ y hierro férrico que no poseen color, a un color azul verdoso intenso que contienen antioxidantes en el medio de pH ácido. La coloración azul verdosa intensa es proporcional a la capacidad reductora de la muestra (Montealegre, 2021)

Figura 5.

Reducción de 2,4,6-TrpiridilTriazina Férrica (TPTZ)



Tomado de: Montealegre, (2021).

3.13 ENSAYOS BIOAUTOGRÁFICOS

La bioautografía es una técnica que permite separar los compuestos de una sustancia e identificar las que tienen la capacidad antimicrobiana, basándose en el tamizaje fitoquímico o fraccionamiento bioguiado mediante el uso de la cromatografía que permite localizar los compuestos activos (Ramírez & Marín, 2009).

Rivas et al. (2016), menciona que este método es considerado una variación de la técnica de difusión en agar, en donde se realiza primero una cromatografía en capa fina del extracto natural eligiendo la mezcla apropiada de solventes para la separación de sus componentes.

Las ventajas de esta técnica es que simplifica el procedimiento de identificación y asilamiento de los compuestos con capacidad antimicrobiana de los extractos naturales, además de ser un ensayo sencillo, práctico y altamente reproducible.

3.14 BIOAUTOGRAFÍA POR CONTACTO

Se debe realizar la placa cromatográfica del extracto en estudio sin restos de solvente, y se debe colocar boca abajo sobre la palca Petri de agar Mueller Hinton

(MH) previamente inoculado con el microorganismo de interés, posteriormente se deja que los compuestos separados en la placa cromatográfica se difundan hacia el agar por al menos 2 horas. Después se retira la placa del agar y se deja incubar la placa según los requerimientos del microorganismo. Una vez que haya pasado el tiempo de incubación se observa en halo de inhibición en la superficie del agar donde se encuentren los compuestos con capacidad antimicrobiana (Horváth et al., 2010).

3.14.1 BIOAUTOGRAFÍA DIRECTA

El microorganismo de interés se encuentra inoculado en caldo de cultivo según sus requerimientos, este tiene que estar en crecimiento activo dado que es en donde se va a sumergir la placa cromatográfica sin restos de solvente. Esta bioautografía se incuba en cámara húmeda bajo las condiciones necesarias para el crecimiento de la cepa, aquí se dará el crecimiento de los microorganismos directamente sobre la placa cromatográfica y de igual forma que en la bioautografía por contacto; se observan los lugares donde no hay crecimiento que van a corresponder a los compuestos con actividad antimicrobiana (Rivas et al., 2016).

3.14.2 BIOAUTOGRAFÍA POR INMERSIÓN O POR SUPERPOSICIÓN DE AGAR

Esta técnica es una combinación de la bioautografía directa y la bioautografía por contacto. En esta la placa cromatográfica se encuentra cubierta por una capa de agar MH que ha sido previamente inoculado, este medio de cultivo se debe encontrar a 45 °C para inactivar al microorganismo. La placa cromatográfica cubierta de agar MH debe ser incubada en cámara húmeda según los requerimientos de la cepa, posteriormente se observan las zonas donde no hay crecimiento que serán en donde se encuentren los componentes con capacidad antimicrobiana del extracto en estudio (Rivas et al., 2016).

3.14.3 ENSAYOS BIOAUTOGRÁFICOS ANTIOXIDANTES

La cromatografía en capa fina (CCF) bioautográfica es un ensayo que permite determinar el compuesto antioxidante usando el radical DPPH en una mezcla compleja como son los aceites esenciales. Esta técnica no permite determinar de forma cuantitativa los compuestos con capacidad antioxidante (Noriega et al., 2016).

En este ensayo se realiza primero una separación de los componentes del aceite esencial directamente en una placa CCF usando los disolventes apropiados, una vez terminada la cromatografía se evapora el disolvente y se observa con un indicador fluorescente en una lámpara ultravioleta la separación de los compuestos (Chasipanta & Chicaiza, 2016).

3.15 CITOTOXICIDAD

La medicina tradicional basada en plantas medicinales ha demostrado que las plantas son una fuente invaluable de compuestos bioactivos antitumorales importantes para tratar enfermedades como el cáncer, sin embargo únicamente el 10% especies de plantas superiores han sido investigadas para sus propiedades farmacológicas.

El cultivo celular para estudiar compuestos bioactivos es una alternativa al uso de animales de experimentación. Para registrar o solicitar ensayos clínicos de compuestos bioactivos es necesario realizar ensayos *in vitro* incluyendo ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos permiten detectar mediante los diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos sobre la estructura, propiedades esenciales para la supervivencia, proliferación o funciones celulares. Dentro de los mecanismos que se evalúan se encuentran: la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular, a estos mecanismos de evaluación se los denomina también indicadores de toxicidad. La

citotoxicidad celular es una alteración de las funciones celulares básicas causada por un agente externo que produce un daño en la célula que pueda ser detectado (Castro, 2006).

Los estudios de citotoxicidad son importantes al momento de estudiar los extractos biológicos *in vitro*. Tanto moléculas como compuestos de extractos naturales, pesticidas, drogas entre otros tienen diferentes mecanismos de toxicidad para destruir las membranas celulares. La citotoxicidad y los estudios de células viables se basan en el estudio del funcionamiento de las células. Existen diferentes tipos de ensayos de citotoxicidad en el campo de la toxicología y la farmacología. Los ensayos se clasifican como: ensayos de exclusión de colorantes, ensayos colorimétricos, ensayos fluorométricos y ensayos luminométricos (Larramendy & Soloneski, 2018).

Para determinar la toxicidad de los compuestos químicos sobre células vivas se debe tener en cuenta principalmente el sustrato biológico que se va a analizar y los indicadores de toxicidad. Los indicadores de toxicidad son los que posteriormente se van a medir para determinar la capacidad citotóxica de la sustancia en estudio (Castro, 2006).

3.15.1 ENSAYO DE COLORANTE SAL DE MTT

En este ensayo se utiliza la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) debido a que en células eucariotas la enzima succinato deshidrogenasa que se encuentra en las mitocondrias, tiene la capacidad de reducir el MTT soluble que es de color amarillo a un compuesto azul intenso e insoluble denominado MTT formazán. La medición se realiza a 575 nm (Larramendy & Soloneski, 2018).

3.15.2 ENSAYO DE COLORANTE AZUL DE TRIPANO

Este ensayo nos permite determinar el número de células viables y el número de células muertas en una suspensión celular. El azul de tripano es una molécula cargada negativamente. En un ensayo en que se han usado diferentes concentraciones de extracto o diferentes tiempos de incubación, las células viables muestran un citoplasma de color claro, mientras que las células muertas presentan un citoplasma de color azul. El número de células viables y de células muertas se determina mediante el análisis por microscopía óptica como porcentaje de células de control no tratadas (Larramendy & Soloneski, 2018).

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó en la parroquia Río Blanco, perteneciente a la provincia de Morona Santiago, en las coordenadas 2°28'54.0"S 78°09'03"W. Se procesó los tallos y hojas para su posterior destilación.

4.2 DESTILACIÓN

La extracción de aceite esencial se realizó a través de hidrodestilación, utilizándose un equipo con trampa Clevenger. Para esto se pesó 100 g de material vegetal y se colocó en un balón de destilación de 1000 ml con 500 ml de agua destilada, durante 3 horas; el proceso se realizó por triplicado. El producto obtenido se recolectó y se le añadió 0,60 g de sulfato de sodio anhidro con el fin de secar el residuo de agua, este procedimiento se realizó por triplicado. El aceite se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C (Veloz, 2018).

El rendimiento se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Volumen de aceite esencial}}{\text{Peso de material vegetal}} * 100$$

4.3 ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN QUÍMICA

4.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN COLUMNA APOLAR

El análisis de la composición química se realizó a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para esto se usó un cromatógrafo de gases

Trace 1310 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ 7000 marca Thermo Fisher Scientific con una columna cromatográfica Thermo Scientific TR-5MS, de longitud de 30 m, un espesor de 0,25 mm y un espesor de película de 0,25 μm . El gas de acarreo fue helio de 99,9999 % de pureza a un flujo de 1 mL/min, y un split-ratio de 1:40. La temperatura del inyector fue de 250 °C.

La temperatura inicial fue de 60 °C por 5 minutos, hasta alcanzar los 100 °C a una velocidad de 2°C/min, posteriormente se sube a los 150 °C, a una velocidad de 3 °C/min, se alcanzan los 200 °C a 5°C/min, y finalmente llegamos a los 230 °C manteniéndose a esta temperatura por 5 minutos, siendo el tiempo total de análisis de 60 minutos.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: energía de ionización: 70 eV; corriente de emisión: 10 μAmp ; rango de escaneo: 1 scan/s; rango de masas: 40-350 Da; temperatura de la trampa: 230 °C; temperatura de la línea de transferencia: 200 °C.

4.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN COLUMNA POLAR

El análisis de la composición química se realizó a través de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas, para esto se usó un GC-MS de modelo EVOQ 436 GC - TQ Select EI marca Bruker con una columna cromatográfica Agilent DBWax (polietilenglicol), de longitud de 20 m, un espesor de 0,10 mm y un espesor de película de 0.20 μm , la columna directamente acoplada a un espectrómetro de masas marca Bruker modelo ZB. El gas de acarreo fue helio de 99,9999% de pureza a un flujo de 1 mL/min, y un split-ratio de 1:25. La temperatura del inyector fue de 250 °C.

La temperatura inicial fue de 50 °C por 2 minutos hasta alcanzar los 80 °C a una velocidad de 5°C/min, posteriormente se llega a los 250 °C, a una velocidad de 5

°C/min, manteniéndose a esta temperatura por 1 minuto, siendo el tiempo total de análisis de 49.50 minutos.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: energía de ionización: 70 eV; corriente de emisión: 10 μ Amp; rango de escaneo: 1 scan/s; rango de masas: 35-400 Da; temperatura de la trampa: 220 °C; temperatura de la línea de transferencia: 260 °C.

4.3.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

La identificación de las moléculas se realizó a través de la base de datos de espectros de masas NIST 2001. Además, se calculó el índice de retención aritmética (I), de cada compuesto a través de la comparación de alcanos C₈-C₃₀, empleando la siguiente ecuación propuesta por Babushok et al. (2011), para el cálculo de índice de retención con una rampa de temperaturas

$$I = 100 \left[\frac{t_{R1} - t_{RZ}}{t_{R(Z+1)} - t_{RZ}} + Z \right]$$

Donde, t_{R1} : tiempo de retención de la molécula; t_{RZ} : tiempo de retención del estándar C_n inmediatamente inferior; $t_{R(Z+1)}$: tiempo de retención del estándar C_n inmediatamente superior; z: número de átomos de C del estándar inmediatamente inferior; I: índice de retención.

Finalmente se cotejaron los índices de retención aritmética teóricos, contrastando con literatura científica en la base de datos Adams (1989), para los compuestos analizados en la columna TMR-5MS y en base al estudio de Babushok et al. (2011), para aquellos separados en la columna DBWax.

4.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se analizó la actividad antioxidante y capacidad captadora de radicales a través de dos ensayos: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2- azinobis 3 etilbensotiazolina-6-acidosulfónico (ABTS), adaptado a microplacas. Se siguió el protocolo propuesto

por Noriega et al. (2015), en el caso de DPPH, y el descrito por Re et al. (1999), para determinar la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS. Se realizaron algunas modificaciones para los dos métodos que se describen a continuación.

4.4.1 MÉTODO DPPH

4.4.1.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La solución del radical DPPH se preparó pesando 4 mg de DPPH y aforando a 100 mL con etanol absoluto (99 %). El reactivo se conservó en refrigeración en un recipiente ámbar, previo al ensayo. En cuanto a los aceites se preparó 1 mL de solución de aceite esencial de *C. brownei* y 1 ml de aceite *T. vulgaris* como control natural. Para esto se diluyó 100 μ L de aceite esencial en 900 μ L de etanol absoluto (99,9 %) (solución madre).

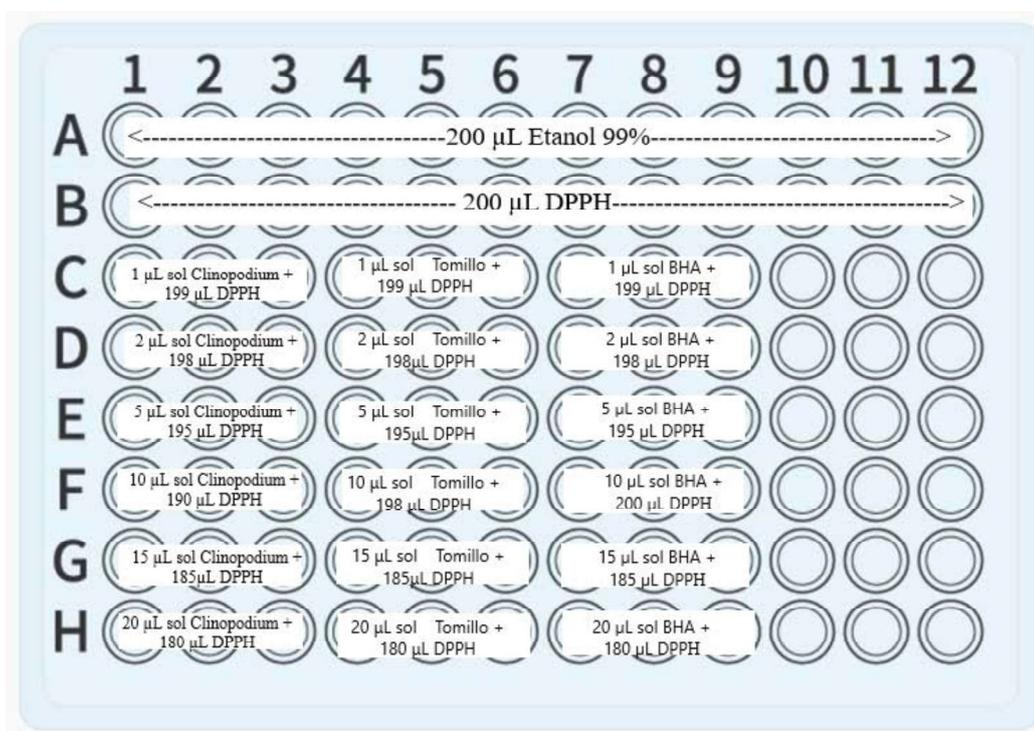
Como control positivo químico se utilizó BHA (butil hidroxianisol); se pesó 10 mg de BHA y se diluyó en un balón de 10 mL con etanol absoluto (solución madre).

4.4.1.2 MODIFICACIÓN PARA MICROPLACAS

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos, el ensayo se realizó siguiendo el siguiente esquema: en toda la fila A, se colocó 200 μ L de etanol al 99% (blanco). Toda la fila B se inoculó con la solución madre de DPPH, para su posterior dilución en las filas siguientes. En la fila C se agregó 1 μ L de aceite esencial de *C. brownei* y 199 μ L de DPPH en los pocillos 1,2 y 3. En la misma fila, pero en los pocillos 4,5 y 6 se agregó 1 μ L de aceite esencial de tomillo y 199 μ L de DPPH. En los pocillos 7,8 y 9 de la fila C se agregó 1 μ L de BHA y 199 μ L de DPPH. En la fila D, se siguió el mismo esquema de los pocillos, pero las cantidades de aceite y BHA fueron de 2 μ L en 198 μ L de DPPH. Para la fila E se utilizó un volumen de 5 μ L de las soluciones en 195 μ L de DPPH. En la fila F, se disolvió 10 μ L en 190 μ L de DPPH. En la fila G, se colocó 15 μ L en 185 μ L. En la fila H se agregaron 20 μ L de aceites y BHA respectivamente en 180 μ L de DPPH, como se muestra en la Figura 6. Finalmente, la placa fue llevada a agitación por 30 minutos, previo a su lectura.

Figura 6.

Diagrama de ensayo DPPH en microplacas



Elaborado por: Las autoras, 2022.

4.4.1.3 DETERMINACIÓN CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La microplaca fue leída en un espectrofotómetro UV marca Biotek modelo Epoch™, a una longitud de onda de 517 nm y la actividad antioxidante se determinó a través del porcentaje de inhibición de DPPH, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

Con los valores de la concentración del aceite esencial y el porcentaje de inhibición se construyó una curva de calibración y se procedió a calcular el porcentaje de inhibición al 50 % del DPPH (CI₅₀).

4.4.2 MÉTODO ABTS

El radical ABTS⁺ se preparó con 24 h de anticipación, para esto se pesó 27,51 mg de ABTS y se diluyó en 25 mL de agua ultrapura. Aparte se disolvió 188,20 mg de K₂S₂O₈ en 10 mL de agua ultrapura. Posteriormente se tomó 0,25 mL de la solución de K₂S₂O₈ y se añadió a la disolución del radical ABTS, se conservó en refrigeración en un frasco ámbar y se midió la absorbancia hasta ajustar a un rango de 0,700 +/-0,02 añadiendo etanol absoluto, previo a la ejecución del ensayo.

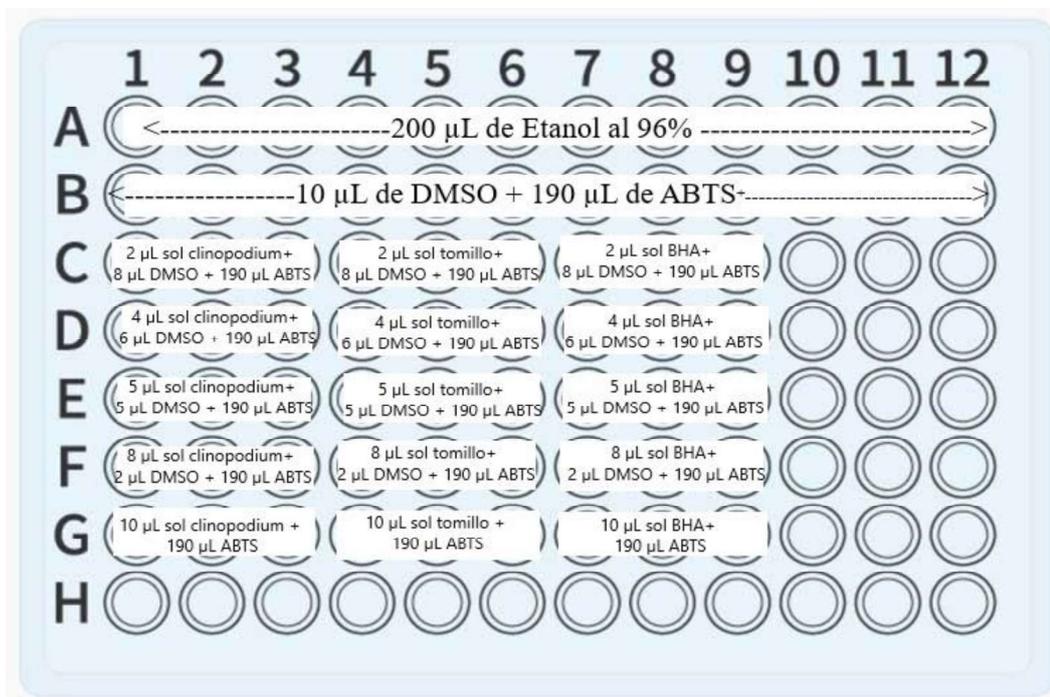
En cuanto a las soluciones de aceites se preparó de la siguiente manera: se tomó 100 µL de aceite de *C. brownei* y se disolvió en 900 µL de DMSO, de igual manera se preparó la solución de aceite de tomillo que se usó como control natural. Para la solución madre de BHA (control químico) se pesó 100 mg y se diluyó en 10 mL de alcohol al 96 %.

4.4.2.1 MODIFICACIÓN PARA MICROPLACAS

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos, las disoluciones se realizaron de la siguiente manera: en toda la fila A se colocó 200 µL de etanol al 96% (blanco). En toda la fila B se agregó 10 µL de DMSO + 190 µL de ABTS⁺. Las soluciones madre de aceite de *C. brownei* se colocaron en las columnas 1,2,3; seguida por la solución de *T. vulgaris* en las columnas 4,5,6; mientras que las soluciones de BHA se ubicó en las columnas 7,8 y 9. Las disoluciones de los aceites y el control se prepararon en la fila C añadiendo 2 µL de soluciones madre + 8 µL de DMSO + 190 µL de ABTS⁺. En la fila D se añadió 4 µL de soluciones madre + 6 µL de DMSO + 190 µL de ABTS⁺; En la fila E se añadió 5 µL de soluciones madre + 5 µL de DMSO + 190 µL de ABTS⁺. En la fila F se añadió 8 µL de soluciones madre + 2 µL de DMSO + 190 µL de ABTS⁺. En la fila añadió 10 µL de soluciones madre + 190 µL de ABTS⁺. Tal como se muestra en la Figura 7.

Figura 7.

Diagrama de ensayo ABTS en microplacas



Elaborado por: Las autoras, 2022.

4.4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La placa fue leída en un espectrofotómetro UV marca Biotek modelo Epoch™, a una longitud de onda de 734 nm y la actividad antioxidante se determinó a través del porcentaje de inhibición de ABTS+, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

Posteriormente se construyó una curva de calibración de la concentración del aceite esencial en función del % de inhibición, se procede a calcular el % de inhibición al 50%, CI_{50} ABTS.

4.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. Para el análisis descriptivo de los datos se empleó en programa estadístico Infostat y se realizó un gráfico de barras para contrastar la actividad del aceite de *C. brownei* frente al control natural (*T. vulgaris*)

4.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para evaluar la actividad antimicrobiana y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI₅₀) se realizó la técnica de microdilución en caldo. Se utilizaron cepas certificadas ATCC; las bacterias Gram positivas evaluadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria grayi* ATCC 19120 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990. Las cepas Gram negativas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Para levaduras se utilizó la cepa *Candida albicans* ATCC 10231

4.5.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO Y FÚNGICO

Se realizó la incubación “overnight” para las cepas bacterianas y fúngicas. En tubos de ensayo con 13 mL medio de cultivo Mueller Hinton Broth (MHB) estéril, se inocularon las cepas bacterianas previamente reactivadas con ayuda de un asa estéril y se dejó incubar a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Para las levaduras se utilizó medio de cultivo Sabouraud Dextrose Broth (SDB) y se dejó incubar a 25 ± 2 °C por 24 horas.

Para la estandarización de inóculo se utilizó el medio de cultivo MHB en el que se disolvió el inóculo obtenido del overnight, se midió a una longitud de onda de 625 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0,08 a 0,12 equivalente a 10^8 UFC/mL para bacterias, mientras que para la levadura se disolvió el inóculo en medio SDB y se midió a una longitud de onda de 530 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0,15

equivalente a 10^6 UFC/mL (Veloz, 2018). Se utilizó un espectrofotómetro UV marca JASSCO, modelo V-730.

4.5.2 SOLUCIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se prepararon soluciones del aceite esencial de *Clinopodium brownei* y de *Thymus vulgaris* al 5 %, para lo cual se disolvieron 10 μ L del aceite esencial en 190 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Para el control químico antibacteriano se utilizó ampicilina 5 mg/ mL, mientras que para el control químico antifúngico se utilizó fluconazol a 1 %.

4.5.3 PREPARACIÓN DEL COLORANTE CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIO TTC

Se preparó el colorante TTC al 2,5 %, para lo cual se pesó 25 mg de cloruro de trifentiltetrazolio (TTC) y se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril. El colorante se preparó 24 horas antes de su uso y se conservó en un envase ámbar en refrigeración.

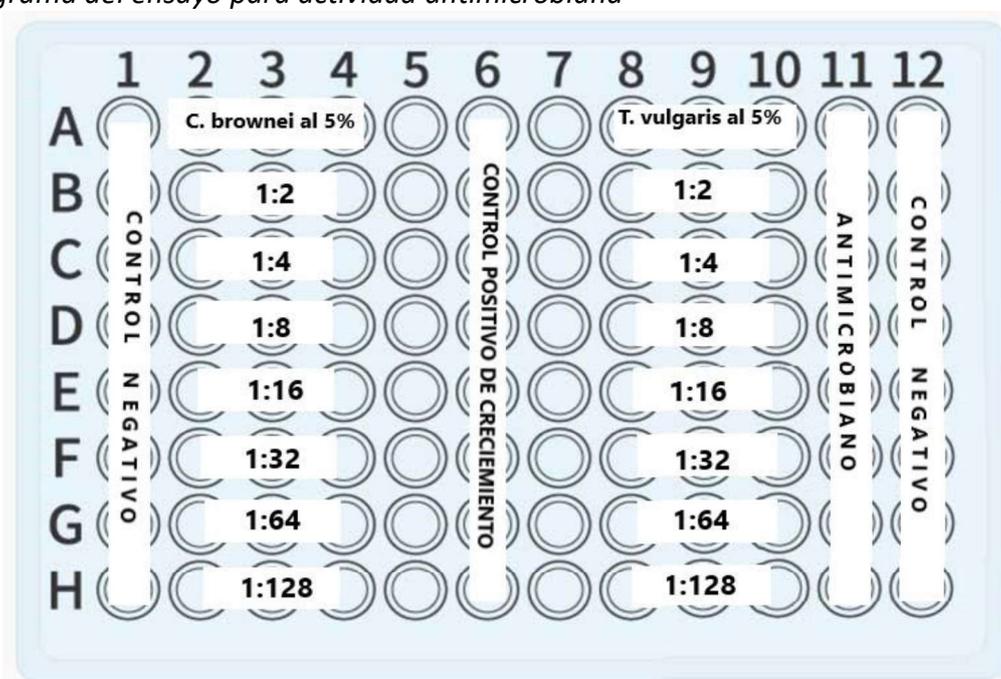
4.5.4 INOCULACIÓN EN MICROPLACAS

Se emplearon microplacas de 96 pocillos estériles, en la primera columna se colocaron 145 μ L del medio MHB más 15 μ L de DMSO, como control negativo. En la fila A en los pocillos 2, 3 y 4 se colocaron 185 μ L de caldo de cultivo más 15 μ L de la solución de aceite esencial de *Clinopodium brownei*, en toda la columna 6 se colocaron 100 μ L de caldo de cultivo más 60 μ L del inóculo estandarizado como control positivo de crecimiento. En la fila A pocillos 8, 9 y 10 se colocaron 185 μ L de caldo de cultivo más 15 μ L de la solución de aceite esencial de *Thymus vulgaris*. En la columna 11 se colocaron 15 μ L de la solución de antimicrobiano más 100 μ L del caldo de cultivo y 60 μ L de inóculo. En la columna 12 se colocaron 160 μ L de caldo de cultivo sin inóculo. Posteriormente con ayuda de una micropipeta multicanal se añadió 100 μ L del caldo de cultivo desde la fila B hasta la H en las columnas de los

aceites esenciales, (caldo Mueller Hinton para bacterias o Dextrosa Sabouraud para levaduras). Se tomó 100 μL de la fila A y se colocó en la fila B mezclando el medio de cultivo con los aceites esenciales, este paso se realiza consecutivamente hasta llegar a la fila H, como se muestra en la Figura 8, posteriormente se añadió 60 μL del inóculo y 40 μL de colorante TTC en toda la placa obteniendo un volumen final de 200 μL . Finalmente se llevaron las placas a incubación por 24 horas a una temperatura de 35 ± 2 °C con agitación a 40 rpm para bacterias y 48 horas a 25 ± 2 °C sin agitación para levaduras (Veloz, 2018).

Figura 8.

Diagrama del ensayo para actividad antimicrobiana



Elaborado por: Las autoras, 2022.

4.5.5 DETERMINACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN

El crecimiento celular se determinó en un lector de microplacas UV marca Biotek modelo Epoch™ a 615 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

El CI_{50} se calculó a partir de una regresión lineal entre la concentración y los porcentajes de inhibición.

4.5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se realizaron tres repeticiones para cada concentración de aceite y para cada cepa. Para el análisis descriptivo de los datos se empleó en programa estadístico Infostat y se realizó un gráfico de barras para comparar la susceptibilidad de cada cepa frente al aceite *C. brownei* y al control natural (*T. vulgaris*)

4.6 BIOAUTOGRAFÍA ANTIOXIDANTE

Para determinar los compuestos responsables de la actividad antioxidante se realizó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF). Como fase estacionaria se empleó placas HPTLC sílica gel 60 F254 de 10x10 cm, en cuanto a la fase móvil se utilizó una solución de 93 mL de tolueno, 7 mL de acetato de etilo y 20 mL de éter de petróleo (Noriega, et al., 2018).

4.6.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de aceite esencial se prepararon con 30 μL de aceite esencial de *C. brownei* y 970 μL de metanol. Para el control positivo se preparó 30 μL de aceite esencial de *T. vulgaris* y 970 μL de metanol, posteriormente se sembraron en la placa 4 muestras de la solución de *C. brownei* en concentraciones de 20 μL , 15 μL , 10 μL y 5 μL y una última muestra de 5 μL de la solución de *T. vulgaris*, con la ayuda de un equipo aplicador para CCF marca CAMAG, modelo LINOMAT 5 (Noriega, et al., 2018).

Para el proceso de saturación de la cámara cromatográfica se añadieron 25 mL de la fase móvil y se tapó inmediatamente para evitar que se escaparan los vapores y para alcanzar la saturación necesaria, posteriormente se colocó la placa de sílice en la cámara cromatográfica y se dejó correr la fase móvil en la fase estacionaria hasta

un centímetro antes de que llegara al borde, esto ocurrió en aproximadamente 20 minutos. Se secó la placa con aire frío por 2 minutos y finalmente se verificó la separación de los compuestos utilizando un revelador UV a 254/366 nm.

Se anotaron las distancias recorridas para cada compuesto desde el lugar de siembra de la muestra hasta la separación de los compuestos para posteriormente calcular el Factor de Retención (RF), mediante la siguiente fórmula:

$$RF = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra desde el punto de siembra (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (cm)}}$$

Para el proceso de revelado se atomizó la placa con una solución al 1 % de radical DPPH, y se dejó reposar por aproximadamente 30 minutos para observar las zonas que se colorearon de un tono amarillento, siendo estas las zonas donde se encuentran los compuestos antioxidantes (Chasipanta & Chicaiza, 2016).

4.7 BIOAUTOGRAFÍA ANTIMICROBIANA

Para determinar los compuestos con capacidad antimicrobiana primero se realizaron dos placas con la técnica de cromatográfica en capa fina como se indicó en el punto 2.6.1. para determinar los compuestos antioxidantes.

4.7.1 REACTIVACIÓN DE CEPAS

Se reactivaron las cepas con los mejores resultados obtenidos en el método de microdulción; una cepa Gram positiva y una cepa Gram negativa, para esto se sembró en agar nutriente cada cepa por estriado simple y se dejó incubar por 24 horas a 37 °C.

4.7.2 ESTANDARIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Posterior a la reactivación se tomó una muestra de cada cepa con un asa estéril, se pasó a un tubo de ensayo con caldo triptona-soya (TSB) y se dejó incubar por 24 horas a 37 °C.

Se estandarizó el inóculo con caldo de cultivo TSB, para esto se midió a 625 nm en un espectrofotómetro UV marca JASSCO, modelo V-730 hasta obtener una absorbancia entre 0,8 a 1,2 para alcanzar una concentración celular de 1×10^8 UFC.

4.7.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se preparó 100 mL de agar nutriente para la cepa Gram negativa y 100 mL de triptona soya agar para la cepa Gram positiva, se esterilizaron los medios de cultivo a 121 °C durante 15 minutos. En el agar estéril y todavía líquido, se añadió 500 μ L del inóculo estandarizado más 750 μ L del colorante TTC al 2,5 % y se agitó hasta homogeneizar la mezcla.

4.7.4 INOCULACIÓN EN LA PLACA CCF

Se esterilizaron las placas CCF con luz UV durante 15 minutos, posteriormente se colocaron las placas en cajas Petri estériles de 150 mm de diámetro. Finalmente, se agregaron 50 mL de la mezcla del inóculo estandarizado y el colorante sobre la placa CCF, se dejó gelificar y se incubó a 37 °C por 48 horas (Noriega, et al., 2018). Se realizó el mismo procedimiento en la cepa Gram positiva y en la Gram negativa.

4.8 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Una vez visualizadas las zonas de inhibición, se realizaron nuevas placas CCF, para esto se inyectaron 5 muestras de 25 μ L con la ayuda de un equipo aplicador para CCF marca CAMAG, modelo LINOMAT 5 (Noriega, et al., 2018). Se realizó la separación de las moléculas a través de cromatografía en placa fina, según las condiciones mencionadas en el punto 2.6.1. Se observó la placa cromatográfica en el revelador UV y se marcó con un lápiz la molécula de interés tanto para actividad antioxidante como para actividad antimicrobiana. Posteriormente los componentes activos fueron recolectados de la placa cromatográfica en las fracciones de Rf 0,6, Rf 0,7 y Rf 0,9; disolviendo la sílica gel en diclorometano, Finalmente se inyectó de forma directa en un sistema CG/EM en las mismas condiciones descritas en la sección 2.3.1. para la separación de los compuestos, y para la identificación de estos se siguió la técnica mencionada en la sección 2.3.3.

4.9 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

El análisis de citotoxicidad *in vitro* del aceite esencial de *C. brownei* se realizó en células mononucleares de sangre periférica extraídas. Para esto se siguió el protocolo propuesto por (Sudeep & Kiranmayee, 2017).

4.9.1 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se obtuvo una muestra de 7 mL sangre, que se diluyó en proporción 1:1, en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) enriquecido con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) 1 % de antibiótico (ampicilina – estreptomicina).

Posteriormente se formó el gradiente de densidad, añadiendo 3 mL de Histopaque en 6 mL de muestra y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se tomó el pellet de células mononucleares en tubo Eppendor y se realizaron dos lavados consecutivos con 1 mL de RPMI hasta obtener un botón celular. A 10 μ L de suspensión celular se añadió 20 μ L de RPMI suplementado más 20 μ L de azul de tripano, con el fin de verificar la viabilidad celular.

Finalmente se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer, para esto se colocó 10 μ L de la suspensión celular y se procedió al conteo de las células coloreadas con azul de tripano bajo el microscopio óptico; en 8 cuadrantes escogidos de forma aleatoria el promedio obtenido se multiplicó por 5; el resultado se multiplicó por 16 y finalmente se multiplicó por 10 000, con el fin de estandarizar una concentración de 200 000 células por pozo.

4.9.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE ACEITE DE *C. BROWNEI*

Se realizó la solución madre a una concentración de 1000 ppm, para esto se tomó 11 μ L de aceite esencial y se disolvió en 10 mL de DMSO. Posteriormente se realizaron tres soluciones a 500, 250 y 100 ppm. Las soluciones se almacenaron en frascos ámbar.

4.9.3 INOCULACIÓN EN MICROPLACA

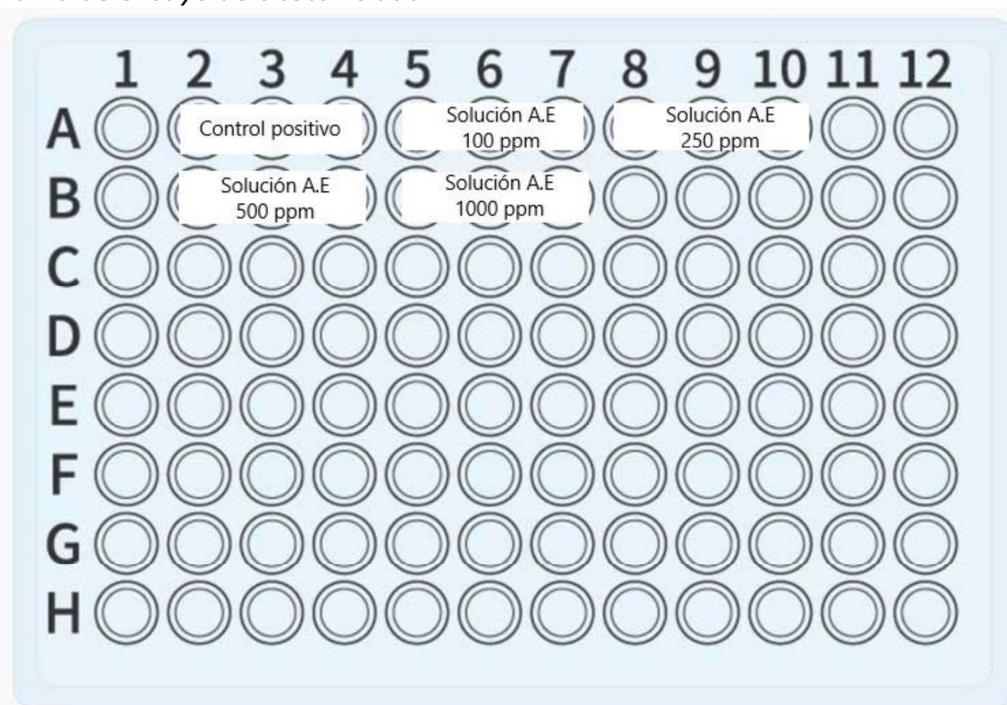
En cada pocillo de la fila A y B se colocaron 100 μ L de medio RPMI suplementado más 100 μ L de la solución celular, evitando los pocillos de los extremos para prevenir la evaporación del medio. La placa se llevó a incubación a 37°C, en medio de 5 % de CO₂ por 24 horas. Posteriormente se agregaron 50 μ L de las soluciones de aceite esencial como se indica en la Figura 9. Se dejó reposar la microplaca por

48 horas y se centrifugó a 1500 rpm por 15 minutos y se retiró el sobrenadante. Se colocó 50 μ L de una solución de MMT (5 mg/mL) y se agregó nuevamente 100 μ L de RPMI suplementado y se incubó por 4 h a 37°C.

Se volvió a centrifugar la placa a 1500 rpm por 15 minutos y se retiró el sobrenadante, posteriormente se agregó 100 μ L de DMSO puro, para disolver las sales de fomazan, lo que provocó una reacción enzimática con el MMT, dando una coloración morada para las células vivas y sin coloración en células muertas. Se leyó en un lector de microplacas UV marca Biotek modelo Epoch™, a una longitud de onda de 575 nm.

Figura 9.

Diagrama de ensayo de citotoxicidad



Elaborado por: Las autoras, 2022.

4.9.4 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE VIABILIDAD Y DE LA CI_{50}

El porcentaje de viabilidad de las células se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

Se calculó la concentración que se requiere para inhibir la viabilidad en el 50 % de la población celular (CI_{50}), mediante regresión de la curva del porcentaje de inhibición.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL POR HIDRODESTILACIÓN

El rendimiento de la destilación de *C. brownei* fue del 0,25 % p/v, es decir a partir de 100 g de material vegetal se obtuvo 0,25 mL de aceite esencial, este valor resulta bajo si lo comparamos con el obtenido por Matailo et al. (2019), cuyo estudio reporta un rendimiento promedio de 0,44% para esta especie.

En la investigación realizada por Tapia et al. (2019), reportaron un rendimiento de 0,58 % p/v en la extracción de aceite esencial de la especie *Clinopodium pulchellum* (Kunth), mediante destilación por arrastre de vapor, mientras que en la investigación de Jaramillo & Stashenko (2010), en la que realizaron la extracción del aceite esencial de *Clinopodium brownei* por hidrodestilación (HD) y por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) obtuvieron un rendimiento de 0,35 y 0,27 % respectivamente. Sin embargo, para esta misma especie se indica un rendimiento de 0,12 % del aceite esencial estudiado en Venezuela (Rojas & Usubillaga, 2000). Como ya se ha indicado antes, la variabilidad del rendimiento de los aceites es frecuente y estaría relacionada a diversas variables como las condiciones y métodos de extracción, también se puede dar por factores como: zonas de cultivo de la planta, tiempo de cosecha, condiciones edafológicas, etc.

5.2 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

5.2.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN

QUÍMICA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN COLUMNA APOLAR

En la identificación de los compuestos del aceite esencial de *Clinopodium brownei* mediante columna apolar se encontraron 24 compuestos de los cuales se identificaron 18, los compuestos identificados representan el 98,52 % del total de los compuestos; entre los más importantes podemos mencionar a: E-cinamato de etilo 21,4 %, pulegona 20,76 %, E-cinamato de metilo 16,68 %, E-cariofileno 8,17 %, beta-selineno 7,92 % y mentona 7,51% (Anexo 1). La composición del aceite esencial se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Composición química columna apolar TR5MS del aceite esencial de las hojas y tallos de Clinopodium brownei.

COMPUESTO	% RDA	IR TEÓRICO	IR EXPERIMENTAL	FÓRMULA
3-octanona	0,24	979	992	C8H16O
Mentona	7,51	1148	1164	C10H18O
isopulegol iso	1,18	1159	1172	C10H18O
isopulegol neoiso	0,49	1167	1176	C10H18O
NI	0,46		1183	
NI	0,81		1185	
Pulegona	20,76	1233	1252	C10H16O

NI	1,37		1289	
alfa- copaene	2,87	1374	1376	C15H24
NI	0,56		1390	
E cinamato de metilo	16,68	1376	1401	C10H10O2
E cariofileno	8,17	1417	1421	C15H24
B-humuleno	2,17	1436	1458	C15H24
E cinnamato de etilo	21,4	1443	1465	C11H12O2
gamma gurjuneno	0,81	1475	1487	C15H24
beta selineno	7,92	1489	1493	C15H24
delta selineno	0,31	1492	1495	C15H24
alfa selineno	2,12	1498	1499	C15H24
NI	0,76		1523	
Spatulenol	0,33	1577	1585	C15H24O
óxido de cariofileno	2,33	1582	1589	C15H24O
NI	0,36		1619	
bencil benzoato	0,17	1759	1772	C14H12O2
No Identificado	1,48			

Nota. Clasificación de los compuestos: monoterpenos 22,67 %; sesquiterpenos 27,11 %; fenilpropanoides 38,08 %

5.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN COLUMNA POLAR

En el aceite esencial del aceite de *Clinopodium brownei* se encontraron 22 compuestos de los cuales se identificaron 17, los compuestos identificados representan el 98,35 % del total de los compuestos, entre los más importantes tenemos: pulegona 29,90 %, trans-cinamato de etilo 18,75 %, trans cinamato de metilo 13,82 %, E-cariofileno 10,0 %, mentona 8,04 %, beta-selineno 6,46 %, alfa-copaeno 3,07 % (Anexo 2). La información detallada se presenta en la tabla 2.

Tabla 2

Composición química columna DB5-Wax del aceite esencial de las hojas y tallos de Clinopodium brownei.

COMPUESTO	% RDA	IR TEÓRICO	IR EXPERIMENTAL	FÓRMULA
3-octanona	0,22	1254,8	1263,2	C ₈ H ₁₆ O
4hidroxy,4metil, 2-pentanona	1,42	sin datos	1371,2	C ₆ H ₁₂ O ₂
mentona	8,04	1465,3	1470,6	C₁₀H₁₈O
alfa-copaeno	3,07	1491	1496,4	C₁₅H₂₄
No identificado	0,26	sin datos	1577,9	

No identificado	0,52	sin datos	1588,8	
beta-elemeno	0,64	1590,9	1593,8	C15H24
E-cariofilleno	10,0	1598,5	1601,5	C15H24
pulegona	29,9	1654,5	1652,6	C10H16O
humuleno	1,96	1666,7	1672,4	C15H24
gamma-gurjuneno	0,49	1668,2	1691,5	C15H24
alfa-terpinil acetato	0,31	1694,8	1697,1	C12H20O2
beta-selineno	6,46	1716,9	1722,4	C15H24
alfa-selineno	1,46	1725,3	1726,2	C15H24
No identificado	0,37	sin datos	1735,2	C15H24
No identificado	0,26	sin datos	1758,2	C15H24
alfa-panasinsen	0,34	sin datos	1764,4	C15H24
Óxido de cariofileno	0,53	1986,2	1985,5	C15H24O
E-cinimaldehído	0,93	2033,2	2031,4	C9H8O
trans-cinamato de metilo	13,82	2074,6	2056,4	C10H10O2
trans-cinamato de etilo	18,75	sin datos	2110	C11H12O2
No identificado	0,24	sin datos	sin datos	

Nota: Clasificación de los compuestos: monoterpenos 39,89 %; sesquiterpenos 24,95 %; fenilpropanoides 32,57 %.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR LOS MÉTODOS DPPH Y ABTS

Se determinó la capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *C. brownei* en comparación con el control natural *T. vulgaris*. Además, se compararon los resultados obtenidos en el método DPPH y ABTS (Tabla 3) (Anexo 3).

Tabla 3

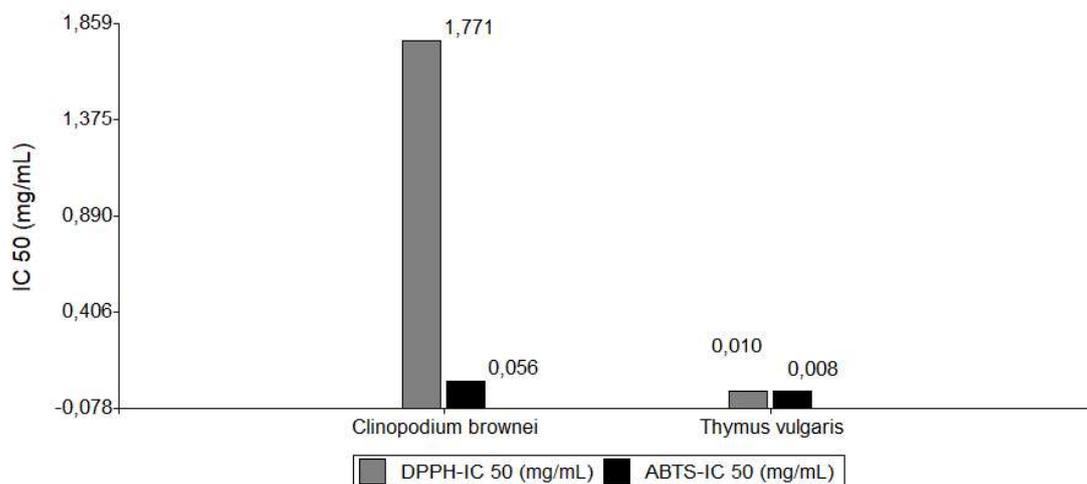
Actividad antioxidante del aceite esencial de Clinopodium brownei y el control natural Thymus vulgaris

Aceite esencial	DPPH-Cl ₅₀ (mg/mL)	ABTS-Cl ₅₀ (mg/mL)
<i>Clinopodium brownei</i>	1,7709 ± 0,26	0,0558 ± 0,002
<i>Thymus vulgaris</i>	0,0097 ± 0,005	0,008 ± 0,002

La actividad antioxidante del aceite esencial de *C. brownei* fue baja frente al control natural (*T. vulgaris*), siendo 1,7709 ± 0,26 mg/mL (ensayo DPPH) y 0,0558 ± 0,0020 mg/mL (ensayo ABTS) las concentraciones necesarias para neutralizar el 50 % de los radicales libres. Como se observa en la Figura 10, la capacidad antioxidante del aceite de tomillo es superior a concentraciones más bajas, a diferencia del warmi poleo que requiere una concentración muy alta para igualar la actividad del control natural.

Figura 10.

Actividad antioxidante del aceite esencial de Clinopodium brownei frente al control natural de Thymus vulgaris.



Elaborado por: Las autoras, 2022.

Sin embargo, la cuantificación de la capacidad antioxidante a través de un modelo lipídico acoplado a CG, en el estudio realizado por Jaramillo & Stashenko (2010), del aceite de *Satureja brownei*, indica que la concentración requerida para neutralizar el 53 % de radicales libres oscila entre los 2,5-10 mg/mL, lo cual muestra una actividad antioxidante similar a la encontrada en esta investigación.

La acción protectora del deterioro oxidativo, presente en el aceite de esta especie estaría relacionado a la presencia de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos; la baja actividad comparada con la del tomillo podría deberse a los diferentes mecanismos antioxidantes que poseen las moléculas de origen fenólico como el eugenol y el timol, compuestos abundantes en el aceite esencial de *T. vulgaris* (Jaramillo & Stashenko, 2010).

5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

La técnica de microdilución está basada en la medición por espectrofotometría de la coloración rojiza producida por el colorante TTC y la presencia de microorganismos vivos (anexo 4). Se realizó la interpretación de los resultados según la categorización propuesta por Baser & Buchbauer (2016), en donde clasifica la eficacia del aceite esencial en función de la concentración mínima inhibitoria obtenida de forma experimental: muy fuerte (MF) CMI <500 µg/mL, fuerte (F) CMI ≥ 500, moderado (M) 500 > CMI < 5000, débil (D) 5000 > CMI < 20000 y ausente (A) CMI > 20000. Ver tabla 4.

Tabla 4

Concentración mínima inhibitoria y categorización del aceite esencial.

Microorganismos	<i>C. Brownei</i> CMI (mg/mL)		<i>T. vulgaris</i> CMI (mg/mL)	
Bacterias Gram positivas				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6328	7,921	D	3,023	M
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	5,540	D	2,891	M
<i>Listeria grayi</i> ATCC 1912	3,844	M	2,281	M
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	13,56 6	D	7,984	D
Bacterias Gram negativas				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,216	D	2,134	M
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	4,621	M	2,774	M
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	7,185	D	1,298	M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	8,381	D	3,096	M

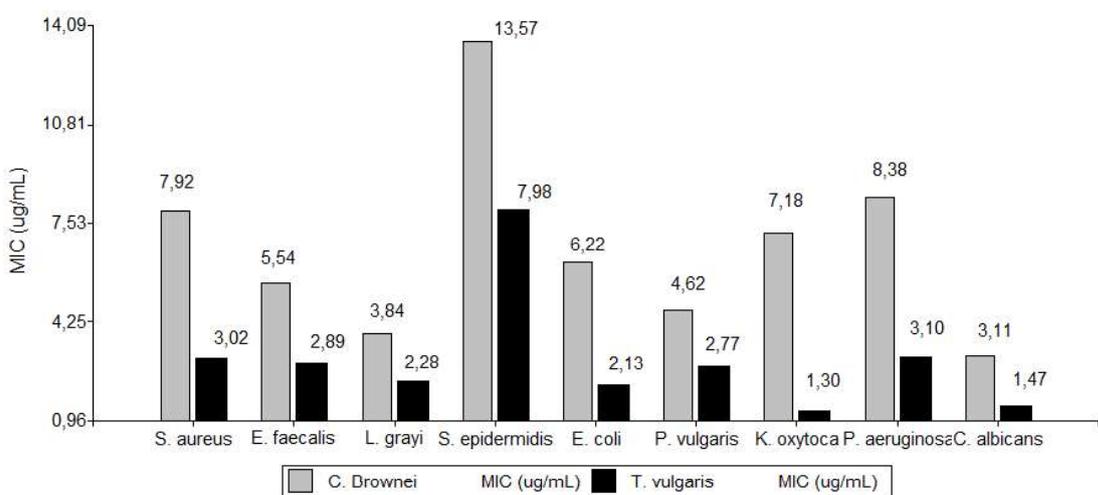
Levadura

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,112	M	1,468	M
------------------------------------	-------	---	-------	---

En la Figura 11 se muestra la diferencia entre las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *C. brownei* comprado con el aceite esencial de *T. vulgaris* para las diferentes cepas estudiadas. En general se puede observar que las CMIs para el aceite de *C. brownei* son más altas que las del aceite esencial del control natural. También se puede demostrar que la cepa Gram positiva *Listeria grayi* es la más sensible frente al aceite esencial de *C. brownei* al igual que la levadura *Cándida albicans*.

Figura 11.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), comparación entre el aceite esencial de C. brownei y T. vulgaris



Elaborado por: Las autoras, (2022).

En comparación con el aceite esencial de *T. vulgaris* se puede observar que la actividad antimicrobiana del aceite de *C. brownei* es menor para la mayoría de bacterias Gram positivas, destacando una diferencia en *Listeria grayi* en donde se obtuvo una CMI de 3,844 mg/mL demostrando una actividad moderada. En las bacterias Gram negativas se demuestra que el aceite de *C. brownei* tiene una

moderada actividad antimicrobiana frente a *Proteus vulgaris* con una CMI de 4.621 mg/mL, de igual forma para la levadura *Candida albicans* con una CMI de 3,112 mg/mL.

La investigación realizada por Aguilar et al. (2015), en donde probaron la actividad antimicrobiana de *C.brownei* frente a *Staphylococcus aureus* obtuvieron una CMI de 6,250 mg/mL, mientras que en la presente investigación se obtuvo una CMI de 7,921 mg/mL demostrando en los dos casos una actividad débil del aceite, otra bacteria Gram positiva evaluada fue *Enterococcus faecalis* en donde obtuvieron una CMI de 3.125 mg/mL con una actividad moderada, mientras que en la presente investigación se obtuvo una CMI de 5,540 mg/mL para la misma cepa demostrando una actividad del aceite débil.

En cuanto a las bacterias Gram negativas la investigación de Aguilar et al. (2015), en *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* obtuvieron CMIs de 6,250, 3,215 y 6,250 mg/mL respectivamente demostrando una actividad moderada para *Pseudomona aeruginosa*, mientras que en la presente investigación se obtuvieron CMIs de 6,216 y 8,381 mg/mL; se usó *Klebsiella oxytoca* con una CMI de 7,185 mg/mL con una actividad débil para las tres cepas Gram negativas.

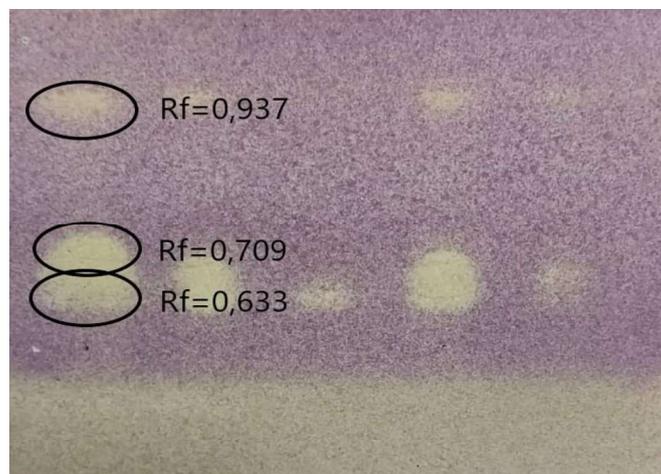
Existen pocas publicaciones sobre la actividad antimicrobiana en *C. brownei*, y de igual manera se demuestra que su actividad antimicrobiana es menor a la que presentó *T. vulgaris*. En otra especie del mismo género como es *C. nubigenum* se demostró de igual forma que presenta una baja inhibición frente a microorganismos causantes de enfermedades respiratorias en cepas como *Staphylococcus aureus* (Fonseca, 2016).

5.6 BIOAUTOGRAFÍA ANTIOXIDANTE DPPH

La bioautografía antioxidante revelo la capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *C. brownei* para los compuestos correspondiente a las fracciones con $R_f = 0,633$, $R_f = 0,709$ y $R_f = 0,937$. En la Figura 12 podemos observar las distancias recorridas por las moléculas, en contraste entre las zonas no coloreadas que indica la actividad antioxidante de los compuestos en cuestión. (Anexo 5)

Figura 12.

Ensayo bioautográfico antioxidante de DPPH del aceite esencial de Clinopodium brownei.



Elaborado por: Las autoras, 2022.

Se realizó la verificación de los componentes por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y se encontró los siguientes resultados:

En el Rf de 0,633, se detectó la presencia de cinamato de metilo, según la investigación ejecutada por Suryanti et al. (2018), la molécula demostró tener actividad antioxidante moderada, esto debido al grupo funcional alcohol en su estructura. Entre las especies con alto contenido de este compuesto en el aceite esencial podemos mencionar a: *Alpinia zerumbet* y *Ocimum canum* (Elzaawely et al., 2007; Morsy & Hammad, 2020).

En el Rf de 0,709, se encontró cinamato de etilo, cuya actividad ya ha sido comprobada mediante técnicas bioautográficas antioxidantes en el estudio realizado por Noriega et al. (2018), de igual manera la molécula sintética posee alta capacidad antioxidante (Olawale et al., 2021). Se destaca la presencia y actividad de cinamato de etilo en aceites esenciales como: *Artemisa judaica* y *Ocotea quixos* (El-Massry et al., 2002; Noriega et al., 2018).

El cariofileno corresponde a la fracción Rf 0,937, la actividad de esta molécula es ampliamente conocida principalmente por ser antioxidante, anticancerígena y

antiinflamatoria; estudios como el realizado Dahham et al. (2015), destacan el efecto antioxidante de este compuesto en el aceite esencial de *Aquilaria crassna*. La actividad antioxidante *in vitro* de este sesquiterpeno es alta, así lo indican los ensayos de peroxidación lipídica, que señalan su eficacia como protector frente al estrés oxidativo. La reducción o eliminación de especies reactivas de oxígeno o de sustancias como el tetracloruro de carbono asociado a la fibrosis hepática, hacen que el cariofileno sea capaz de inhibir el crecimiento de ciertas células cancerígenas (Calleja et al., 2013).

Además, se ha comprobado la actividad antioxidante y antiinflamatoria del cariofileno *in vivo*, a través un modelo de escisión de herida de piel de rata se demostró el potencial de esta molécula como cicatrizante; los mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios involucrados incluyen la reducción progresiva de moléculas proinflamatorias como: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 (Gushiken et al., 2022).

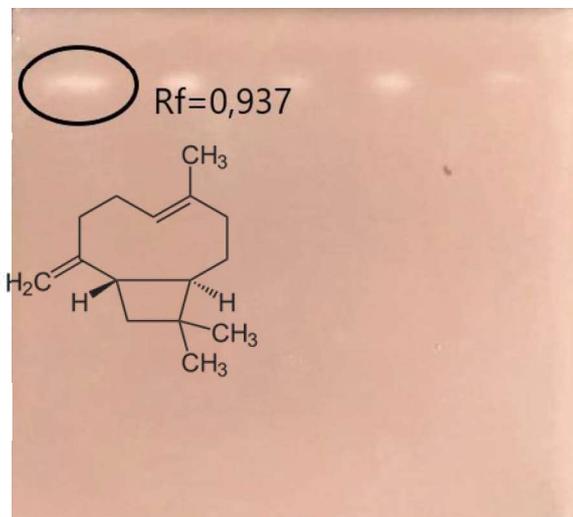
Cabe mencionar también el alto contenido de cariofileno en aceites esenciales de especies vegetales conocidas por su capacidad antioxidante como: *Vernonia Chalybaea*, *Cannabis sativa* y *Globba sessiliflora* (Kumar et al., 2012; Nafis et al., 2019; Nogueira et al., 2020).

5.7 BIOAUTOGRAFÍA ANTIMICROBIANA

El ensayo bioautográfico reveló que la fracción involucrada en la actividad antimicrobiana es la molécula que se encuentra en el Rf= 0,937, esto lo podemos observar en las Figuras 13 y 14, en donde se aprecia las zonas no coloreadas demostrando la capacidad en la inhibición del crecimiento que posee el aceite esencial de *C. brownei*, tanto para la cepa Gram positiva: *Listeria grayi*, como para la cepa Gram negativa: *Proteus vulgaris*. (Anexo 6)

Figura 13.

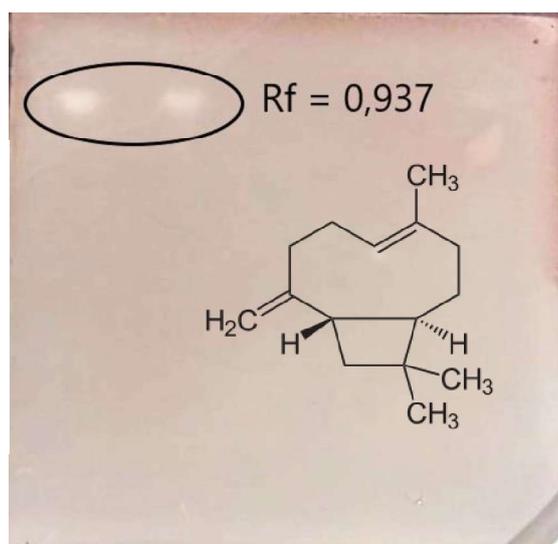
Ensayo bioautográfico antimicrobiano del aceite esencial de *Clinopodium brownei* frente a la bacteria Gram positiva *Listeria grayi*. $R_f = 0.937$ correspondiente a cariofileno



Elaborado por: Las autoras, 2022.

Figura 14.

Ensayo bioautográfico antimicrobiano del aceite esencial de *Clinopodium brownei* frente a la bacteria gram negativa *Proteus vulgaris*. $R_f = 0.937$ correspondiente a cariofileno

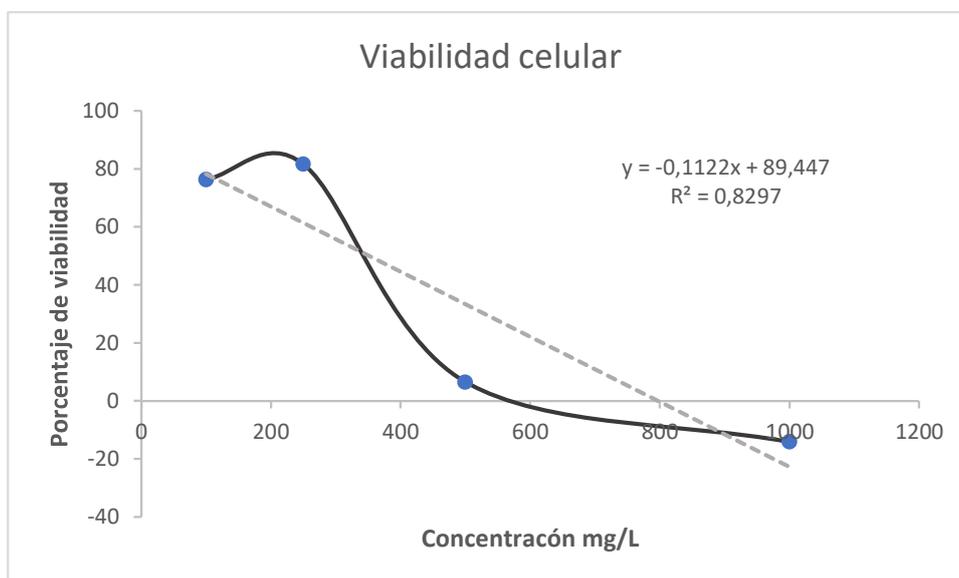


Elaborado por: Las autoras, 2022.

En los ensayos bioautográficos se encontró que la molécula responsable de la actividad antimicrobiana es el cariofileno. Sobre esta molécula se han realizado varios estudios que demuestran su actividad en diversas especies bacterianas, como en la investigación de Yoo & Jwa (2019), sobre el periodontopatógeno *P. gingivalis* en donde además se observó una reducción en la inflamación. Moo et al. (2020), determinaron una CMI para β -cariofileno de 2,5 % (v/v) sobre *B. cereus*, en esta bacteria el cariofileno altera la permeabilidad de la membrana provocando la muerte celular. De igual manera numerosos aceites esenciales con altas concentraciones de cariofileno actúan como antimicrobianos, así lo demostró Sabulal et al. (2006), en su investigación sobre el aceite de rizoma de *Zingiber nimmonii* que contiene cariofilenos isoméricos, β -cariofileno (42,2 %), α -cariofileno (27,7 %) y trazas de isocariofileno; este aceite demostró tener actividades significativas contra *Candida glabrata*, *C. albicans*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*. Novak et al., (2001) determinó que la actividad antimicrobiana de *Cannabis sativa* se puede considerar moderada, con un contenido de hasta el 19 % de trans-cariofileno y el 2 % de óxido de cariofileno. Se ha identificado que los aceites de la familia Verbenaceae tienen alta concentración de terpenos en especial sesquiterpenos como (E)-cariofileno (10-35 %) (Montanari et al., 2011).

5.8 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Se determinó que el CI_{50} del aceite esencial de *C. brownei* sobre células mononucleares de sangre periférica fue de 351,60 mg/L. Además, se observó un 6,5 % de viabilidad a una concentración de 500 mg/L. Como se observa en la Figura 15, la curva de dosis respuesta, indica que a medida que aumenta la concentración de aceite el porcentaje de viabilidad disminuye.

Figura 15.*Curva dosis respuesta*

Elaborado por: Las autoras, 2022

La actividad citotóxica del aceite expresado con el CI_{50} calculado, indica baja toxicidad para las células mononucleares extraídas, lo cual es positivo ya que se trata de células sanas. Sin embargo, la interpretación de este valor para productos naturales es compleja, especialmente para modelos *in vitro*, podemos mencionar que la eficiencia de una sustancia o molécula estaría relacionada a su selectividad. En este aspecto podemos basarnos en el criterio propuesto por Cos et al. (2006), que considera a los valores de CI_{50} por debajo de $100 \mu\text{g/mL}$ como indicadores de actividad relevante y selectiva en el caso de extractos; mientras que para moléculas puras establece valores menores a $25 \mu\text{M}$.

Otros autores proponen rangos diferentes para la clasificación de la actividad citotóxica; Ferraz et al. (2013), sugieren que las concentraciones CI_{50} menores a $30 \mu\text{g/mL}$ indican citotoxicidad alta para los aceites esenciales; para componentes puros se reporta $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$.

Los efectos de toxicidad celular *in vitro* suelen ser variables y se relacionan a factores como: la línea celular de origen, condiciones de cultivo de células, tiempo de proliferación y concentración de los nutrientes en el medio. Además, hay que

considerar que la evaluación de la citotoxicidad a través del método MTT se basa en la actividad enzimática de la célula, esto implica que se pueden generar falsos negativos, es decir que la toxicidad de un aceite esencial puede estar dada por mecanismos moleculares distintos como la apoptosis. También puede darse el caso de la aparición de falsos positivos, que corresponderían a muestras no tóxicas que contengan inhibidores enzimáticos (Velandia et al., 2016) (Anexo 7)

6. CONCLUSIONES

El aceite esencial de *C. Brownei* comparte composición química similar con aquellas dos publicaciones que se encuentran en la literatura científica, de manera particular en las dos moléculas más importantes: pulegona y mentona. Sin embargo, en nuestra investigación, adicionalmente se hayan altas concentraciones de dos fenilpropanoides: cinamato de metil (16,68 %) y cinamato de etil (21,4 %), lo que nos permite concluir que estamos frente a un aceite esencial quimiotipo, ya que estos dos compuestos no están presentes en el aceite investigado en Ecuador (Loja), ni el investigado en Colombia.

Los resultados de actividad antioxidante por las dos metodologías no son extremadamente altas, si se compara con el control natural (*T. vulgaris*). No obstante, si se analizan los valores obtenidos, siguen siendo interesantes al compararlos con otros estudios en aceites esenciales. El ensayo antioxidante bioautográfico reveló que existe actividad en tres moléculas mayoritarias del aceite: cariofileno (10 %) y los dos fenilpropanoides (32,57 %), de estos como se explica en la discusión de los resultados, se pueden encontrar estudios que los destacan como antioxidantes.

De manera similar la actividad antimicrobiana no es equiparable a la del control natural, pero sí bastante buena para un aceite esencial. Las cepas que mostraron una mayor susceptibilidad al aceite fueron: *Listeria Grayi* ATCC 1912, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 y *Candida albicans* ATCC 10231. El ensayo bioautográfico antimicrobiano muestra que el cariofileno es la molécula que tiene la actividad inhibitoria de crecimiento en el aceite esencial, para esta aseveración existen muchos estudios que avalan la actividad individual de esta molécula como antimicrobiano.

La evaluación de la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica extraídas fue bajo ya que supera los 100 ppm, lo cual se considera como un valor positivo ya que se trata de células sanas. Por otro lado debería evaluarse el

potencial citotóxico del aceite esencial de *C. brownei* frente a células malignas *in vitro*]

REFERENCIAS

- Adams, R. (1989). *Identification of Essential Oils by Ion trap Mass Spectroscopy*. Elsevier Science. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2009-0-21675-8>
- Aguilar, I., Galviz, A., & Beltrán, L. (2015). *Determinación de la Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial extraído de la planta *Satureja brownei* (Briq.) cultivada en el Jardín de plantas Medicinales* [Universidad de los Andes]. <http://aq-bie20.serbi.ula.ve/RediCiencia/busquedas/DocumentoRedi.jsp?file=40025&type=ArchivoDocumento&view=pdf&docu=32664&col=5>
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D., & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMT*, 9, 11–18.
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 043101–043102. <https://doi.org/10.1063/1.3653552>
- Ballesteros, J. L., Tacchini, M., Spagnoletti, A., Grandini, A., Paganetto, G., Neri, L. M., Marengo, A., Angiolella, L., Guerrini, A., & Sacchetti, G. (2019). Rediscovering medicinal Amazonian aromatic plants: Piper carpunya (Piperaceae) essential oil as paradigmatic study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6194640>
- Bennett, B., & Gómez, P. (1989, April 18). *Tropicos: Clinopodium brownei specimens*. <https://www.tropicos.org/name/50112719>
- Cadena, G. (2017). *Revisión taxonómica del género Clinopodium L. (Lamiaceae) en México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Calaway, H. D. (1979, February 2). *Tropicos: Clinopodium brownei distributions*. <https://www.tropicos.org/name/50112719>
- Calleja, M. A., Vieites, J. M., Montero-Meterdez, T., Torres, M. I., Faus, M. J., Gil, A., & Suárez, A. (2013). The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *The British Journal of Nutrition*, 109(3), 394–401. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001298>
- Castro, S. (2006). *Evaluación de la Actividad Citotóxica de Extractos y Fracciones de *Isertia laevis* Empleando Líneas Celulares Derivadas de Tumores Humanos* [2006, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8800/tesis75.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Chasipanta, E., & Chicaiza, T. (2016a). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA DE 5 VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES AMAZÓNICOS (*Ocoteaquixos; Psidiumguajava; Eugenia stipitata; Piperauritum; Piperimperiale*)*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Chasipanta, E., & Chicaiza, T. (2016b). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BIOAUTOGRÁFICA DE 5 VARIEDADES DE ACEITES ESENCIALES AMAZÓNICOS*

- (*Ocoteaquixos; Psidiumguajava; Eugenia stipitata; Piperauritum; Piperimperiale*).
Universidad Politécnica Salesiana.
- Cos, P., Vlietinck, A., Berghe, D., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, *106*(3), 290–302. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.04.003>
- Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B. K., Ezzat, M. O., Majid, A. S. A., & Majid, A. M. S. A. (2015). The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, *20*(7), 11808. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES200711808>
- El-Massry, K. F., El-Ghorab, A. H., & Farouk, A. (2002). Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chemistry*, *79*(3), 331–336. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00164-4)
- Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., & Tawata, S. (2007). Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, *103*(2), 486–494. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.08.025>
- Espinosa, S., Bec, N., Larroque, C., Ramírez, J., Sgorbini, B., Bicchi, C., Cumbicus, N., & Gilardoni, G. (2020). *molecules A Novel Chemical Profile of a Selective In Vitro Cholinergic Essential Oil from Clinopodium taxifolium (Kunth) Govaerts (Lamiaceae), a Native Andean Species of Ecuador*. <https://doi.org/10.3390/molecules26010045>
- Ferraz, R. P. C., Bomfim, D. S., Carvalho, N. C., Soares, M. B. P., da Silva, T. B., Machado, W. J., Prata, A. P. N., Costa, E. v., Moraes, V. R. S., Nogueira, P. C. L., & Bezerra, D. P. (2013). Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *20*(7), 615–621. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2013.01.015>
- Fonseca, E. (2016). *Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana del aceite esencial de sunfo (Clinopodium nubigenum (Kunth) (Kuntze) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (Staphylococcus aureus ATCC: 25923, Streptococcus pyogenes ATCC: 19615, Streptococcus pneumoniae ATCC: 49619 Y Streptococcus mutans ATCC: 25175 [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13227/1/UPS-QT10425.pdf>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, *77*(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Valencia]*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%c3%adnez%20et%20al.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guerrini, A., Rossi, D., Grandini, A., Scalvenzi, L., Rivera, P. F. N., Andreotti, E., Tacchini, M., Spagnoletti, A., Poppi, I., Maietti, S., & Sacchetti, G. (2014). Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) Citrus petitgrains. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *87*, 108–116. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2014.087.017>

- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M. E., & Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(1), 39–48.
<https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2008.08.002>
- Guija, E., Inocente, M. A., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med*, 57–60. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2015000100008
- Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Hussni, M. F., Gonzaga, M. T., Ribeiro, V. P., de Souza, P. F., Campos, J. C. L., Massaro, T. N. C., Hussni, C. A., Takahira, R. K., Marcato, P. D., Bastos, J. K., & Pellizzon, C. H. (2022). Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
<https://doi.org/10.1155/2022/9004014>
- Gutiérrez, A., & Armando, D. (2014). *Orden de reacción de óxido-reducción de los antioxidantes del decocto de la coronta de Zea mays L. (variedad morado) con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH+)* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3700>
- Hoogesteger, C. (1994). *Uso de Plantas Medicinales*. Árbol Editorial .
- Horváth, G., Jámbor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., & Kocsis, B. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 178–182.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1993>
- Jaramillo, B., & Stashenko, E. M. J. (2010). Composición química volátil de *Satureja brownei* (Sw.) Briq. colombiana y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1), 52–63. <http://scielo.sld.cu>
- Karpiński, T. M. (2020). Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 103, 10(1), 103.
<https://doi.org/10.3390/BIOM10010103>
- Kumar, R., Prakash, O., Pant, A. K., Isidorov, V. A., & Mathela, C. S. (2012). Chemical composition, antioxidant and myorelaxant activity of essential oils of *Globba sessiliflora* Sims. *Journal of Essential Oil Research*, 24(4), 385–391.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.692915>
- Larramendy, M., & Soloneski, S. (2018). *Genotoxicity A Predictable Risk to Our Actual World*. IntechOpen.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.57772/intechopen.69556>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2022, March 14). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. Publicaciones Del Herbario QCA, PUCE. <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/home>
- Liu, Y., Liu, L. M., Xiong, Y. G., Shen, X. bin, Liu, H., & Nian, S. H. (2020). [Research progress on genus *Clinopodium*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*, 45(18), 4349–4357.
<https://doi.org/10.19540/J.CNKI.CJCM.20200604.601>
- Matailo, A., Bec, N., Calva, J., Ramírez, J., Andrade, J. M., Larroque, C., Vidari, G., & Armijos, C. (2019). Selective BuChE inhibitory activity, chemical composition, and enantiomer content of the volatile oil from the Ecuadorian plant *Clinopodium*

- brownei. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 749–754.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.08.001>
- Moncayo, A. (2020). *Caracterización de metabolitos secundarios de naturaleza esteroidea presentes en el aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico de la especie Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts (Lamiaceae)* [Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18437>
- Montanari, R. M., A Barbosa, L. C., Demuner, C. J., Silva, A. J., Carvalho, N. J., & Andrade, L. S. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Quim. Nova*, 34(9), 1550–1555.
<https://www.scielo.br/j/qn/a/fNv5Tr3BgxP5TCVSWqSpBrv/abstract/?lang=en>
- Montealegre Cespedes, O. E. (2021). *Métodos analíticos para la determinación de capacidad antioxidante de aceites esenciales* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Abierta Y a Distancia].
<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/41776>
- Montealegre, E. (n.d.). *Métodos analíticos para la determinación de capacidad antioxidante de aceites esenciales* [2021]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Moo, C. L., Yang, S. K., Osman, M. A., Yuswan, M. H., Loh, J. Y., Lim, W. M., Lim, S. H. E., & Lai, K. S. (2020). Antibacterial activity and mode of action of β -caryophyllene on *Bacillus cereus*. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1), 49–54.
<https://doi.org/10.33073/pjm-2020-007>
- Morocho, V., Valle, A., García, J., Gilardoni, G., Cartuche, L., & Suárez, A. I. (2018). α -Glucosidase inhibition and antibacterial activity of secondary metabolites from the ecuadorian species *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts. *Molecules*, 23(1), 146. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23010146>
- Morsy, N. F. S., & Hammad, K. S. M. (2020). Extraction of essential oil from methyl cinnamate basil (*Ocimum canum* Sims) with high yield in a short time using enzyme pretreatment. *Journal of Food Science and Technology* 2020 58:7, 58(7), 2599–2605. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04766-Y>
- Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Mezrioui, N., Setzer, W., Abbad, A., & Hassani, L. (2019). Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. *Industrial Crops and Products*, 137, 396–398. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.05.032>
- Nogueira, A., de Moraes, S. M., de Souza, E. B., Albuquerque, M. R., Ribeiro, J., dos Santos, H. S., de Paula, C., de Sousa, H., & dos Santos Fontenelle, R. O. (2020). Antifungal and antioxidant activities of *Vernonia Chalybaea* Mart. ex DC. essential oil and their major constituent β -caryophyllene. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, 3–9. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190177>
- Noriega, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja*, 10(2), 3–13.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047394002>
- Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S. (2019). Chemical composition and biological activity of five essential oils from the Ecuadorian Amazon rain forest. *Molecules*, 24(8).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES24081637>

- Noriega, P., Mosquera, T., Abad, J., Cabezas, D., Piedra, S., Coronel, I., Maldonado, M., Venturi, S., & Manfredini, S. (2016). Composición Química, Actividad antioxidante y Antimicrobiana del Aceite Esencial Proveniente de las Hojas de *Piper pubinervulum* C. DC Piperaceae. *La Granja*, 24(2), 113–123.
<https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.09>
- Noriega, P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Aillon, C., Cabezas, D., Piedra, J., Coronel, I., & 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.
https://www.researchgate.net/publication/324040590_Chemical_Composition_and_in-vitro_biological_activities_of_the_essential_oil_from_leaves_of_Peperomia_inaequalifolia_Ruiz_Pav
- Noriega, P., Mosquera, T., Osorio, E., Guerra, P., & Fonseca, A. (2018). *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze essential oil: Chemical composition, antioxidant activity, and antimicrobial test against respiratory pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(9), 149–157.
<https://doi.org/10.5897/jpp2017.0467>
- Noriega, P., Mosquera, T., Paredes, E., Parra, M., Zappia, M., Herrera, M., Villegas, A., & Osorio, E. (2018a). Antimicrobial and antioxidant bioautography activity of bark essential oil from *Ocotea quixos* (Lam.) kosterm. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 31(2), 163–168.
<https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.2.11>
- Noriega, P., Mosquera, T., Paredes, E., Parra, M., Zappia, M., Herrera, M., Villegas, A., & Osorio, E. (2018b). Antimicrobial and antioxidant bioautography activity of bark essential oil from *ocotea quixos* (lam.) kosterm. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 31(2), 163–168.
<https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.2.11>
- Novak, J., Zitterl-Eglseer, K., Deans, S. G., & Franz, C. M. (2001). Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. And their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(4), 259–262. <https://doi.org/10.1002/ffj.993>
- Olawale, H., Omoridion, P., & Chidera, P. (2021). Acetylation of cinnamic acid and evaluation of antioxidant activity of the resultant derivative. *International Journal of Bioorganic Chemistry*, 6(2), 26–29.
<https://doi.org/10.11648/J.IJBC.20210602.13>
- Ramirez, S., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 15, 263–268. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- 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*, 26(9–10), 1231–1237.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* (Omnia Science). <https://doi.org/10.3926/oms.313>
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas* (CONACYT).
<http://dSPACE.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1402>

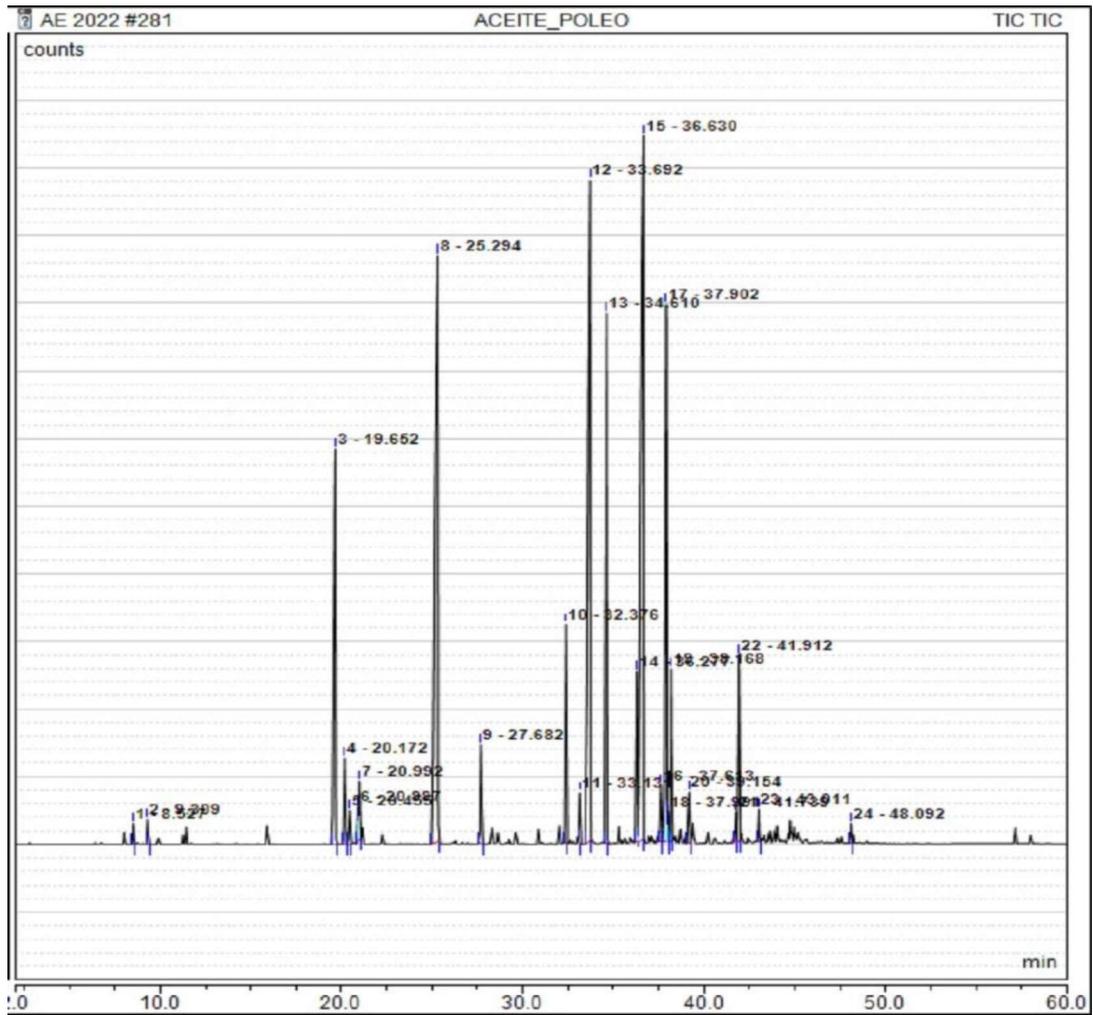
- Rojas, L. B., & Usubillaga, A. (2000). Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour Fragr. J*, *15*, 21–22. https://www.researchgate.net/publication/247963851_Composition_of_the_essential_oil_ofSatureja_brownei_SW_Briq_from_Venezuela
- Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M., Saro, K., & Sacchetti, G. (2011). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chemistry*, *126*(3), 837–848. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.11.042>
- Sabulal, B., Dan, M., J, A. J., Kurup, R., Pradeep, N. S., Valsamma, R. K., & George, V. (2006). Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry*, *67*(22), 2469–2473. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.003>
- Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros, J. L., Sacchetti, G., & Guerrini, A. (2017). *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (Myrtaceae) essential oil from Amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules*, *22*(7), 1163–1166. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22071163>
- Serda, M. (2013). Síntesis y actividad biológica de nuevos análogos de quelantes de hierro tiosemicarbazona. In G. Balint, B. Antala, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova (Eds.), *Uniwersytet śląski* (Vol. 2). <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento* [Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/5606>
- Sparre, B. (1967, May 27). *Tropicos: Clinopodium brownei specimens*. <https://www.tropicos.org/name/50112719>
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, *2*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Sudeep, N., & Kiranmayee, P. (2017). Evaluation of in vitro cytotoxic effects of three medicinal plants on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Article in Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *9*, 19–24. <https://www.researchgate.net/publication/319314623>
- Suryanti, V., Wibowo, F. R., Khotijah, S., & Andalucki, N. (2018). Antioxidant Activities of Cinnamaldehyde Derivatives. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *333*(1), 012077. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/333/1/012077>
- Tapia, E., Rivera, B., Castro, A., Corderhuamán, M., Quispe, C., & Valdivieso, D. (2019). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (kunth) Govaerts <<panizarra>> frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. *Cultura*, *33*, 413. <https://doi.org/10.24265/cultura.2019.v33.22>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, *79*(7), R1231–R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Torre, L. de la. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Tubon, I., Bernardini, C., Antognoni, F., Mandrioli, R., Potente, G., Bertocchi, M., Vaca, G., Zannoni, A., Salaroli, R., & Forni, M. (2020). Clinopodium tomentosum (Kunth) Govaerts Leaf Extract Influences in vitro Cell Proliferation and Angiogenesis on Primary Cultures of Porcine Aortic Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/2984613>
- Valarezo, E., Rosales, J., Morocho, V., Cartuche, L., Guaya, D., Ojeda-Riascos, S., Armijos, C., & González, S. (2015). Chemical composition and biological activity of the essential oil of Baccharis obtusifolia Kunth from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Reserach*, 27(3), 212–216. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1007217>
- 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. *Https://Doi.Org/10.1080/10412905.2013.775679*, 25(3), 233–238. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775679>
- Vandebroek, I., & Picking, D. (2020). Clinopodium brownei (Sw.) Kuntze (Lamiaceae). *Popular Medicinal Plants in Portland and Kingston*, 2, 89–94. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48927-4_10
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Vitae*, 23(1), 18–29. <https://doi.org/10.17533/UDEA.VITAE.V23N1A03>
- Veloz, J. (2018). *Evaluación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de Piper barbatum Kunth (cordoncillo)* [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16382/1/UPS-QT13502.pdf>
- Venkateshappa, S. M., & Sreenath, K. P. (2013). Potential Medicinal Plants of Lamiaceae. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, 3(1), 82. <https://core.ac.uk/download/pdf/72802302.pdf>
- Vila, R. (1987). *Contribución al estudio de polifenoles y aceites esenciales en el género Thymus L.* [Tesis de pregrado, Universidad de Barcelona]. http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/34832/2/02.RVC_2de3.pdf
- Yoo, H. J., & Jwa, S. K. (2019). Efficacy of β -caryophyllene for periodontal disease related factors. *Archives of Oral Biology*, 100, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.02.015>
- Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). Essential Oils Chemistry. *Bioactive Essential Oils and Cancer*, 19–61. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19144-7_2

ANEXOS

Anexo 1.

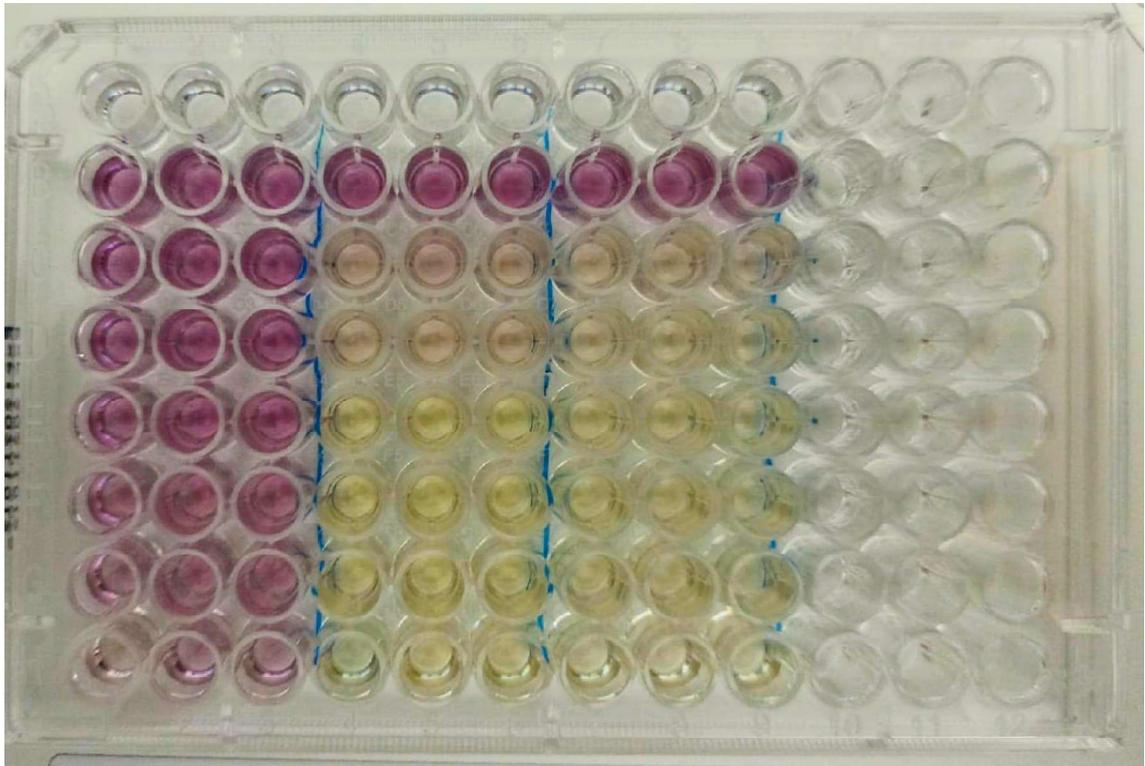
Cromatograma del aceite esencial de C. brownei



Elaborado por: Las autoras, (2022)

Anexo 2.

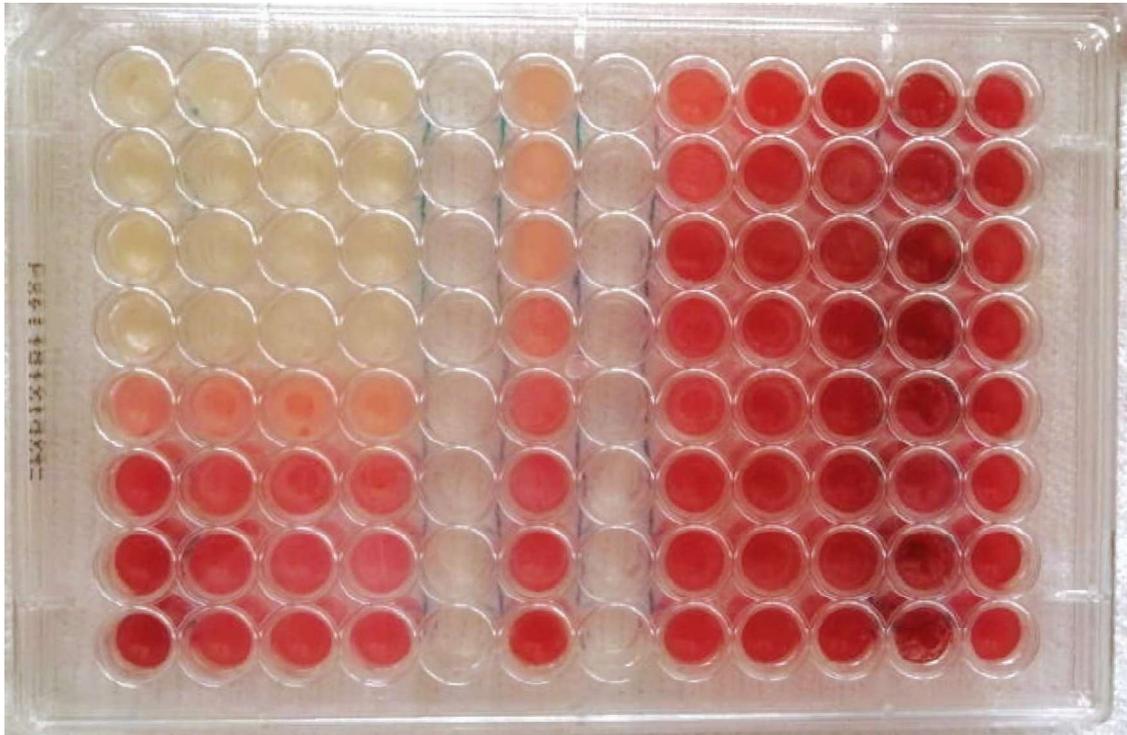
Determinación de la capacidad antioxidante DPPH



Elaborado por: Las autoras, (2022)

Anexo 3.

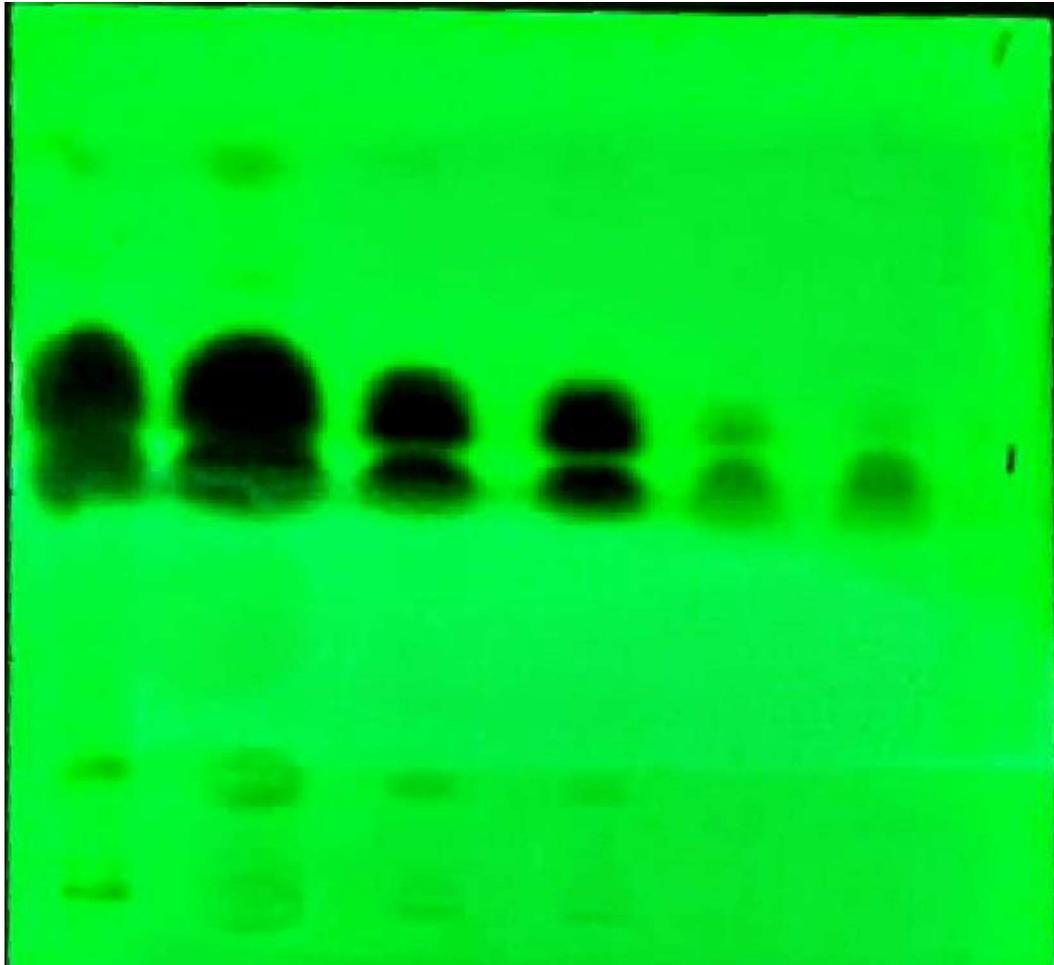
Actividad antimicrobiana mediante técnica de microdilución en caldo



Elaborado por: Las autoras, 2022

Anexo 4.

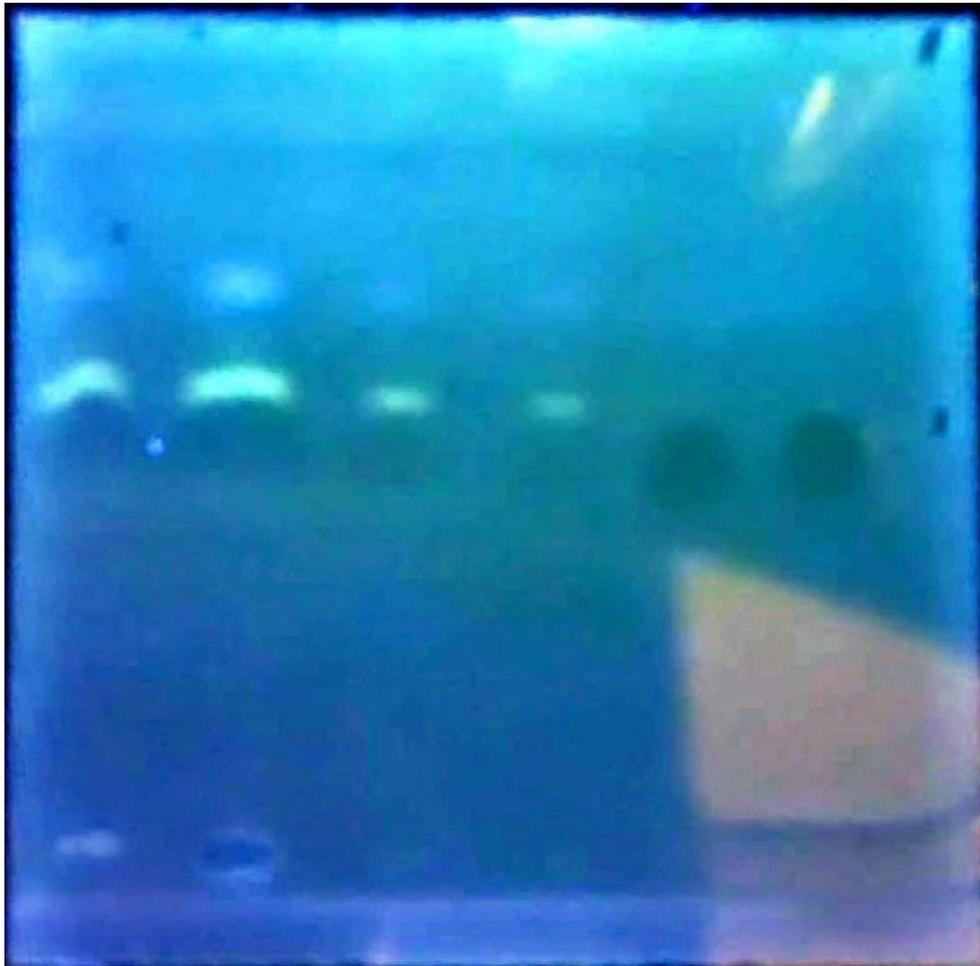
Placa cromatográfica del aceite de C. brownei vitos a 254 nm



Elaborado por : Las autoras, 2022

Anexo 5.

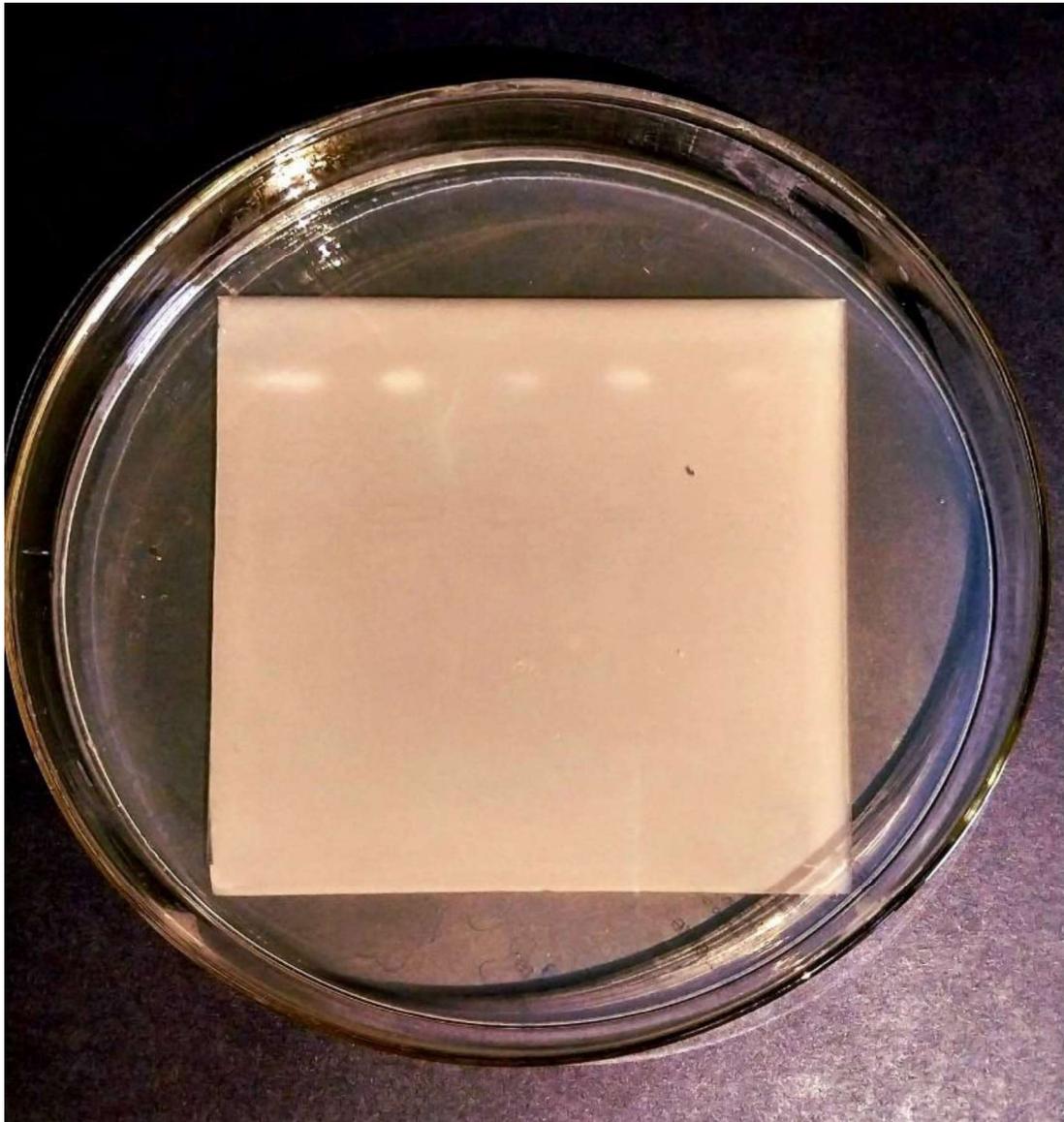
Placa cromatográfica del aceite de C. brownei visto a 366 nm



Elaborado por : Las autoras, 2022

Anexo 6.

Bioautografía antimicrobiana



Elaborado por: Las autoras, 2022

]