

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA Y DETERMINACIÓN DE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE  
*Renealmia thyrsoides* SUBESPECIE *thyrsoides*.**

**AUTORAS:**

**JESSICA ELIZABETH BASANTES AGUIRRE  
ANDREA LILIANA TRUJILLO RONQUILLO**

**DIRECTOR:**

**PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA**

**Quito, mayo del 2015**

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO  
DE TRABAJO DE GRADO**

Autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de grado y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, mayo del 2015

---

Jessica Basantes Aguirre  
CI: 1721847190

---

Andrea Trujillo Ronquillo  
CI: 1803282993

## DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones recibidas.

A mis papitos Fausto y Susana que han sido mi soporte, mi apoyo incondicional.

Alisson y Anthony, Max; mis hermanitos hermosos que alegran mi vida.

Abuelita Beatriz y Angelitos míos que están en el cielo.

Familia y amigos que son parte importante en mi vida.

A Fabri que cada día alegra mi vida y corazón.

*Jessy*

He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña,  
sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada.

*(Gabriel García Márquez)*

A Dios.

A Lili y Francisco, mis padres.

A mi familia.

A mi persona favorita.

A esa “familia escogida” que puedo llamar amigos.

A la Vanilla, la Misha y el Cafeto.

A ti, mi alguien especial, mi ser humano lleno de magia y luz.

*Andre*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios Todopoderoso.*

*A la Universidad Politécnica Salesiana y al personal que labora en la institución.*

*Al Dr. Paco Noriega, director de tesis, por los conocimientos concedidos,  
agradecemos también su paciencia, dedicación y empeño para el desarrollo de esta  
investigación.*

*Al Q.F. Wilson Tapia, lector de tesis, por sus acertadas recomendaciones y  
observaciones.*

*A la Ing. Diana Calero, Directora de carrera de Biotecnología, por el apoyo que nos  
ha brindado durante todo este proceso.*

*A todos los docentes de la facultad de Biotecnología.*

*A todos quienes conforman el CIVABI.*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	
1.1 Justificación .....	3
1.2 Hipótesis.....	5
1.3 Objetivos .....	5
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. Especie vegetal.....	6
2.1.1. Taxonomía .....	6
2.1.2. Descripción .....	6
2.1.3. Hábitat.....	7
2.1.4. Distribución.....	7
2.1.5. Usos de <i>Renealmia thyrsoides</i> (Shiwancu muyu) .....	8
2.1.6. Otras investigaciones .....	9
2.2. Aceites Esenciales.....	9
2.2.1. Acción farmacológica de los aceites esenciales.....	10
2.2.2. Importancia económica de los aceites esenciales.....	11
Industria Alimentaria .....	11
Industria Farmacéutica .....	11
Industria de Cosméticos .....	11
Industria de productos de uso veterinario .....	12
Desodorantes Industriales .....	12
Industria tabacalera .....	12
Biocidas e insecticidas .....	12
2.2.3. Extracción de aceites esenciales.....	12
2.3. Propiedades físicas.....	14
2.3.1. Índice de refracción.....	14
2.3.2. Índice de acidez.....	14
2.3.3. Densidad.....	14
2.4. Determinación de la composición química de aceites esenciales .....	15

Terpenoides .....	15
Monoterpenos.....	15
Sesquiterpenos.....	16
No terpenoides.....	16
2.4.1. Método de cromatografía de gases acoplada a masas. ....	16
2.4.1.1. Espectrometría de masas .....	17
2.4.1.1. Índice de Kovats.....	18
2.4.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	20
2.4.2.1. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear.....	21
2.5. Actividad antioxidante .....	21
2.5.1. Actividad antioxidante de los aceites esenciales.....	22
2.5.2. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) .....	23
2.5.3. Método ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico) .....	24
2.6. Análisis microbiológicos.....	25
2.6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana.....	30
2.6.2.1. Método de difusión en agar.....	30
2.6.2.2. Método de dilución .....	31
2.6.3. Concentración Mínima Inhibitoria.....	31

### **CAPÍTULO 3**

#### **MARCO METODOLÓGICO**

3.1. Elección de la especie vegetal.....	33
3.1.1. Condiciones de las muestras y de la zona de recolección .....	33
3.1.2. Recolección del material vegetal .....	33
3.1.3. Identificación taxonómica.....	34
3.2. Destilación de aceites esenciales.....	34
3.2.1. Destilación del aceite esencial de hojas de <i>Renealmia thyrsoides</i> .....	34
3.3. Purificación de los aceites.....	35
3.4. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial.....	36
3.5. Características organolépticas .....	37
3.6. Determinación de propiedades físicas.....	37
3.6.1. Índice de refracción.....	38
3.6.2. Índice de acidez.....	38
3.6.3. Densidad.....	39

3.7. Determinación de la composición química.....	40
3.7.1. Cromatografía de gases.....	40
3.7.1.1. Preparación de las muestras.....	40
3.7.1.2. Condiciones del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas.....	41
3.7.2. Cálculo del índice de Kovats.....	41
3.7.3. Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$ .....	42
3.7.3.1. Característica del equipo.....	42
3.7.3.2. Condiciones de la muestra.....	42
3.8. Actividad antioxidante.....	42
3.8.1. DPPH test.....	43
3.8.2. Ensayo ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico).....	44
3.8.2.1. Preparación de la solución madre de ABTS.....	45
3.8.2.2. Preparación de la solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ .....	45
3.8.2.3. Preparación del ABTS radicalizado.....	45
3.8.2.4. Preparación de las muestras.....	45
3.8.2.5. Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.....	46
3.8.2.6. Lectura del blanco.....	46
3.8.2.7. Lectura de las soluciones.....	46
3.9. Estudios de actividad antimicrobiana.....	48
3.9.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la actividad antimicrobiana.....	49

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS**

4.1. Rendimiento de los aceites extraídos.....	52
4.2. Control de calidad.....	52
4.2.1. Evaluación sensorial del aceite esencial.....	52
4.2.2. Índice de refracción de los aceites.....	52
4.2.3. Densidad del aceite.....	53
4.2.4. Determinación del índice de acidez.....	53
4.3. Determinación de la composición química.....	53
4.3.1. Cromatografía de gases.....	53
4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	55

4.3.2.1. Interpretación química .....	55
4.4. Actividad antioxidante .....	57
4.4.1. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) .....	57
4.4.2. Método ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico) .....	62
4.5. Actividad antimicrobiana .....	68
4.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	68
<b>CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	76
<b>LISTA DE REFERENCIAS</b> .....	77
<b>ANEXOS</b> .....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción botánica de <i>Renealmia thyrsoidea</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Destilación por arrastre de vapor .....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura química de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) .....	24
<b>Figura 4.</b> Oxidación de ABTS (2,2-azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico .....	24
<b>Figura 5.</b> Recolección y almacenamiento de hojas de <i>Renealmia thyrsoidea</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Destilación y obtención del aceite esencial .....	34
<b>Figura 7.</b> Proceso de purificación del aceite esencial .....	35
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de aceite esencial obtenido .....	36
<b>Figura 9.</b> Caracterización organoléptica del aceite esencial.....	36
<b>Figura 10.</b> Determinación de las propiedades físicas en los AE.....	39
<b>Figura 11.</b> Esquema del DPPH test con AE de <i>Renealmia thyrsoidea</i> y <i>Thymus vulgaris</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> Esquema del ensayo de ABTS con AE de <i>Renealmia thyrsoidea</i> y <i>Thymus vulgaris</i> .....	46
<b>Figura 13.</b> Preparación de un cultivo overnight .....	50
<b>Figura 14.</b> Revitalización de las cepas del cryobank .....	49
<b>Figura 15.</b> Actividad antimicrobiana .....	51
<b>Figura 16.</b> Espectros de RM <sup>1</sup> H.....	55
<b>Figura 17.</b> Identificación del <i>Nerolidol</i> en el espectro químico en RMN <sup>1</sup> H .....	56
<b>Figura 18.</b> Espectro químico del Silvestreno en RMN <sup>1</sup> H.....	56

<b>Figura 19.</b> Moléculas de los compuestos encontrados en el AE de las hojas de..... <i>Renealmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	57
<b>Figura 20.</b> Absorbancia VS concentración de A.E. de las hojas de <i>Renealmia thyrsoidea</i> .....	58
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de Inhibición VS concentración del A.E de las hojas de ..... <i>Renealmia thyrsoidea</i> .....	58
<b>Figura 22.</b> Concentración del A.E de <i>Thymus vulgaris</i> VS la absorbancia.....	59
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de inhibición del A.E. de <i>Thymus vulgaris</i> VS concentración .....	60
<b>Figura 24.</b> Concentración del BHA VS Absorbancia .....	61
<b>Figura 25.</b> Concentración del BHA VS % de inhibición.....	61
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de inhibición del A.E. de <i>Renealmia thyrsoidea</i> , <i>Thymus vulgaris</i> y BHA.....	62
<b>Figura 27.</b> Absorbancia VS concentración del AE de <i>Renealmia thyrsoidea</i> .....	63
<b>Figura 28.</b> Porcentaje de inhibición del A.E. de <i>Renealmia thyrsoidea</i> VS concentración.....	64
<b>Figura 29.</b> Absorbancia VS concentración del AE de <i>Thymus vulgaris</i> .....	65
<b>Figura 30.</b> Concentración del Aceite esencial de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> VS .... % de inhibición.....	65
<b>Figura 31.</b> Concentración de BHA VS absorbancia.....	66
<b>Figura 32.</b> Concentración de BHA VS % de inhibición .....	67
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de inhibición de <i>Renealmia thyrsoidea</i> , <i>Thymus vulgaris</i> ..... y BHA.....	68

<b>Figura 34.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias Gram (+) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P <sup>TM</sup> y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 frente a los aceites esenciales de las hojas de <i>Renealmia thyrsoides</i> subespecie <i>Thyrsoides</i> y <i>Thymus vulgaris</i> .....	69
<b>Figura 35.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias Gram (-) <i>Escherichia coli</i> ATCC8739 <sup>TM</sup> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC9027 <sup>TM</sup> frente a los aceites esenciales de las hojas de <i>Renealmia thyrsoides</i> subespecie <i>Thyrsoides</i> y <i>Thymus vulgaris</i> .....	70
<b>Figura 36.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de levaduras <i>Candida albicans</i> ATCC10231 y <i>Candida tropicalis</i> ATCC13803 frente a los aceites esenciales de las hojas de <i>Renealmia thyrsoides</i> subespecie <i>thyrsoides</i> y <i>Thymus vulgaris</i> .....	71
<b>Figura 37.</b> Promedio de halos de inhibición de los m.o. frente a los A.E. ....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica <i>Renalmia thyrsoidea</i> .....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica <i>Escherichia coli</i> .....	27
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	28
<b>Tabla 4.</b> Clasificación taxonómica <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
<b>Tabla 5.</b> Clasificación taxonómica <i>Streptococcus mutans</i> .....	29
<b>Tabla 6.</b> Clasificación taxonómica <i>Candida albicans</i> .....	30
<b>Tabla 7.</b> Clasificación taxonómica <i>Candida tropicalis</i> .....	30
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones de los AE de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> y <i>Thymus vulgaris</i> en $\mu\text{L}$ aforados a 100 $\mu\text{L}$ de DMSO .....	46
<b>Tabla 9.</b> Requerimientos para sembrar bacterias y levaduras.....	48
<b>Tabla 10.</b> Índice de refracción a una T ° promedio de 22,8° C del aceite esencial de las hojas de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	53
<b>Tabla 11.</b> Picnometría de 10 mL del aceite esencial de las hojas de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	53
<b>Tabla 12.</b> Índice de Kovats calculado .....	53
<b>Tabla 13.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas del AE de las hojas de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	57
<b>Tabla 14.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	59
<b>Tabla 15.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA (Butil Hidroxianisol) .....	60
<b>Tabla 16.</b> Valor de IC <sub>50</sub> del AE de <i>Renalmia thyrsoidea</i> y <i>Thymus vulgaris</i> , BHA .....	62
<b>Tabla 17.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas del AE de las hojas de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	62

<b>Tabla 18.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	64
<b>Tabla 19.</b> Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA.....	66
<b>Tabla 20.</b> Valor de IC <sub>50</sub> del A.E. de <i>Renalmia thyrsoidea</i> y <i>Thymus vulgaris</i> , BHA .....	67
<b>Tabla 21.</b> Cuadro de las concentraciones en porcentaje y su equivalente en (mg/mL) del AE de las hojas de <i>Renalmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> y del AE de <i>Thymus vulgaris</i> . .....	68
<b>Tabla 22.</b> Promedio de halos de m.o. frente al A.E. ....	72
<b>Tabla 23.</b> Promedio de halos de m.o. frente al blanco positivo. ....	72
<b>Tabla 24.</b> Cuadro de resultados de la actividad antimicrobiana CMI expresada en concentración (mg/ml) .....	73

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje de rendimiento del AE .....	37
<b>Ecuación 2.</b> Cálculo del índice de acidez .....	38
<b>Ecuación 3.</b> Densidad relativa .....	39
<b>Ecuación 4.</b> Cálculo del índice de Kovats .....	42
<b>Ecuación 5.</b> Cálculo de porcentaje de inhibición del DPPH .....	43
<b>Ecuación 6.</b> Cálculo de porcentaje de inhibición ABTS .....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Certificado correspondiente a la especie vegetal en estudio avalado por el Herbario “Alfredo Paredes” de la Universidad Central de Ecuador.....	81
<b>Anexo 2.</b> Cromatogramas de los compuestos con mayor porcentaje encontrados en GC/M .....	82
<b>Anexo 3.</b> Estructura química de los espectros encontrados en GC/MS .....	84
<b>Anexo 4.</b> Fotografías del proceso de recolección y destilación del A.E. de <i>Renealmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> .....	85
<b>Anexo 5.</b> Ensayos DPPH y ABTS test para la determinación de la actividad antioxidante del A.E. de las hojas de <i>Renealmia thyrsoidea</i> subespecie <i>thyrsoidea</i> . .....	86
<b>Anexo 6.</b> Fotografías de la actividad antimicrobiana.....	88
<b>Anexo 7.</b> Lectura de halos de inhibición .....	92

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos, caracterizar los componentes químicos y físicos del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*, además de determinar su actividad antibacteriana y antifúngica para fomentar un precedente en la realización futura de productos a partir de esta planta.

El aceite esencial de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* fue obtenido mediante arrastre de vapor. Se determinaron las propiedades físicas; índices de refracción (1,481 g) e índice de acidez (22,581 g). El valor de la densidad fue 0,8685g.

La composición química del AE se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) y resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  (RMN $^1\text{H}$ ). Se identificaron 49 compuestos que representan el 95,33% del aceite. Los compuestos más representativos fueron: silvestreno (28,78%), canfeno (8,53%),  $\beta$ -felandreno (6,46%),  $\alpha$ -neoridol (6,37%), aristolocheno (4,34%), adomandreno (3,69%),  $\gamma$ -copaeno (3,13%).

La actividad antioxidante fue evaluada mediante dos métodos espectrofotométricos: DPPH test y ensayo de ABTS. Los valores obtenidos de IC<sub>50</sub> fueron: 20,86 mg/mL para DPPH y 1,33 mg/mL para ABTS.

La actividad antimicrobiana reveló mejores resultados de inhibición frente a las cepas de bacterias gram (-) *Escherichia coli* ATCC8739TM y *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027TM con una CMI de 0,347 mg/mL para ambas. Frente a las levaduras el CMI para *Candida albicans* ATCC10231 fue 1,389 mg/mL y *Candida tropicalis* ATCC13803 0,347 mg/mL.

**Palabras clave:** *Renealmia thyrsoidea*, aceite esencial, DPPH, ABTS, CMI, RMN $^1\text{H}$ .

## ABSTRACT

This study aimed to characterize the chemical and physical components of the essential oil from the leaves of *Renalmia* subspecies *thyrsoidea*, besides determining its antibacterial and antifungal activity to promote a precedent for the future realization of products from this plant.

The essential oil of *Renalmia thyrsoidea* subspecies *thyrsoidea* was obtained by steam stripping. The physical properties were determined; refractive indices (1,481 g) and acid indices (22,581 g). The density value was 0,8685g.

The chemical composition of OE was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and nuclear magnetic resonance  $^1\text{H}$  (NMR $^1\text{H}$ ).

There were 49 compounds identified wich representing 95,33% of the oil. The most representative compounds were sylvestrene (28,78%), camphene (8,53%),  $\beta$ -phellandrene (6,46%), z-neoridol (6,37%), aristolochene (4,34%), adomandreno (3,69%),  $\gamma$ -copaene (3,13%).

The antioxidant activity was evaluated by two spectrophotometric methods: test DPPH and ABTS assay. The IC<sub>50</sub> values obtained were 20,86 mg/mL for DPPH and 1,33 mg/mL for ABTS.

Antimicrobial activity revealed better inhibition results than strains of Gram (-) *Escherichia coli* ATCC8739TM and *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027TM a MIC of 0,347 mg/ml for both. Facing the yeast *Candida albicans* ATCC10231 was 1,389 mg/ml and *Candida tropicalis* ATCC13803 0,347 mg/ml.

The characterization of the chemical composition and determining the biological activity of the essential oil leaves *Renalmia thyrsoidea* subspecies *thyrsoidea* showed similar data against preliminary investigations with the same it.

**Keywords:** *Renalmia thyrsoidea*, essential oil, DPPH, ABTS, MIC, RMN $^1\text{H}$ .

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las plantas medicinales, considerando a la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica tienen un gran auge, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico.

La medicina, como parte del patrimonio etnobotánico, se refiere a una práctica antigua de salud de los pueblos amazónicos, que se ha transmitido generacionalmente; considerando a este patrimonio etnográfico frágil por la erosión cultural y los procesos de globalización económica, se requieren acuerdos para su conservación y preservación integral.

Según la OMS el 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utilizan las plantas como principal remedio medicinal. (Beyra, 2004)

Esta práctica está asociada en muchos casos al conocimiento ancestral, no obstante faltan estudios químicos y clínicos que confirmen de forma incuestionable los efectos fisiológicos de las plantas.

Su utilidad radica en que pueden ser la respuesta natural a algunas enfermedades y por lo general pueden adquirirse fácilmente.

Considerando que el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente, su actividad antimicrobiana puede ser evaluada con la CMI que se define como la concentración mínima requerida de AE para frenar el crecimiento del microorganismo (propiedades bactericidas o fungicidas). (Smith, 1998)

La actividad antimicrobiana depende principalmente de 3 características; carácter hidrófobo, componentes químicos y el tipo de microorganismo al que debe atacar. (Kalemba, 2003)

La utilidad y el potencial de las actividades antioxidantes y antimicrobianas en los aceites esenciales.

La elección investigativa del aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* se basó en la necesidad de complementar el trabajo realizado con el rizoma de la planta por Almeida y Suárez en el año 2014, encontrando similitudes tanto en la caracterización físico química como en la actividad biológica.

Así, en la investigación precedente uno de los compuestos químicos hallado con un porcentaje elevado fue el *Neoridol*, mostrándose la presencia del mismo compuesto en la investigación reciente. La actividad antimicrobiana fue elevada para bacterias Gram (+), en ambas investigaciones.

Las diferentes plantas medicinales tienen una contribución importante en el sistema de salud de muchas comunidades locales, ya que son usadas de manera frecuente por la mayoría de la población rural. Éstas, desempeñan un papel dominante en el desarrollo y en la investigación experimental, por lo tanto sirven como punto de partida para la producción e innovación de fármacos.

El 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica. (Berdonces, 1995).

Es prioritario investigar sobre medicina tradicional con los recursos disponibles en el país para conseguir un aprovechamiento y uso de la misma con un respaldo científico sólido.

## **CAPITULO 1 ANTECEDENTES**

### **1.1. Justificación**

El conocimiento ancestral de las plantas medicinales en el Ecuador, está inmerso en la cotidianidad de los habitantes.

En la actualidad, gracias a los avances en investigaciones se ha podido determinar la actividad biológica, usos y demás beneficios de las especies que podemos encontrar en los bosques de nuestro país (Vargas, 2002).

La familia *Zingiberaceae*, es la más grande del orden Zingiberales, consiste aproximadamente de 50 géneros y 1000 especies. Las especies que comprende esta familia, a nivel químico se caracterizan por la biosíntesis de fenilpropanoides y curcuminas, todos son compuestos fuertemente aromáticos y consecuentemente al cortar una parte de estas plantas o macerar sus hojas, los tejidos expiden un olor característico. (De La Torre, 2008).

El estudio taxonómico de la familia es difícil en virtud de sus flores efímeras y su clasificación aún es imperfecta. Muchas plantas pertenecientes a esta familia contienen aceites esenciales. Tienen importancia económica, como la raíz de jengibre (*Zingiber officinale*) y se usa como saborizantes de vinos, cervezas, refrescos (Vovides, 1993).

Oliva en su trabajo investigativo menciona que la composición del aceite está determinada por el lugar donde crecen las plantas, la época de cosecha, la morfología, el genotipo, quimiotipo, entre otros. Químicamente los aceites esenciales consisten en gran medida en mezclas de lípidos sencillos llamados terpenos. Estructuralmente están constituidos por la unión de dos o más unidades de isopreno y se clasifican según el número de monoterpenos y sesquiterpenos que poseen.

La producción, acumulación, emisión y/o secreción de grandes cantidades de aceites esenciales depende de estructuras anatómicas especializadas tales como tricomas glandulares, cavidades secretorias de las hojas y epidermas glandulares de los pétalos. Los aceites esenciales han demostrado tener destacadas propiedades funcionales en beneficio de la salud del hombre pudiendo jugar un rol muy

importante en el agregado a productos alimenticios y como quimioterápicos en enfermedades de origen humano y animal. Entre las propiedades descritas se encuentran: actividad antitumorigénica, citoprotección gástrica, antioxidante, antiinflamatoria, antiparasitaria, sedativa, antidepresiva, herbicida, pesticida y antimicrobiana contra hongos, bacterias, virus y protozoos. (Oliva, 2006).

Los antioxidantes son compuestos químicos que tienen la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación, principalmente los compuestos pertenecientes a tocoferoles e isoflavonas. (Badui, 1999).

El uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebro vasculares y enfermedades neurodegenerativas (Kuskoski, 2004).

Los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas. Sin embargo, su mecanismo de acción no está definido.

La mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos presentes en los alimentos; por su implicación en infecciones tóxicas alimentarias, la alteración de las propiedades organolépticas y de conservación de los alimentos. (Zekaria, 2010)

El presente estudio, fue desarrollado buscando cimentar las bases sobre las cuales se construya una línea de investigación, cuyo fin sea indagar sobre los aceites esenciales de plantas dentro de géneros que han sido poco estudiados, pero que presentan un gran potencial biológico de acuerdo con el uso que se le ha dado por parte de comunidades indígenas como los como sucede con el género.

Es por ello que esta investigación se enfoca en el análisis de las características físicas, químicas y actividad biológica, antioxidante, antibacteriana y antifúngica del aceite esencial obtenido de las hojas de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*, siendo este estudio un precedente para futuras investigaciones.

## **1.2. Hipótesis**

### **Alternativa:**

Al menos una concentración de AE de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* tiene actividad antioxidante, antimicrobiana y antifúngica.

### **Nula:**

Ninguna concentración de AE de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* tiene actividad antioxidante y antifúngica.

## **1.3. Objetivos**

### **Objetivo general:**

Caracterizar la composición química y determinar la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*.

### **Objetivos específicos**

- Obtener el aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* mediante destilación por arrastre de vapor en muestras colectadas en la provincia de Morona Santiago.
- Determinar las propiedades físicas el AE obtenido.
- Caracterizar la composición química del AE por el método de cromatografía de gases acoplada a masas y resonancia magnética nuclear.
- Evaluar la actividad antioxidante del AE por los métodos: espectrofotométrico de reducción del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) y azinobis 3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico (ABTS).
- Evaluar la actividad antimicrobiana del AE mediante el método de difusión de disco en bacterias: Gram (+), Gram (-) y levaduras.

## CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1. Especie vegetal:

*Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*

#### 2.1.1. Taxonomía

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Renealmia thyrsoidea*

Clasificación taxonómica	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Zingiberales
<b>Familia</b>	Zingiberaceae
<b>Genero</b>	Renealmia
<b>Especie</b>	<i>Renealmia thyrsoidea</i>
<b>Subespecie</b>	<i>Thyrsoidea</i>

*Nota:* La Etnobotánica de los indios. Cultura Amazónica

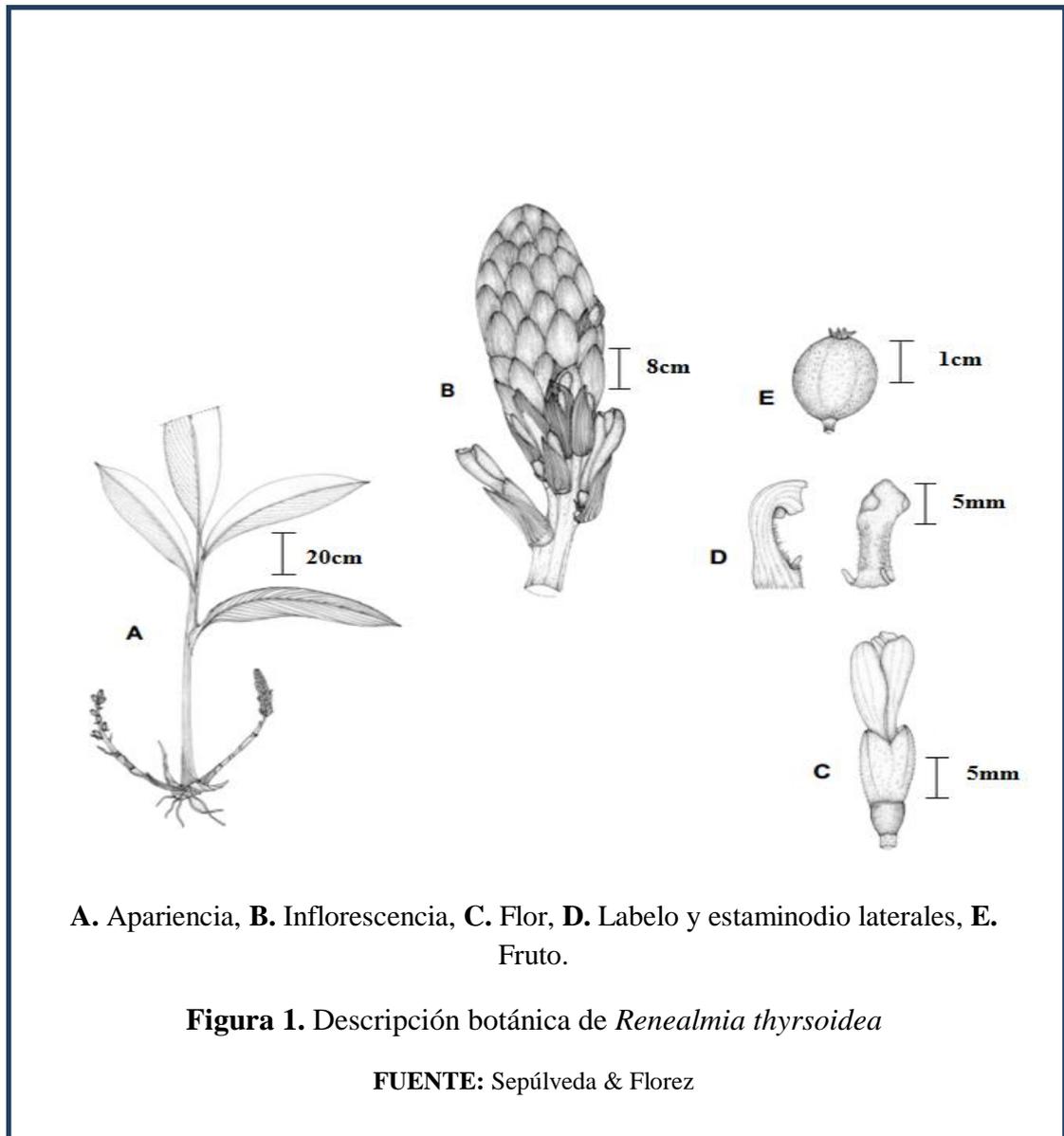
Nombres comunes: Shiwankumuyu (kichwa).

En la Amazonía peruana se conoce popularmente como “misquipanga”, las hojas son utilizadas como envoltura de alimentos y los frutos como colorantes, en Ecuador se conoce como “sanjuán” en la provincia de Morona Santiago y los frutos son empleados para teñir madera en Costa Rica.

#### 2.1.2. Descripción

Plantas de 1-5 m de altura. Hoja: Pecíolo 0-30 mm de largo. Lámina estrechamente elíptica, cuneada en la base, acuminada en el ápice (5-15 mm de largo), 20-90 cm de largo, 5-22 cm de ancho, escasamente cubierta con pelos ahorquillados (hasta 0,2 mm de largo). El tronco es erguido, 8-80 cm de largo. Inflorescencia de 7-30 cm de largo y 3-6 cm, racimo basal. Las brácteas de color rojo, rosa, naranja-rojo (o rara vez de color amarillo), que varía de forma amplia, ovadas a estrechamente triangulares, obtusos a agudos, 10-50 mm de largo, 3-35 mm de ancho. Pedúnculos de 1-2 (-5) mm de largo. Bractéolas en forma de copa, 5-16 (-20) mm de largo. Cáliz de color rojo a rojo-anaranjado, tubular, 9-17 (-23) mm de largo, 5-11 mm de ancho, 5 lóbulos deltados superficialmente triangular, 3-5 mm de largo. Corola de color amarillo a naranja, 19-33 mm de largo. Cápsula (verde) de color rojo, con

vencimiento negro-púrpura, globosa a elipsoidal, 15-45 x 7-25 (- 35) mm de ancho (Maas, 1976).



### 2.1.3. Hábitat

Hierba terrestre en bosques perennifolios. Puede crecer a una altitud entre los 800 y 2000 msnm. Cultivada principalmente por la etnia Tsa'chi (DE LA TORRE, 2008). Algunas especies de *Renealmia* se encuentran en los Andes en elevaciones superiores a 2500 metros (Stevenson, 2004).

#### **2.1.4. Distribución**

Es una especie ampliamente distribuida en América tropical. (Red Nacional de Jardines Botánicos, 2008).

Las especies de *Renealmia* se encuentran confinadas principalmente a bosques de zonas costeras, áreas montañosas, sitios húmedos o pantanosos y bosques secundarios, algunas especies son comunes en áreas ribereñas. La distribución de *Renealmia* se extiende desde el nivel del mar hasta 2500 m, ciertas especies se pueden encontrar en elevaciones entre 2400 y 3000 m y otras están localizadas a altitudes por debajo de 1500 m.

Se distribuye en bosques subandinos de Costa Rica, Panamá, Trinidad, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, extendiéndose al interior de la Amazonia. (Maas, 1977)

En Ecuador se encuentra en las siguientes provincias: Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe (Maas, 1976).

#### **2.1.5. Usos de *Renealmia thyrsoides* (Shiwuancu muyu)**

Medicinalmente el Shiwuancu muyu se usa para tratar resfriados y el dolor de huesos. El rizoma se utiliza para tratar el dolor de cabeza (Kichwa del Oriente-Sucumbíos). El rizoma y el tallo son eficaces en el tratamiento de picaduras de alacranes y hormigas conga (*Paraponera spp.*), así como para detener la hemorragia interna causada por el veneno de la mordedura de serpientes (Wao-Napo, Orellana). Las hojas se aplican con sebo caliente sobre la parte hinchada y adolorida de las muelas. Los brotes, molidos y mezclados con sebo sobre una hoja, a manera de emplasto, se aplican para tratar tumores y que se expulse la secreción originada (Mestiza-Pichincha). Las vaporizaciones de la planta entera hervida o las hojas combaten la hinchazón causada por la mordedura de serpiente (Kichwa de Oriente-Orellana). Como alimento se usa el arilo, pues este es comestible cocido y con sal (Mestiza-Pichincha; Secoya, Siona-Sucumbíos; Shuar-Morona Santiago). Otro importante uso que se le puede atribuir a la planta es como aditivo de los alimentos, el mismo arilo naranja que rodea a las semillas se usa para colorear las comidas. Las hojas son utilizadas en la preparación de alimentos (Secoya, Siona-Sucumbíos; Shuar-Napo) también son usadas para servir y envolver la comida que se va a cocinar, como pescado, carnes u hongos (Kichwa del Oriente-Orellana, Pastaza). Además, partes como el fruto manchado es utilizado como colorante (pintura negra)

(Kichwa del Oriente, Wao-Orellana). En el Napo con el fruto se pintan zapatos de color negro. Con las semillas se elaboran artesanías (Kichwa del Oriente, Shuar-Pastaza). En el ámbito social las hojas y el tallo son frotados en el cuerpo para curar el “espanto” (Mestiza-Pichincha) (De La Torre, 2008).

#### **2.1.6. Otras investigaciones**

Coronel y Piedra para identificar las propiedades físicas y composición química del aceite esencial del rizoma de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*, realizaron una destilación por arrastre de vapor de agua, obteniendo un porcentaje de rendimiento del 0,047%.

Desarrollaron una serie de análisis para la identificar de la composición química del aceite como: cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas, cromatografía de capa fina, que posibilitaron la obtención de un fingerprint y el aislamiento de ciertos compuestos químicos, además de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  para confirmar compuestos mayoritarios. De *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* se hallaron compuestos monoterpénicos como terpinoleno ( $30,56 \pm 2,19\%$ ),  $\alpha$ -felandreno ( $17,556 \pm 2,36\%$ ),  $\gamma$ -terpineno ( $7,670 \pm 0,46\%$ ).

En 2014 Almeida y Suárez realizaron un estudio previo de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*, obteniendo como resultados que el aceite esencial de *Renalmia thyrsoidea* subsp. *thyrsoidea* presentó inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC6538PTM, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y mayor actividad frente a las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida tropicalis* ATCC 13803.

Con la ayuda de los ensayos de DPPH y ABTS determinaron la actividad antioxidante del aceite esencial. Conforme a los resultados obtenidos el aceite esencial presento mayor actividad antioxidante frente al método del radical DPPH con un valor de IC50 de 17,101 mg/mL.

#### **2.2. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas mediante destilación en corriente de vapor o por expresión del material vegetal. Proviene

fundamentalmente del metabolismo secundario de los vegetales superiores en los que ejercen funciones de defensa y atracción. (Kiritsakis & Markakis, 1978)

Zekaria menciona que los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de la química orgánica: hidrocarburos (compuestos térpenicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles.

La concentración del compuesto concreto en el total de la mezcla de aceites de la planta puede ser muy variable.

Algunos estudios demuestran que los componentes de menor proporción tienen un papel crítico en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre ellos, de forma que el aceite esencial entero tiene una mayor actividad que la mezcla de sus principios activos mayoritarios. (Sies, 1997)

Los factores que influyen directamente en la composición de un aceite, son: el origen, la especie, el órgano de la planta, las condiciones climáticas y de crecimiento (temperatura, fertilizantes, tierra de cultivo, etc.) e incluso un cierto efecto en la madurez de la planta, así como la destilación, la forma de almacenamiento del aceite. (Zekaria, 2010)

### **2.2.1. Acción farmacológica de los aceites esenciales**

Desde el punto de vista farmacológico, las propiedades de los aceites esenciales son muy variables debido a la heterogeneidad de sus componentes. Algunas de las moléculas presentes en los aceites esenciales de ciertas plantas poseen gran interés terapéutico.

Algunos aceites esenciales se utilizan en farmacia para la obtención de diversos principios activos (anetol, eugenol) o como excipientes y aromatizantes en la preparación de jarabes, suspensiones, elixires y otras formas farmacéuticas.

Entre las acciones farmacológicas de los aceites esenciales más destacables son las siguientes:

**Aceites esenciales antisépticos:** Se aplican a un tejido vivo o sobre la piel para reducir la posibilidad de infección. Los aceites con esta propiedad son los extraídos de: tomillo, lavanda y orégano.

Aceites esenciales utilizados como bactericidas: este aceite tiene la capacidad de producir la muerte a ciertas bacterias los aceites con esta propiedad son los de: Limoncillo, Citronella.

Aceites esenciales antivirales: estos aceites Pueden llegar a detener el desarrollo viral, por su acción inmunoestimulante; los aceites con esta propiedad son los extraídos de: tomillo y eucalipto.

Aceites relajantes y calmantes: actúan sobre el sistema nervioso, alivian el estrés y armonizan el ánimo. Los aceites con esta propiedad son los extraídos de: mandarina, naranja dulce y manzanilla romana.

Aceites para el bienestar muscular: estos aceites esenciales con acción antiinflamatoria, alivian el dolor en los traumatismos articulares y musculares. Los aceites con esta propiedad son los extraídos de: albahaca, enebro, eucalipto y jengibre. (Rivas & Pino, 2011)

### **2.2.2. Importancia económica de los aceites esenciales**

Se conocen alrededor de 3000 tipos de AE, aunque sólo 300 tienen importancia comercial, además se puede afirmar que a escala mundial, los 18 AE más importantes representan casi el 50% del total del valor. (FAO, 2011)

#### **Industria alimentaria**

Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el Cilantro, Naranja y Menta, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad podemos citar las esencias extraídas del naranjo, limón, mentas e hinojo, entre otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas. (Muñoz, 2002).

#### **Industria farmacéutica**

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucalipto es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros). (Muñoz, 2002).

### **Industria de cosméticos**

Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda, rosas y pachouli. (Muñoz, 2002).

### **Industria de productos de uso veterinario**

Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. También requiere limoneno y mentol como insecticidas. (Muñoz, 2002).

### **Desodorantes industriales**

Actualmente se ha desarrollado el uso de esencias para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. La industria de las pinturas emplea limoneno como disolvente biodegradable. También se imparte olor a juguetes. En textiles, como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido. En papelería, para impregnar de fragancias cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales. (Muñoz, 2002).

### **Industria tabacalera**

Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.

### **Biocidas e insecticidas**

Existen esencias con propiedades bactericidas, como el tomillo, clavo, salvia, mentas, orégano, pino, etc.

Otras son insecticidas, contra:

- Hormigas: menta, tanacetum y poleo.
- Áfidos: ajo, coriandro, anís, albahaca.
- Pulgas: lavanda, mentas, lemongras.
- Moscas: ruda, citronela, menta.
- Piojos: menta, albahaca, ruda.
- Polilla: menta, hisopo, romero, eneldo.
- Coleópteros: tanacetum, comino, ajeno y tomillo.
- Cucarachas: menta, ajeno, eucalipto, laurel.

- Nemátodos: tagetes, salvia, caléndula. (Muñoz, 2002).

### 2.2.3. Extracción de aceites esenciales

La forma de extracción debe proteger al aceite de cualquier tipo de degradación, preservando sus componentes menores, que contribuyen significativamente a su calidad y a su buena conservación. (Kiritsakis & Markakis, 1978). Como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Destilación por arrastre de vapor

**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

Mayoritariamente los aceites esenciales son extraídos por destilación por arrastre de vapor. (Noriega, 2009)

Lamarque expone que éste es el método más antiguo y sencillo para obtener aceites esenciales a partir de material vegetal fresco. Permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídas por otros métodos. El equipo para realizar esta operación consta de un recipiente con agua, una

cámara de extracción y un brazo lateral colector, unido por un lado a un refrigerante y por otro al destilador propiamente dicho. El material vegetal se corta en trozos pequeños y se coloca en la cámara de extracción, se calienta el agua hasta ebullición y se mantiene el hervor durante una hora; observándose la condensación de dos fases líquidas que posteriormente son retiradas y separadas.

En las destilaciones más comunes, la fase acuosa lleva disueltas sustancias de bajo peso molecular y cantidades variables de los principales componentes de la esencia. Para recuperarlas, se coloca esta fase acuosa en una ampolla de decantación y se extrae con hexano u otro disolvente orgánico de bajo punto de ebullición.

### **2.3. Propiedades físicas**

#### **2.3.1. Índice de refracción**

Puede ser definido como la relación de la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el medio en cuestión. Esta característica se presenta como una forma simple y exacta para determinar el grado de pureza de una grasa. El índice de refracción puede ser obtenido en algún tipo de refractómetro, la lectura se realiza normalmente a 40°C o en su defecto se hace una corrección a la temperatura a la que se efectúa la medición, multiplicando la constante 0,000365 por cada grado Celsius de cambio en la temperatura normal de la lectura. . (Herrera, 2003, p. 28).

#### **2.3.2. Índice de acidez**

Se define como el número de miligramos de hidróxido de sodio requeridos para neutralizar la acidez libre por gramo de muestra. El índice de acidez es una medida del grado de descomposición del aceite o de la grasa, por acción de las lipasas o por alguna otra causa. La descomposición se acelera por la luz y el calor. (Herrera, 2003, p. 28).

#### **2.3.3. Densidad**

La determinación de este parámetro que coincide con el peso específico relativo (definido como el reporte entre la masa de un cierto volumen de sustancia y la masa de un volumen igual de la sustancia de referencia, que generalmente es el agua).

Provee de una importante información sobre el grado de autenticidad del aceite esencial. (Herrera, 2003, p. 29).

#### **2.4. Determinación de la composición química de aceites esenciales**

Guarnizo menciona que la composición química de los aceites esenciales depende de varios factores como: el origen botánico (la especie y la raza química de las que proceden), el ciclo del vegetal (la composición y la proporción varían según la fase del ciclo vegetativo), las condiciones ambientales, las características del cultivo (suelo riego, abonos, etc.) y el procedimiento de obtención, ya que durante el mismo se puede alterar la composición del aceite esencial respecto al vegetal.

Los compuestos presentes en los aceites esenciales se pueden clasificar en: terpenoides y no terpenoides.

Los componentes de los aceites esenciales se encuentran a menudo en las glándulas o espacios intercelulares en el tejido de las plantas. Por lo demás a menudo se concentran en las semillas, flores, hojas o frutos.

Los aceites esenciales con una mezcla compleja que contiene alrededor de 20 a 60 componentes a diferente concentración. Éstos son caracterizados por dos o tres componentes mayoritarios, usualmente oxigenados, con una concentración entre 20% y 70% comparados con el resto de componentes con mucha menor proporción. Por ejemplo el linalool (36%) y el acetato de linalilo (22%) en la *Lavandula angustifolia* (lavanda), carvacol (30%) y el timol (27%) son los componentes mayoritarios del aceite esencial del *Origanum compactum* (orégano), el mentol (59%) y mentona (19%) del aceite esencial de la *Mentha piperita*.

#### **Terpenoides**

Los compuestos terpénicos proceden de la condensación del isopreno (C<sub>5</sub>) y pueden tener o no oxígeno. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos (C<sub>10</sub>) y sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), que pueden ser aromáticos o alifáticos. Los que poseen oxígeno son terpenos funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter o peróxido (Kuklinski, 2000).

#### **Monoterpenos**

Casi siempre se encuentran hidrocarburos. Estos pueden ser acíclicos (mirceno, ocimeno), monocíclicos ( $\alpha$ - y  $\gamma$ - terpineno,  $\rho$ -cimeno) o bicíclicos (pinenos,

canfeno, sabineno). A veces constituyen más del 90 % del aceite esencial: (Citrus, trementinas) (Bruneton, 2001).

### **Sesquiterpenos**

La estructura de los sesquiterpenos C<sub>15</sub> (H), se basa en tres unidades de isopreno. Estas moléculas se pueden unir formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas abiertas y sistemas cíclicos (Beyer & Wolfgang, 1987).

### **No terpenoides**

Los no terpenoides pueden ser: sustancias alifáticas (hidrocarburos), sustancias volátiles aromáticas (derivados cumarínicos), sustancias nitrogenadas (aminas alifáticas volátiles), sustancias con azufre (contienen isotiocianatos, sulfuros o disulfuros) (Kuklinski, 2000).

#### **2.4.1. Método de cromatografía de gases acoplada a masas.**

Según Sharapin:

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS). Es un método muy adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes debidas a pretratamiento. No se eliminan las alteraciones debidas a la temperatura de análisis, que puede afectar componentes termosensibles. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, tras lo cual penetran en el espectrómetro de masas, que permite registrar el correspondiente espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite esencial se identifican gracias a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas. La GC/MS permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 µL, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo

exacto de la muestra. Es posible determinar índices de retención en el GC/MS, pero estos pueden no ser comparables con los bibliográficos, que generalmente se han obtenido con cromatógrafos no acoplados a un espectrómetro.

La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) es utilizada comúnmente para la separación y la identificación de la composición química de aceites esenciales, ha tenido un avance considerable, al punto de ser utilizada como rutina en varios laboratorios.

El estudio de la influencia del ciclo vegetativo en la producción de los aceites esenciales es un ejemplo de su aplicación ya que permite determinar la composición química del aceite en función del metabolismo vegetativo de la planta, además de evidenciar un eventual polimorfismo y, como consecuencia de estos resultados, el productor local de estos aceites esenciales, puede determinar el período correcto para la obtención de un producto de composición y calidad constante, con rendimientos óptimos.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) permite la identificación de la mayoría de los compuestos en el orden de microgramos. Esta técnica asocia la separación cromatográfica en la fase gaseosa a una detección extremadamente sensible y específica de la espectrometría de masas. De esta manera, los compuestos separados por CG son transferidos al espectrómetro de masas por el gas que se disociará en fragmentos iónicos que serán analizados de manera cualitativa. Se obtiene un espectro de masas característico de la sustancia fragmentada que permite su identificación a partir de la comparación con una base de datos espectrales

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. (Gutiérrez, 2002).

#### **2.4.1.1. Espectrometría de masas**

Albarracín menciona que:

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se realiza con base en sus espectros de masas (MS), obtenidos por impacto electrónico y/o por ionización química.

Varios analizadores másicos (magnético, cuadrupolar, de trampa iónica) se utilizan en espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos de gases. En los últimos años los detectores de trampa iónica se emplean cada vez con más frecuencia en los estudios de mezclas complejas, incluyendo los aceites esenciales, sobre todo cuando se requiere alta sensibilidad en los análisis. En un espectro de masas, se observa, en abscisas, la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones formados al fragmentarse la molécula y en las ordenadas, la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones formados. Dado que la carga suele ser unitaria,  $m/z$  corresponde generalmente a la masa de los fragmentos iónicos. Las masas de los iones formados a partir de los terpenos, principales constituyentes de los aceites esenciales, son bastante parecidas. Sin embargo difieren en su abundancia lo cual permite su identificación.

#### 2.4.1.2. Índice de Kovats

Kovats, propuso un sistema de índices de retención que sirve como base para el análisis cualitativo de los componentes de mezclas complejas (identificación tentativa). El sistema de los índices de retención de Kovats se basa en una comparación entre la posición del pico de un analito en el cromatograma y los picos correspondientes a hidrocarburos lineales, uno de los cuales eluye antes del componente de interés y el otro después, utilizando la siguiente relación matemática para calcularlos, en el caso de que sea una corrida cromatográfica con programación de temperatura. (Ariza, 2008).

Donde:

$$I^t = 100 \left[ \frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right] + N$$

$I^t$  = Índice de retención de temperatura programada análisis GC, velocidad de calentamiento constante.

$t_{Ri}^T$  = Tiempo de retención ajustado del pico de la muestra.

$t_{Rz}^T$  = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.

$t_{R(z+1)}^T$  = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente después del pico de la muestra.

$Z$  = Número de carbonos de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.

$N$  = Número de carbonos C-10 al C-30.

Según Garay:

Es el término relativo más utilizado con fines cualitativos en GC, ya que presenta la gran ventaja de ser muy reproducible. Consiste en relacionar el tiempo de retención ajustado del soluto que se desea identificar con los de una serie homólogo de hidrocarburos saturados que se utiliza como referencia. Para ello se cromatografía dicho soluto con la mezcla patrón de hidrocarburos cuyos tiempos de retención son próximos a los del soluto.

Se eligen los tiempos de retención ajustados de los dos picos que flanquean al del problema, que corresponderán a los hidrocarburos que contienen  $z$  y  $z+1$  átomos de carbono.

Los tiempos de retención son muy variables de acuerdo a la columna y temperaturas empleadas los índices de retención son bastante independientes de las condiciones de la cromatografía. Esto permite que existan tablas de índices de retención para miles de compuestos lo cual facilita la identificación de incógnitas. Por supuesto, no es infalible ni es una prueba determinante de identidad química.

En estudios químicos realizados al aceite esencial del fruto de Lineo (noni) los compuestos fueron identificados por comparación de sus IK relativos a C5-C29 n-alcenos obtenidos en una columna apolar DB-5 con los proporcionados en la literatura, por comparación de sus espectros de masas de la NIST 08 (Natural Institute of Standards and Technology).

Según Calle, al realizar el control de la germinación in vitro de *Araujia sericifera* con aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Myrtus communis*, *Citrus sinensis* y *Citrus limón*, se logró identificar un total de 51 compuestos hallados en el aceite esencial de naranjo, siendo clasificados por grupos químicos y ordenados según su índice de

Kovats (IK). El porcentaje total de la composición del aceite identificado fue de 99,40%.

Leyva en su investigación menciona que para determinar los índices de Kovats en la variación anual de la composición química del aceite esencial de flores de Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) fueron determinados en una columna capilar DB-5MS 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm con fase estacionaria de 5% de poli (metilsiloxano) y en una columna DB-WAX 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm, con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de polietilenglicol.

#### **2.4.2. Resonancia Magnética Nuclear**

Guarnizo menciona que:

La espectrometría de masas permite determinar la fórmula molecular y, por análisis del patrón de fragmentaciones, adquirir información acerca del esqueleto carbonado.

La resonancia magnética nuclear puede proporcionar también detalles más sutiles de la estructura molecular, como son los ángulos de enlace o las densidades electrónicas. Dado que la técnica puede emplearse con facilidad a bajas temperaturas, resulta posible estudiar moléculas que son inestables o muy reactivas a temperatura ambiente.

Por medio de la RMN, pueden examinarse los equilibrios conformacionales, incluso en las moléculas complejas de importancia biológica.

La actividad biológica depende frecuentemente de la posibilidad de adaptación de una determinada conformación de un compuesto sobre un centro concreto de una enzima.

Según Carda, algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos.

La técnica se ha empleado en química orgánica, inorgánica, y bioquímica. La misma tecnología ha sido extendida a otros campos por ejemplo en medicina, en el que se obtienen imágenes por resonancia magnética.

En el análisis de la composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo) el germacreno D fue aislado por cromatografía en capa fina preparativa en una placa TLC 20x20 cm de gel de sílica 60F254, marca Merck;  $R_f = 0,80$ . La fase móvil utilizada fue n-hexano. (Noriega, 2014)

Gaydou, empleó técnicas espectroscópicas combinadas de GC-MS, espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , logrando identificar 52 compuestos como posibles componentes del aceite de ylang-ylang de Madagascar. Además comparó la composición química de 44 muestras de aceites de Madagascar de primera, segunda y tercera clase comercial. La composición química del aceite varía con la maduración de la flor, el pH de extracción y las diferentes técnicas de extracción.

#### **2.4.2.1. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear** (Bruix, 2005)

Un espectrómetro de RMN está compuesto por diferentes partes. Las funciones básicas del espectrómetro se podrían resumir en tres puntos.

- a) Generación de las radiofrecuencias (rf) adecuadas en amplitud, frecuencia y fase.
- b) La dirección de estas rf a la muestra en el momento adecuado con un programador de pulsos.
- c) La detección de la respuesta del sistema de una forma eficaz. Para ello, básicamente es necesaria la presencia de un imán, una bobina y un sistema de transmisión-recepción de radiofrecuencias, todo ello bajo el control de un ordenador.

#### **2.5. Actividad antioxidante**

Según Sies, la oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena, que dañan las células. Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhibiendo otras reacciones de oxidación, por ello se los conoce como agentes reductores.

Los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético, debido a que algunos son altamente inestables bajo las condiciones de trabajo y en ciertos casos causan efectos adversos. (Pokorny, 2001).

### **2.5.1. Actividad antioxidante de los aceites esenciales**

Foti menciona que se ha demostrado que el  $\alpha$ -terpineno, presente en varios aceites esenciales, actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoleico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste (HOO\*) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoleico. De tal forma que se disminuye la concentración de los radicales peróxido del ácido linoleico en el estado estacionario.

Adicionalmente se ha comprobado que algunos aceites esenciales y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de agrupar al catión-radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) ABTS<sup>+</sup> y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico (Stashenko, 2002)

Se reporta una "árnica" como *Heterotheca inuloides*, Asteráceas, cuyas flores contienen  $\beta$  cariofileno y otros terpenos con propiedades antioxidantes y citotóxicas, lo que sugiere su uso potencial para el tratamiento del cáncer. (Kubo, 1996).

En Australia el aceite esencial del árbol de té *Melaleuca alternifolia* (Mirtáceas) se le atribuyen propiedades contra el acné, forúnculos e infecciones por levaduras (Osborne, 1998).

Algunos antioxidantes se producen en el cuerpo y no son absorbidos en el intestino. Un ejemplo es el glutatión, que es producido a partir de aminoácidos. Mientras que cualquier glutatión en los intestinos es escindido para liberar cisteína, glicina y ácido glutámico antes de ser absorbido, incluso las dosis orales grandes tienen poco efecto en la concentración del glutatión en el cuerpo (Witschi, 1992).

El ubiquinol (coenzima Q) también se absorbe mal en los intestinos y es producido en el hombre por la ruta del mevalonato (Turunen, 2004).

Las moléculas más comunes atacadas por la oxidación son las grasas no saturadas; la oxidación las vuelve rancias (Robards, 1988).

Del Carlo menciona que los lípidos oxidados se decoloran a menudo y tienen un gusto desagradable tal como sabores metálicos o sulfurados, es importante evitar la oxidación de alimentos ricos en grasas. Así, estos alimentos son raramente preservados en seco; en su lugar son preservados ahumados, salados o fermentados. Los alimentos incluso menos grasos tales como frutas se rocían con los antioxidantes sulfurados antes del secado al aire. La oxidación es catalizada a menudo por los metales, que es la razón por la cual las grasas tales como la mantequilla nunca se deben envolver en papel de aluminio o mantener envases de metal. Algunos alimentos grasos tales como aceite de oliva son protegidos parcialmente contra la oxidación por su contenido natural de antioxidantes, pero siguen siendo sensibles a la foto oxidación.

### **2.5.2. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)**

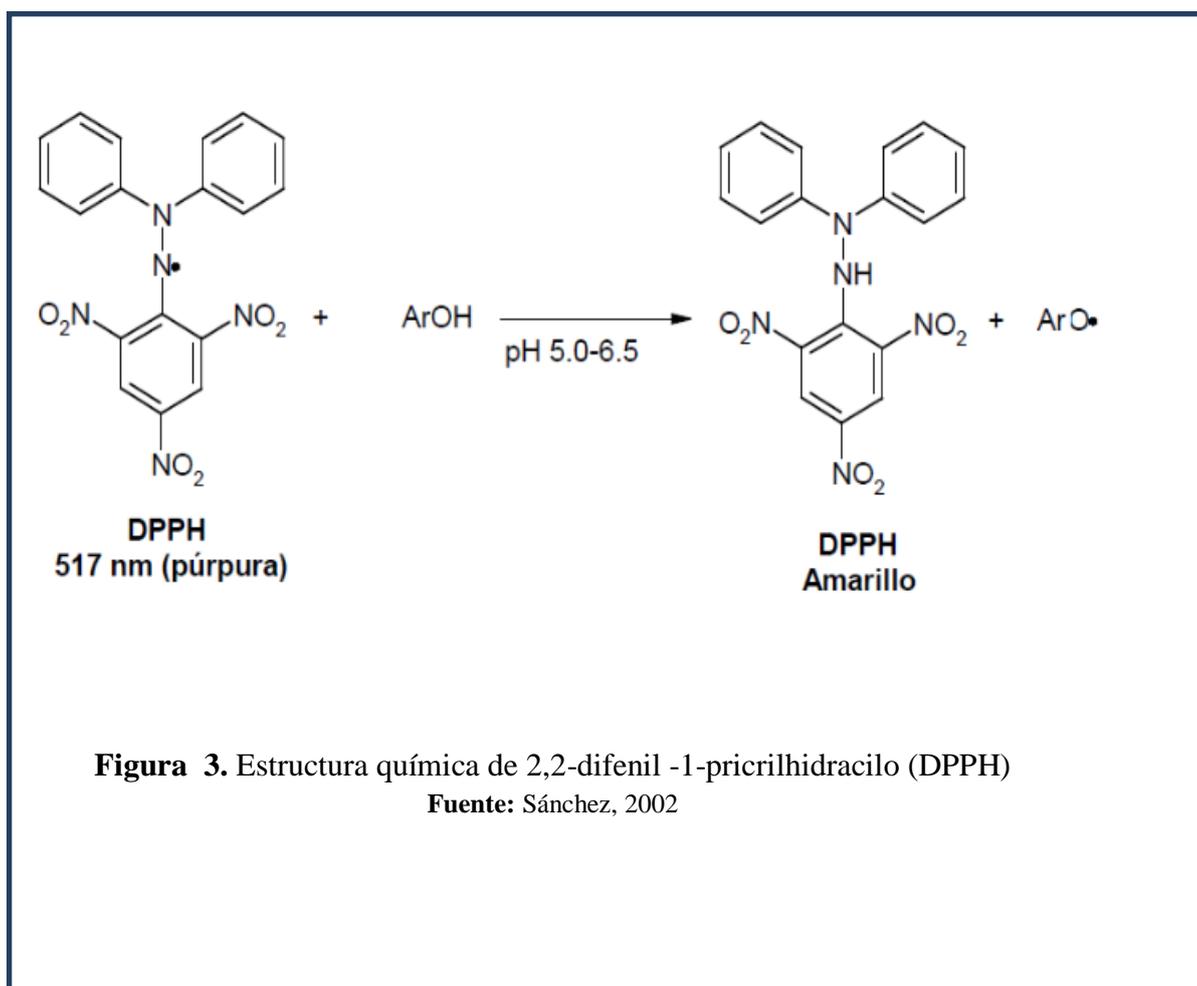
El método de DPPH es un ensayo colorimétrico simple basado en la disminución de la absorbancia del radical DPPH y en la estabilidad del mismo, la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520nm. Cuando una disolución DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical, se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida el color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia. Los resultados obtenidos por este método se reportan como porcentaje de inhibición (Molyneux, 2004).

El radical libre DPPH• como se muestra en el gráfico. 3 se reduce a la correspondiente hidrazina cuando reacciona con donantes de hidrógeno (Sánchez, 2002).

Recientemente, esta reacción se ha evaluado mediante el ensayo de decoloración, donde se mide la disminución en la absorbancia a 515-528 nm producidos por la adición del antioxidante a DPPH • en metanol o etanol (De La Rosa, 2010).

A partir de este porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra se obtiene el IC<sub>50</sub> definido como la cantidad de la muestra necesaria para disminuir en

un 50% la inhibición, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes capaces de reducir el 50% del radical DPPH (Gutiérrez, 2008).



**Figura 3.** Estructura química de 2,2-difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)

Fuente: Sánchez, 2002

### 2.5.3. Método ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico)

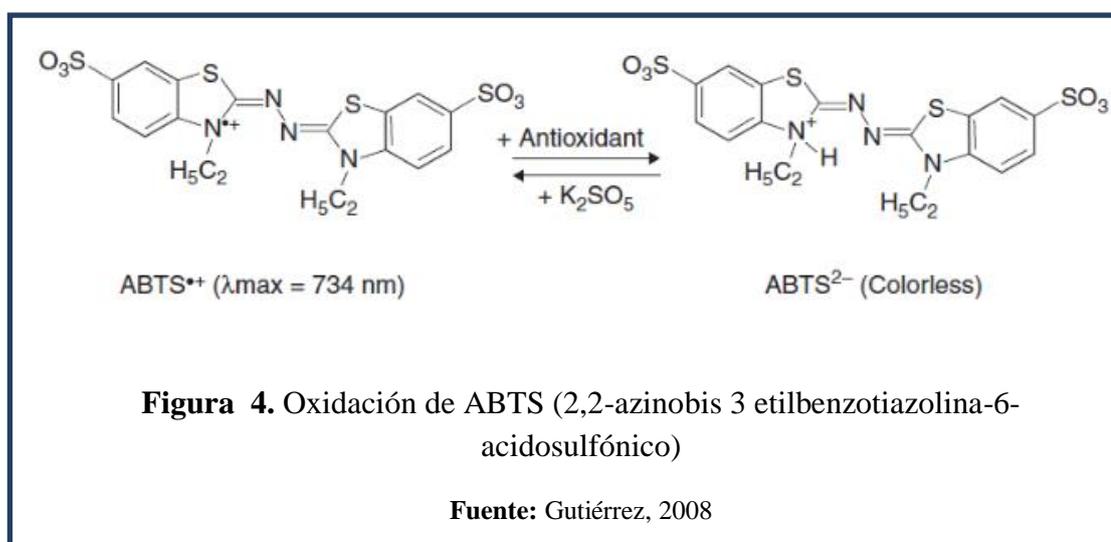
Kuskosi menciona que el método ABTS es una técnica que se usa para medir la capacidad antioxidante de un material biológico, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrofílica o lipofílica. Involucra un compuesto coloreado de naturaleza radical (radical ABTS<sup>\*+</sup>), con el fin de simular especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; de esta manera la presencia del antioxidante conduce a la desaparición de este radical coloreado.

El radical ABTS<sup>\*+</sup> debe ser generado mediante reacciones químicas (dióxido de magnesio, persulfato de sodio) o enzimáticas (peroxidasa, mioglobulina). Dicho radical, tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y orgánicos. El radical ABTS<sup>\*+</sup> es el más indicado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos

coloreados, como en el caso de las antocianinas, por presentar una absorbancia máxima próxima a la región infrarroja (754nm), reduciendo así, las posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de reacciones secundarias.

El radical  $ABTS^{*+}$  ha sido validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente a otros métodos de evaluación de capacidad antioxidante.

Gutiérrez menciona que a partir del porcentaje de inhibición versus la concentración de la muestra se obtiene el  $IC_{50}$ , definido como la cantidad de la muestra necesaria para disminuir en un 50 % la inhibición, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de reducir el 50 % del radical ABTS.



Mahecha manifiesta que el método ABTS ha sido ampliamente usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical  $ABTS^{*+}$  una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl]), pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm.

## **2.6. Análisis microbiológicos**

Reyes menciona que la actividad antimicrobiana de aceites esenciales extraídos de plantas y especias adicionadas en forma directa a sistemas modelo ha sido estudiada y evaluada contantemente durante los últimos años. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en fase vapor y su efectividad contra mohos, levaduras y bacterias empezó a investigarse recientemente; siendo aún escasos los aceites esenciales y los microorganismos evaluados.

En diferentes países existe una gran variedad de plantas y especias, las cuales tienen diferentes usos conforme a la cultura y costumbres de cada región. Muchas de estas plantas y especias se han relacionado con propiedades antimicrobianas. (Raybaudi, 2006).

De acuerdo a Tajkarimi, se han encontrado alrededor de 1340 plantas a las que se les han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se han identificado alrededor de 30000 componentes activos.

La composición de los aceites esenciales varía de acuerdo a las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004), y puesto que sus compuestos volátiles son los que presentan el efecto antimicrobiano, la determinación de su composición es fundamental. (Gómez, 2011).

Se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características; su carácter hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismo al que se debe atacar. (Kalemba, 2003).

Delaquis (2002) y Holley (2005) mencionan que los componentes fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. Por otro lado en las bacterias Gram (-) se ha observado mayor susceptibilidad a los AE a diferencia de las Gram (+) y aunque aún no se sabe exactamente la razón por la cual se da este hecho, (Smith, 1998) Fisher y Phillips (2008) reportan que la susceptibilidad de las bacterias Gram (-) puede estar relacionada con la membrana externa que poseen este tipo de bacterias, ya que la hidrofobicidad de la membrana le

hace impermeable, sin embargo, sólo hay un retardo del efecto por lo que sugieren que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias, se requeriría de un mayor periodo de tiempo de exposición a los aceites esenciales en los sistemas modelo. Esta sensibilidad de los diferentes tipos de bacterias solo se ha observado al utilizar AE en forma in vitro.

### 2.6.1. Cepas Evaluadas

Los análisis serán realizados en cepas de bacterias Bacterias Gram (-) *Escherichiacoli* ATCC8739<sup>TM</sup>, *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027<sup>TM</sup>; Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC6538P<sup>TM</sup>, *Streptococcus mutans* ATCC25175; y Levaduras *Candida albicans* ATCC10231, *Candida tropicalis* ATCC13803.

#### Bacterias gram negativas:

##### *Escherichia coli*

Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, denominándose como un organismo ubicuo.

Es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo. (Montoya, 2008)

Las especies de *E. coli* son parte normal de la flora intestinal, y casi todas se consideran comensales en ese lugar. Son potencialmente patógenas en cualquier otra parte del cuerpo donde pueden producir infecciones piógenas.

Por tanto genera dos patologías, infección de tejidos del órgano o diarrea.

Las cepas que sintetizan exotoxinas las liberan sin destrucción celular, en cambio las endotoxinas con más virulentas. Cuando se producen los dos procesos en el mismo tiempo. (Centros Hospitalarios de alta resolución, 2006)

**Tabla 2.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Especie</b>	<i>Coli</i>

Nota: Viscafina, 2012

### *Pseudomona aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina.

*Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras pseudomonas fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono (Montoya, 2008).

La importancia clínica de *Pseudomona aeruginosa*, es bien conocida ya que es agente causal de otitis media, oftalmítis, infección de heridas bacteriuria, neumonía y bacteremia. Causa una alta mortalidad en los pacientes con compromiso inmunológico o aquellos que son sometidos a instrumentación o manipulaciones. (Villa, 1999)

**Tabla 3.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Pseudomonadales
<b>Familia</b>	Pseudomonadaceae
<b>Género</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Especie</b>	<i>Aeruginosa</i>

Nota: Encured, 2013

### **Bacterias gram positivas:**

#### *Staphylococcus aureus*

Conocido como estafilococo áureo, o comúnmente estafilococo dorado, es una bacteria anaerobiafacultativa, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada (Montoya, 2008).

**Tabla 4.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	Firmicutes
<b>Clase</b>	Bacilli
<b>Orden</b>	Bacillales
<b>Familia</b>	Staphylococcaceae
<b>Género</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Especie</b>	<i>Aureus</i>

Nota: Boderó, 2010

### *Streptococcus mutans*

Son bacterias gram positivas, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Es acidófilo porque vive en medio con pH bajo, acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por sintetizar ácidos a pesar de encontrarse en un medio de tales condiciones. (Montoya, 2008)

La patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* en un fenómeno complejo debido principalmente a la amplitud de factores de virulencia que puede expresar este microorganismo.

Aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente de la bacteria y un 30% lo es de manera intermitente. Puede además colonizar otras áreas tales como la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando la integridad de la barrera mecánica se rompe, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos y producir infección. (Pahissa, 2009)

**Tabla 5.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	Firmicutes
<b>Clase</b>	Bacilli
<b>Orden</b>	Lactobacillales
<b>Familia</b>	Streptococcaceae
<b>Género</b>	<i>Streptococcus</i>
<b>Especie</b>	<i>Mutans</i>

**Nota:** Vargas Chávez, Treviño, & Soto Sarellano, 2011

### **Levaduras:**

#### *Candida albicans*

Son hongos diploides asexuales (forma de levadura). Saprofitos de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentran en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Participan en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. (Santamarina, 1997).

La candida albicans es causante de la candidiasis pulmonar invasiva que es extraordinariamente rara, las infecciones bronquiales por candida son muy difíciles de diagnosticar con certeza por varias razones: el cultivo de candida en las muestras

de estupo no asegura la presencia de la misma en el tracto respiratorio inferior, ya que estupo podría estar contaminado por Candidas de la orofaringe. (Salcedo, 2000)

**Tabla 6.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Fungi</b>
<b>Clase</b>	Hemiascomycetes
<b>Orden</b>	Saccharomycetales
<b>Familia</b>	Saccharomycetaceae
<b>Género</b>	<i>Candida</i>
<b>Especie</b>	<i>Albicans</i>

Nota: Berkhout, 2002

### *Candida tropicalis*

Es una especie de levadura del género *Candida*. Existe como parte de la flora normal humana, es una levadura que participa en la fermentación de la glucosa y maltosa. Sin embargo no fermenta la lactosa ni hidroliza la urea y tiene resultados variables cuando se prueba en la fermentación de la sacarosa, galactosa y trehalosa. (Santamarina, 1997)

Las infecciones por *Candida tropicalis* son responsables de muchas infecciones hospitalarias, siendo la cuarta causa de bacteriemia nosocomial. Son frecuentes en las unidades de cuidados intensivos (UCI) en pacientes sometidos a numerosas maniobras invasivas y múltiples tratamientos antibióticos. (Castillo, 2004)

**Tabla 7.** Clasificación taxónomica

<b>Reino</b>	<b>Fungi</b>
<b>Clase</b>	Hemiascomycetes
<b>Orden</b>	Saccharomycetales
<b>Familia</b>	Saccharomycetaceae
<b>Género</b>	<i>Candida</i>
<b>Especie</b>	<i>Tropicalis</i>

Nota: Berkhout, 2002

### **2.6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana**

Para la evaluación antimicrobiana de aceites esenciales, se aplican generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. Hay dos técnicas básicas usadas para la valoración de ambas actividades, antibacteriales y antimicóticas de los aceites esenciales:

- El método de difusión en agar (pozo o disco de papel)
- El método de dilución (agar o caldo líquido).

Según Kalemba y Kinicka, las pruebas y evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad. Los cultivos de microorganismos se realizan en medios líquidos, bajo condiciones físicas óptimas para las especies individuales. Los microorganismos tienen que alcanzar una fase apropiada del crecimiento, y un número especificado de células tiene que ser utilizado para la prueba.

#### **2.6.2.1. Método de difusión en agar**

Omer, menciona que el método permite estimar el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos y sus cambios morfológicos de una manera simple. En las cajas de Petri con agar se inocula el microorganismo de prueba; existen dos métodos posibles para la incorporación del aceite esencial que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar.

Según Kalemba el aceite esencial no se usa a menudo en forma pura, generalmente se utilizan sus soluciones. Se preparan en cajas de Petri, soluciones del aceite esencial en diferentes concentraciones y los discos de papel son sometidos a inmersión. Las placas se almacenan durante algún tiempo para permitir que todos los componentes del aceite esencial se difundan dentro del agar, después se incuban. La eficacia del aceite esencial es demostrada por tamaño de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor del disco y se expresa generalmente como el diámetro de esta zona (milímetros o centímetros).

#### **2.6.2.2. Método de dilución**

Para Kalemba el método de dilución en serie en agar se utiliza para bacterias y hongos y su modificación con caldo líquido se usa solo para hongos. Los cultivos de agar se realizan en cajas de Petri o en tubos, mientras que los cultivos líquidos se realizan en frascos cónicos con un volumen de 100 ml de medio. Para el caldo líquido en frascos cónicos, el índice de crecimiento inhibitorio se calcula (% de los cambios en la biomasa del hongo comparando con el cultivo control).

Los resultados se pueden presentar de dos maneras:

El índice de inhibición de crecimiento definido como la proporción porcentual para el cultivo de crecimiento de control sin aceite esencial.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) o la máxima dilución inhibitoria (MID). La restricción en el crecimiento de los microorganismos (análisis de la actividad bacteriostática y fungistática) o la concentración mínima letal (MLC) (análisis de la actividad bactericida y fungicida).

### **2.6.3. Concentración Mínima Inhibitoria**

Los métodos más utilizados para la determinación de la CMI son los de dilución, pueden realizarse en medio sólido (dilución en agar) o en medio líquido (dilución en caldo) (Gamazo, 2005).

Según Burt, el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente su actividad antimicrobiana puede ser evaluada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo (propiedades bacteriostáticas y fungistáticas o la concentración mínima letal que asegure la reducción del 99,9% de la población del microorganismo (propiedades bactericidas y fungicida).

Zekaria menciona, en cuanto a los estudios in vitro, analizando en el laboratorio muestras precedentes del campo se han podido detectar CMIs relativamente bajas frente a diferentes agentes. Evaluando recientemente las CMI frente a varias cepas de campo de *E. coli*, *S. thypimurium*, *S. enteriditis*, *S. choleraesuis* y *S. pullorum-gallinarum*, todas las cepas resultaron sensibles a los aceites estudiados a  $CMI \geq 20$  mg/mL (concentración final), no observándose diferencias significativas en función de la bacteria y cepas estudiadas. Se observó una notable sensibilidad de las diferentes cepas de *S. typhimurium*, cuyo crecimiento fue inhibido por los aceites de canela, clavo y orégano a concentraciones menores de 2,5 mg/mL.

## **CAPÍTULO 3**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. Elección de la especie vegetal**

La especie vegetal *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* se seleccionó considerando lo siguiente:

- Etnobotánica de la especie. Conocimientos ancestrales de las etnias de la Región Amazónica.
- Escasos estudios e investigaciones realizadas con la especie.
- Factibilidad en el proceso de recolección de las hojas.

##### **3.1.1. Condiciones de las muestras y de la zona de recolección**

Las hojas frescas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* fueron recolectadas en la comunidad San Luis de Inimkis, parroquia Sevilla de Don Bosco, cantón Macas, provincia de Morona Santiago, con las siguientes coordenadas geográficas: 02° 26´ Latitud Sur y 78° 11´ Longitud Oeste; a una altitud de 1070 msnm.

El suelo donde crecen los arbustos de *Renealmia thyrsoidea* tiene características poco aluviales, muy poco profundos, escasamente fértiles, pardo oscuros; capa arable de 10 a 25 cm de profundidad; excelente capacidad de campo pH > 7. Tiene una temperatura que varía entre los 18 a 22 ° C, el clima es tropical húmedo.

##### **3.1.2. Recolección del material vegetal**

Las muestras vegetales de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* se recolectaron en la Amazonía de Ecuador, en la comunidad San Luis de Inimkis, con la ayuda y asesoramiento del Tecnólogo Manuel Ayuy (nativo shuar de la zona).

La recolección de las hojas de la especie vegetal fue de forma aleatoria y con un rango aproximado de 50 ha.

La cantidad de hojas de *Renealmia thyrsoidea* recolectadas fueron 191 libras. Véase figura 5.



**Figura 5.** Recolección y almacenamiento de hojas de *Renealmia thyrsoides*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

### **3.1.3. Identificación taxonómica**

La identificación taxonómica de la muestra botánica se llevó a cabo en el Herbario de la Universidad Central del Ecuador (QAP) en Quito. Anexo 1.

## **3.2. Destilación de aceites esenciales**

### **3.2.1. Destilación del aceite esencial de hojas de *Renealmia thyrsoides***

Para la obtención del aceite esencial de la especie vegetal se usó la técnica de destilación con agua y vapor de agua.

El equipo para la destilación comprende cinco componentes básicos: recipiente, condensador, vaso separador, colector y generador de vapor.

El recipiente está representado por el aparato de extracción, propiamente dicho. Generalmente, este recipiente está hecho de acero inoxidable y posee un fondo falso compuesto por una lámina perforada de acero inoxidable en la cual se deposita el material vegetal para ser extraído. Frecuentemente, para facilitar las operaciones de carga y descarga, el material se introduce en el recipiente dentro de una cesta perforada, apoyada en el fondo falso o en las proyecciones dispuestas para sostenerlo. En este caso, el propio fondo perforado de la cesta constituye el fondo falso. El sistema distribuidor de vapor se localiza debajo del fondo falso. El fondo de

forma cónica, posee un grifo de desagüe, para permitir la salida del vapor de agua condensado, en la parte superior posee una tapa con un cierre hermético. La tapa está conectada al condensador por medio de un tubo, también de acero inoxidable. (Sharapin, 2000, pg. 106). Como se muestra en la figura 6.

El destilador pertenece a la fundación CHANKUAP, es de acero inoxidable y tiene una capacidad de 250 L.

**Materiales:**

- Vasos de precipitación
- Frasco de vidrio color ámbar con tapa
- Hojas del material vegetal

**Equipos:**

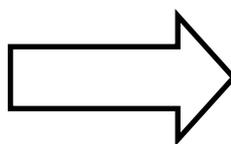
- Destilador industrial con una capacidad de 250 L, y 50 kg de materia prima; funciona a motor y utiliza como combustible gas (GLP), tiene un proceso de recirculación de agua.

**Reactivos:**

- Agua

**Tiempo de destilación:**

- De 6 a 8 horas



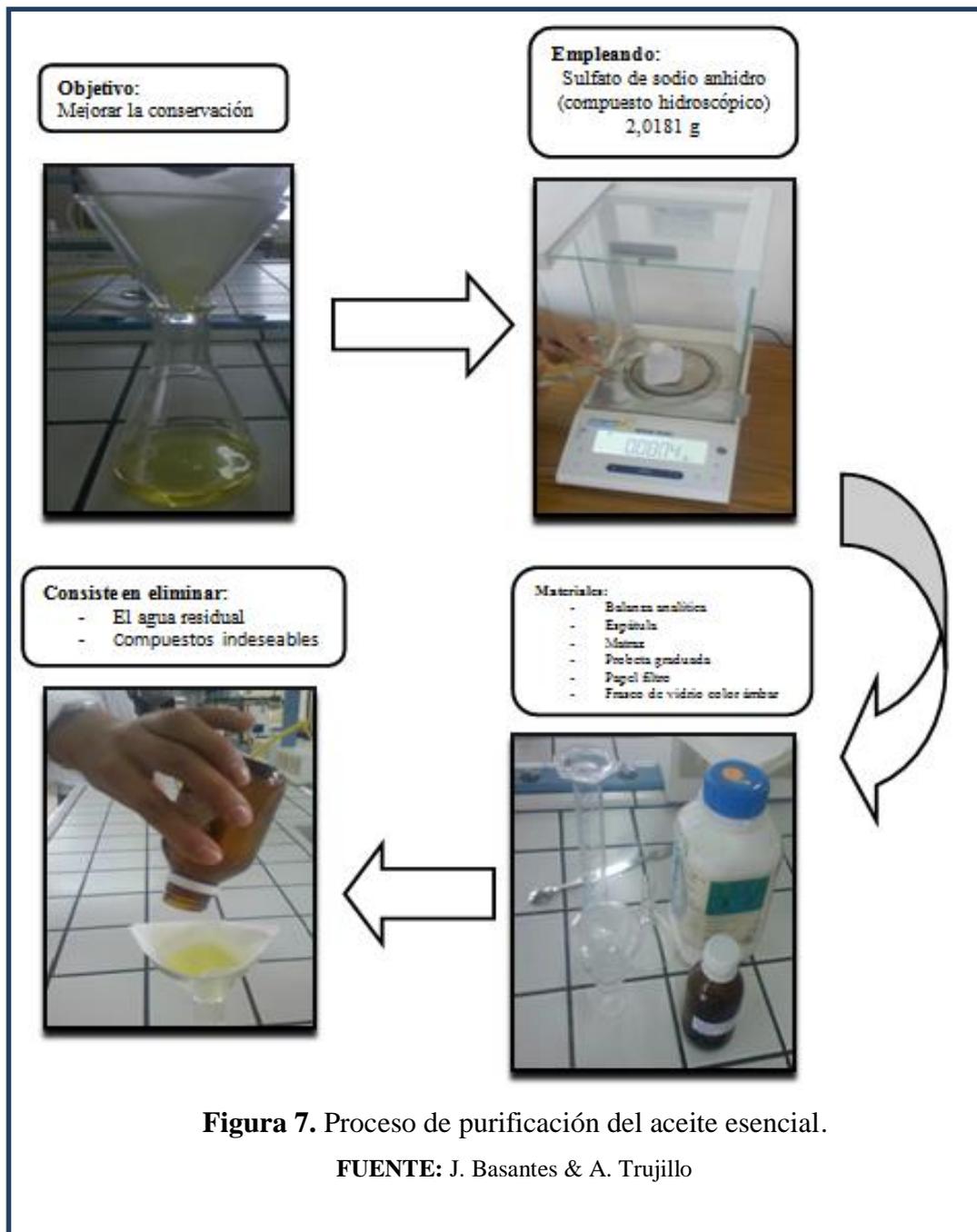
**Figura 6.** Destilación y obtención del aceite esencial

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

### 3.3. Purificación de los aceites

El aceite recolectado a partir de la destilación a vapor de agua fue depositado en un embudo, se dejó en reposo hasta observar las dos fases agua y aceite, procediendo luego a su separación.

El aceite fue sometido a desecación con sulfato de sodio anhidro, filtrado, vertido en un frasco de vidrio color ámbar debidamente etiquetado y sellado para ser almacenado en refrigeración. Véase en la figura 7.



**Figura 7.** Proceso de purificación del aceite esencial.

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

### 3.4. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

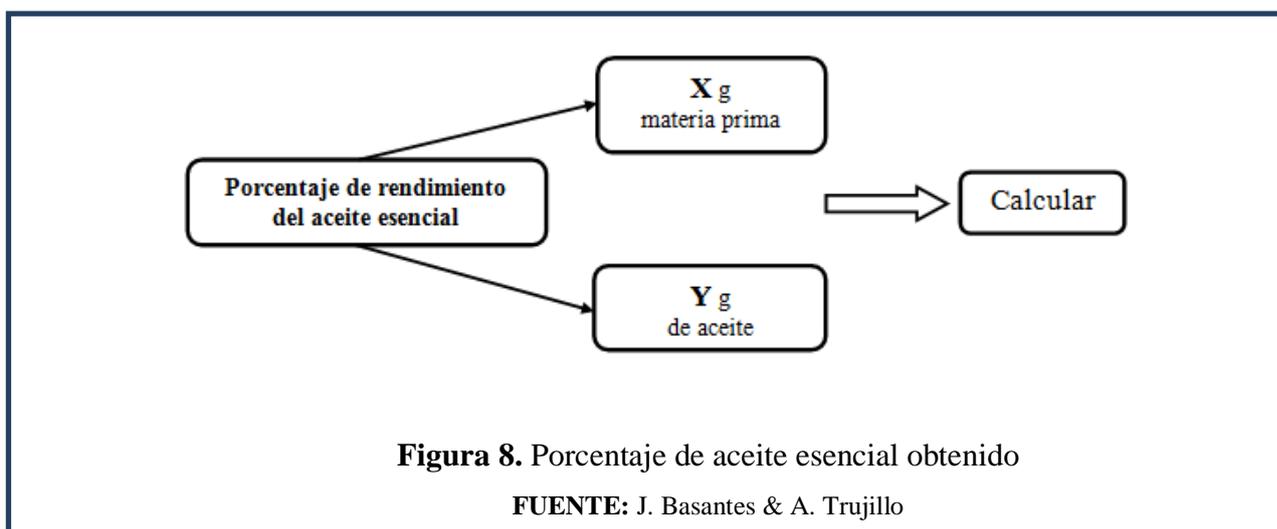
El porcentaje de rendimiento se calculó así:

Si se destiló X g de materia prima y se obtuvo Y g de aceite, al destilar 100 g de planta aromática, se obtendrá el porcentaje aceite esencial.

**Ecuación 1.** Porcentaje de rendimiento

$$Z\% = \frac{Xg \cdot 100}{Yg}$$

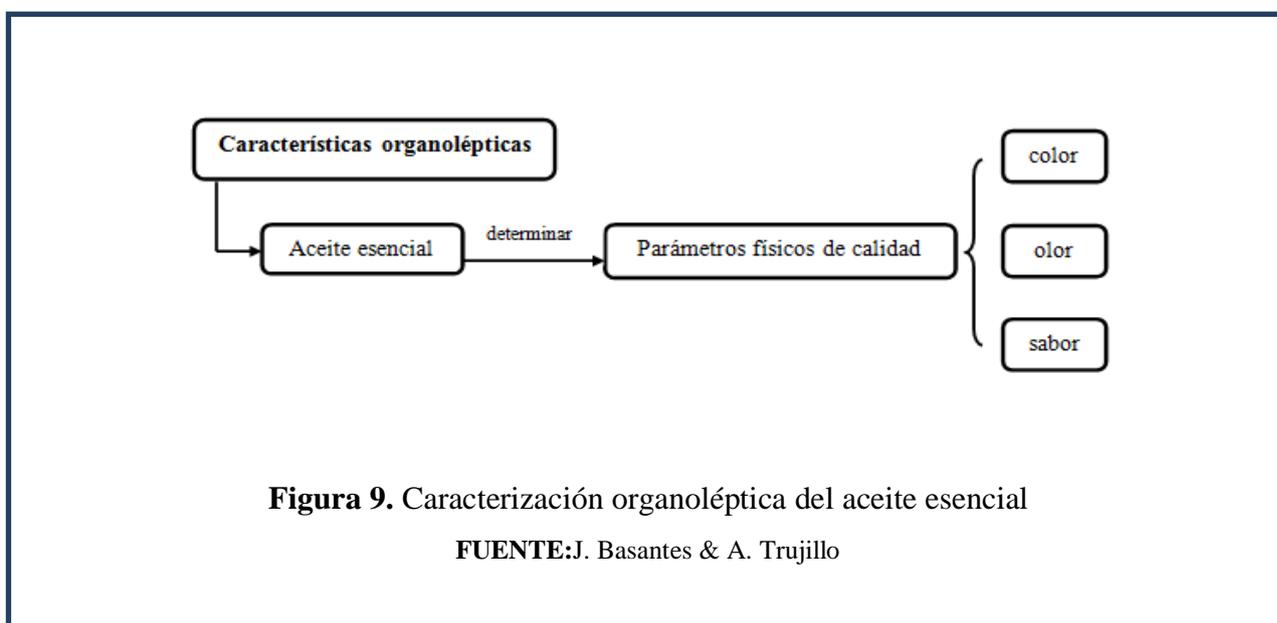
### 3.5. Características organolépticas



**Figura 8.** Porcentaje de aceite esencial obtenido

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

Una vez obtenido el aceite esencial, se determinó ciertos parámetros físicos de calidad tales como: color, olor y sabor.



**Figura 9.** Caracterización organoléptica del aceite esencial

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

### **3.6. Determinación de propiedades físicas**

#### **3.6.1. Índice de refracción.**

Para este análisis, se calibró el refractómetro con agua destilada a una temperatura ambiente y las lecturas se analizaron colocando una gota de aceite sobre el prisma. Se realizó tres repeticiones. (Miranda, 2000)

#### **Materiales:**

- Gotero
- Papel secante

#### **Equipos:**

- Refractómetro con aproximación hasta la tercera cifra decimal con temperatura controlada en  $\pm 0,1^\circ \text{C}$
- 

#### **Características del equipo utilizado para determinar el índice de refracción.**

- Marca: Atago
- Serial No. 114014
- Date: 2011 1-6
- Input: AC 100-240V  
50/60 Hz 5 VA

#### **Reactivos**

- Aceite esencial
- Agua destilada

#### **3.6.2. Índice de acidez**

Se pesó 5 g del aceite esencial. Se añadió alcohol etílico a 95% en un volumen igual a 5 veces el peso de la muestra y 5 gotas de fenolftaleína. Se agitó hasta alcanzar una solución homogénea y se procedió a valorar con una solución alcohólica de KOH 0,1 mol/L. El índice de acidez se calculó con la siguiente fórmula. (Miranda, 2000)

**Ecuación 2.** Cálculo del índice de acidez

$$IA = \frac{56,1 * V * Z}{g}$$

Dónde:

V = mL de KOH 0,1 mol/L consumidos

Z = Concentración molar en equivalentes de la solución de KOH

56,1 = miliequivalentes de KOH expresados en mg

g = Peso de la muestra en gramos

### 3.6.3. Densidad

Se pesó el picnómetro vacío, se colocó la muestra de aceite se ajustó el aceite al nivel empleado.

En el picnómetro se colocó agua destilada y se procedió a pesar.

Se realizaron tres repeticiones, que arrojaron un promedio. (Miranda, 2000)

La densidad relativa, se calculó con la siguiente fórmula:

#### Ecuación 3. Densidad relativa

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Dónde:

M1: peso del picnómetro con la muestra de aceite g

M2: peso del picnómetro con el agua destilada g

M: peso el picnómetro vacío g

#### Materiales:

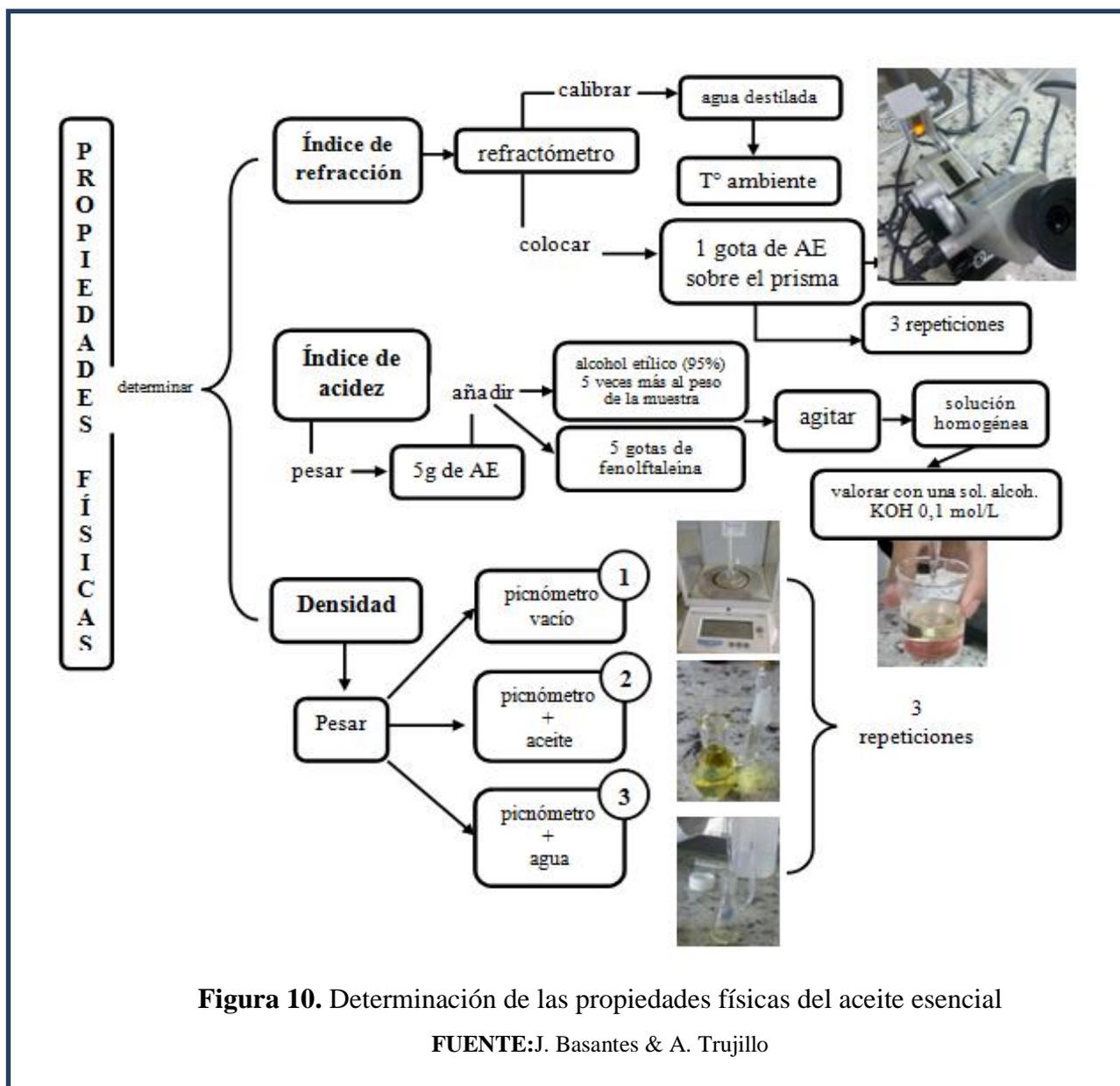
- Papel secante
- Picnómetro de 10 mL

#### Equipos:

- Balanza analítica

#### Reactivos:

- Aceite esencial
- Agua destilada



**Figura 10.** Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

### 3.7. Determinación de la composición química

#### 3.7.1. Cromatografía de gases

##### 3.7.1.1. Preparación de las muestras

Antes de inyectar las muestras en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas (GC/MS) se pesó 10 mg de aceite esencial, se añadió 1 mL de diclorometano (DCM) en un vial, posterior a ello se agitó para una adecuada homogenización. (Coronel y Piedra, 2014)

Este procedimiento se realizó con cada muestra.

**Materiales:**

- Pipetas de 1 mL

**Equipos:**

- Balanza analítica
- Cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas (GC/MS)

**Reactivos:**

- Diclorometano (DCM)
- Aceite esencial de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*.

**3.7.1.2. Condiciones del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas.**

Las características del equipo y los parámetros establecidos en el análisis cromatográfico fueron:

Equipos GC/MS: Varian 3900 y MS Saturn 2001

Parámetros del GC/MS:

- Flujo de gas helio: 1ml x min
- Temperatura del inyector: 280° C
- Split Ratio: 1:40
- Columna capilar: Factor Four VF-5MS (30m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness)
- Temperaturas: 45° C – 100° C
- Rate 1 °C x min
- 100° C – 250° C
- Rate 5° C x min
- Tiempo de espera a 250° C: 15 minutos
- Tiempo total de análisis: 90 minutos
- Rango de masa de 35 a 400 m/z.

**3.7.2. Cálculo del índice de Kovats**

Con el cromatograma obtenido, se procedió a calcular el valor del índice de retención, tomando en cuenta los picos mediante la comparación de las características de retención con los dos compuestos más cercanos que eluyen en el estándar de índice de retención, analizados bajo condiciones idénticas. Esta

comparación matemática se estableció mediante el uso de la ecuación que se encuentra a continuación.

**Ecuación 4.** Cálculo del índice de Kovats

$$I^t = 100 \left[ \frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right] + N$$

Dónde:

$I^t$  = Índice de retención de temperatura programada análisis GC, velocidad de calentamiento constante.

$t_{Ri}^T$  = Tiempo de retención ajustado del pico de la muestra.

$t_{Rz}^T$  = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.

$t_{R(z+1)}^T$  = Tiempo de retención ajustado de n-alcano pico de elución inmediatamente después del pico de la muestra.

$Z$  = Número de carbonos de n-alcano pico de elución inmediatamente antes del pico de la muestra.

$N$  = Número de carbonos C-10 al C-30.

### 3.7.3. Resonancia Magnética Nuclear $^1\text{H}$

El análisis del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* se realizó en el laboratorio de RMN de la Universidad Técnica Particular de Loja sede Loja a cargo de la Ing. Mónica Vega.

#### 3.7.3.1. Característica del equipo:

- Equipo: VARIAN-400 MHz, los espectros RMN  $^1\text{H}$  se los corrió a 399,83 MHz.
- Temperatura: 25°C
- Spin: 20 MHz

### 3.7.3.2. Condiciones de la muestra:

- Cantidad: 11 mg
- Envase: vial de vidrio color ámbar
- Solubilidad en disolvente: Cloroformo Deuterado (7,26 ppm) / 0,7 mL (utilizados).

## 3.8. Actividad antioxidante

### 3.8.1. DPPH test

La actividad antioxidante fue probada con la técnica de decoloración del radical libre *2,2-difenil-1-picrilhidracilo*.

El radical DPPH se reduce en presencia de antioxidantes, evidenciando un cambio de color en la solución. (Chen, 2009)

Para calcular el porcentaje de inhibición del DPPH, se aplica la ecuación:

**Ecuación 5.** Cálculo de porcentaje de inhibición del DPPH

$$\% IDPPH = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

**Donde:**

A=Absorbancia del patrón de referencia (blanco).

A<sub>1</sub>=Absorbancia de la muestra

**Materiales:**

- Balones aforados de 100, 10 mL
- Viales color ámbar
- Vasos de precipitación de 100 y 50 mL
- Frasco boeco de 250 mL
- Varillas de agitación

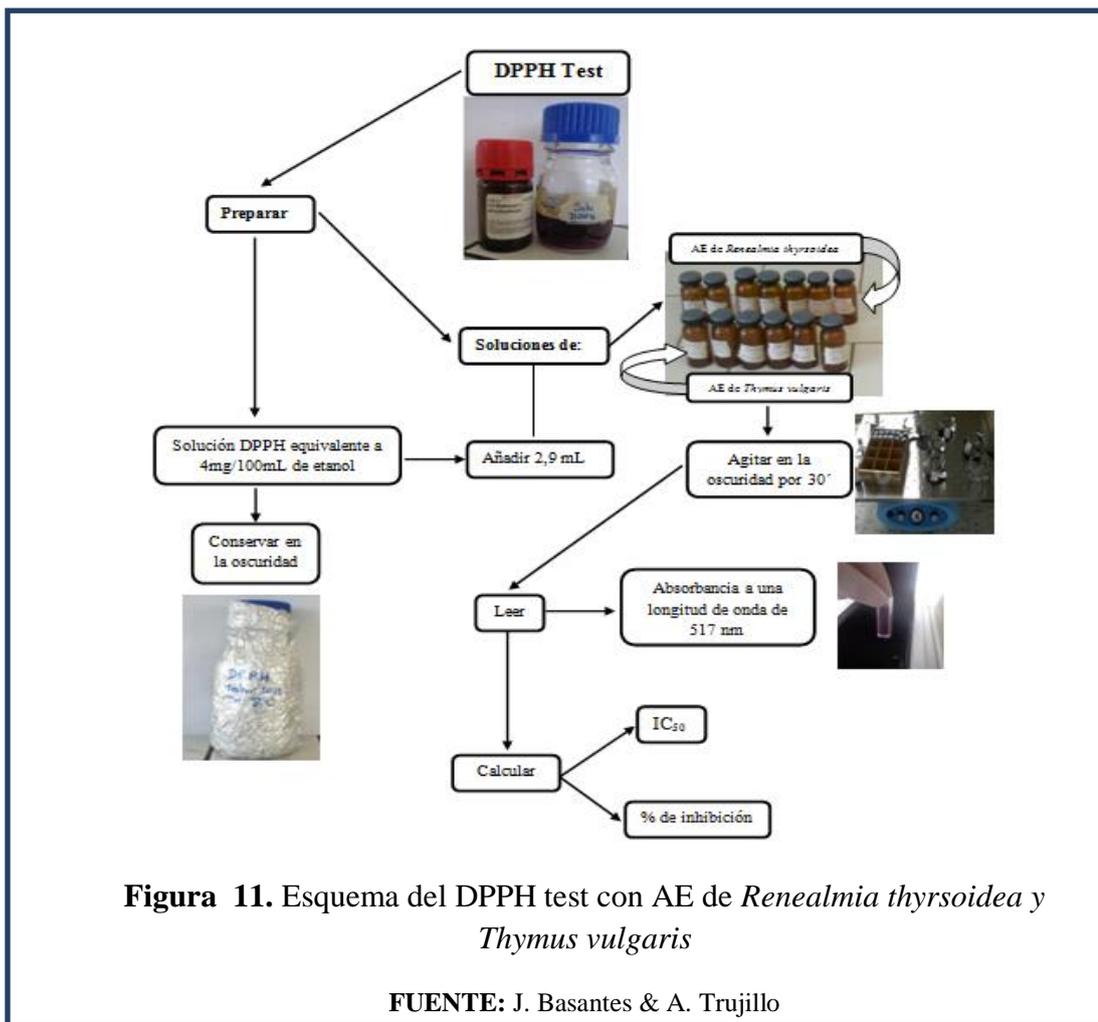
**Equipos:**

- Micropipeta de 1000 µL regulable
- Pipeta de 5 mL regulable
- Celdas plásticas
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Vórtex

- Agitador orbital

**Reactivos:**

- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Etanol
- Agua destilada
- Aceite esencial de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*
- Aceite esencial de *Thymus vulgaris*



**3.8.2. Ensayo ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico)**

El ensayo se fundamenta en el uso de un compuesto radicalizable, el ABTS. Inicialmente este compuesto radicalizado es de un color azul oscuro y la adición de un agente antioxidante determina su decoloración. (Kuskoski, 2004)

**Materiales:**

- Balones aforados de 100, 10 mL
- Viales ámbar,
- vasos de precipitación de 50 y 250mL
- frasco boeco de 250mL
- varilla de agitación
- celdas plásticas
- Micro pipeta de 1000µL regulable
- macro pipeta de 5mL regulable

**Equipos:**

- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini-1240
- Vórtex MIXER modelo VM-300

**Reactivos:**

- 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Etanol
- Agua bidestilada
- Aceite esencial de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*
- Aceite esencial de *Thymus vulgaris* (blanco positivo).

**3.8.2.1. Preparación de la solución madre de ABTS**

Se preparó una solución madre de ABTS 2mM, disolviendo exactamente 0,0275gde ABTS en 25mL de agua bidestilada.

**3.8.2.2. Preparación de la solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>**

Se preparó una solución de 70mM de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, disolviendo 0,1882g deK<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>en10mLde agua bidestilada.

**3.8.2.3. Preparación del ABTS radicalizado**

A la solución madre de ABTS se le añadió 250µL de solucióndeK<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y se agitó durante 30 minutos. Se conservó en la oscuridad por 24 horas para permitir la radicalización. La solución tiene una durabilidad de 2 días y permanece de color azul.

#### 3.8.2.4. Preparación de las muestras

Para realizar este ensayo se disolvió el aceite esencial de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* (muestra en análisis) y de *Thymus vulgaris* (referente natural) con DMSO.

Las concentraciones de los aceites esenciales se muestran a continuación.

**Tabla 8.** Concentraciones de los AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* y *Thymus vulgaris* en  $\mu\text{L}$  aforados a 100  $\mu\text{L}$  de DMSO.

<i>Renealmia thyrsoides</i>			<i>Thymus vulgaris</i> (Control positivo)			BHA		
Solución	$\mu\text{L}$ de AE	$\mu\text{L}$ de DMSO	Solución	$\mu\text{L}$ de AE	$\mu\text{L}$ de DMSO	Solución	$\mu\text{L}$ de AE	$\mu\text{L}$ de DMSO
1	2	98	1	-	100	1	1	99
2	5	95	2	5	95	2	2	98
3	10	90	3	10	90	3	10	90
4	20	80	4	20	80	4	50	50
5	50	50	5	50	50	5	80	20
6	80	20	6	80	20	6	100	
7	100	-	7	100	-			

Nota: J. Basantes & A. Trujillo

#### 3.8.2.5. Preparación del ABTS para las lecturas espectrofotométricas.

Se tomó 2mL del ABTS radicalizado y se añadió aproximadamente 25mL de etanol hasta que se obtuvo una absorbancia a 734 nm =  $0,70 \pm 0,02$ .

#### 3.2.6. Lectura del blanco

Se tomó 2,7mL de ABTS para lecturas espectrofotométricas y se añadió 0,3 mL de etanol, en la cubeta se agitó por un minuto y se procedió a leer la absorbancia.

#### 3.2.7. Lectura de las soluciones

Se tomó 2,97mL de ABTS para lecturas espectrofotométricas, se añadió 0,03mL de cada solución de aceite esencial, se agitó por 1 minuto y se procedió a leer la absorbancia. Los valores de la absorbancia fueron utilizados para determinar el porcentaje de inhibición de radicales libres (ABTS).

Se calculó la concentración con la capacidad de inhibir el 50% de la oxidación ( $\text{IC}_{50}$ ), mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 6.** Cálculo de porcentaje de inhibición ABTS.

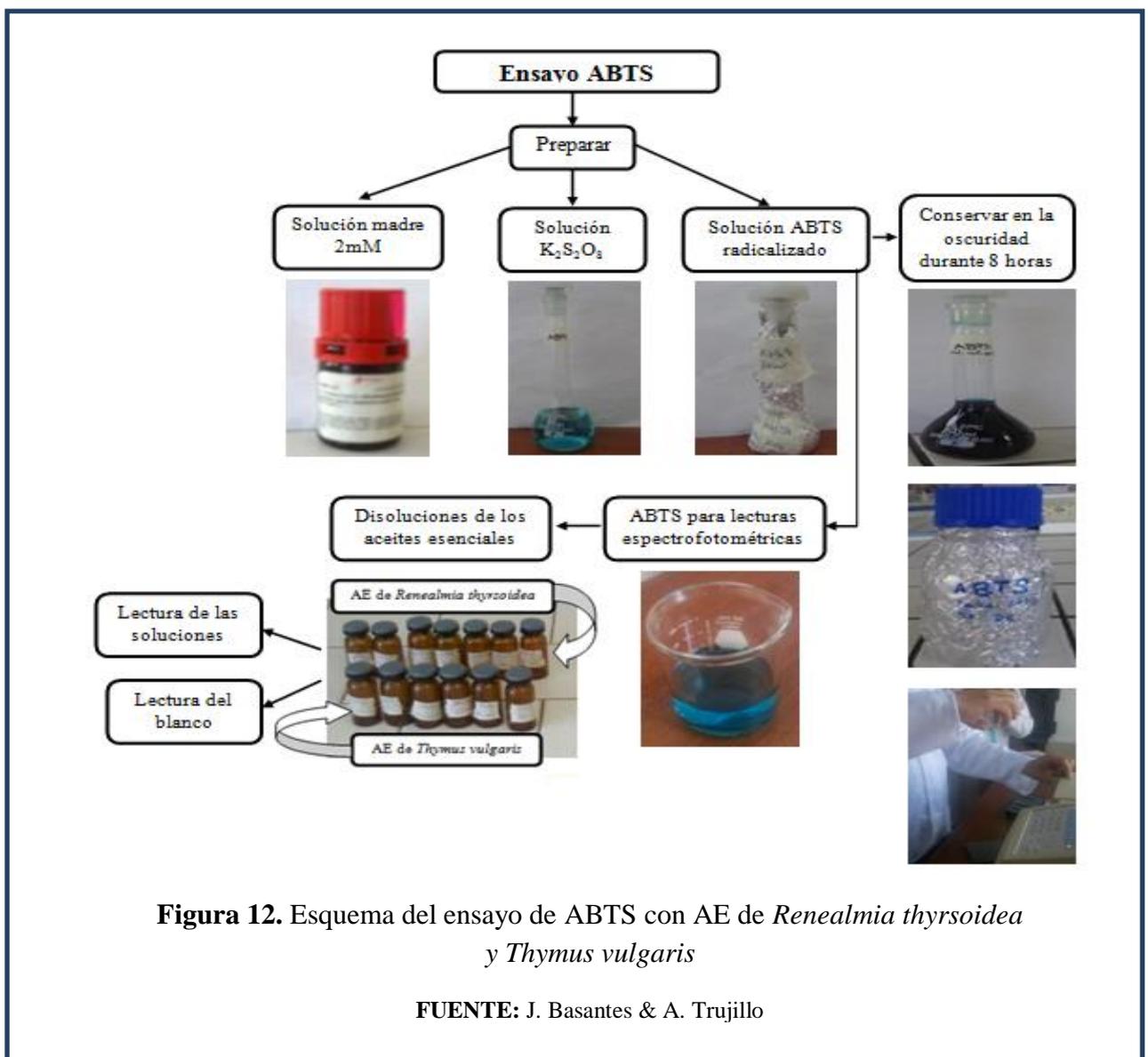
$$\% I ABTS = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

**Donde:**

$A$ =Absorbancia del patrón de referencia (blanco).

$A_1$ =Absorbancia de la muestra

A continuación, se comparó la actividad antioxidante del aceite esencial de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* con el patrón de referencia, el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.



**Figura 12.** Esquema del ensayo de ABTS con AE de *Renalmia thyrsoides* y *Thymus vulgaris*

**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

### 3.9. Estudios de actividad antimicrobiana

**Tabla 9.** Requerimientos para sembrar bacterias y levaduras

	MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN			Absorbancia	Longitud de onda (nm)			
			T°	Tiempo/h	Requerimiento					
Gram (+)	<i>Streptococcus mutans</i>	Sangre de cordero	37	24	CO <sub>2</sub> / 5%	0,2	655			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA			O <sub>2</sub>					
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>							SDA	25	48
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
Levaduras	<i>Candida albicans</i>	SDA	25	48	0,15	530				
	<i>Candida tropicalis</i>									

**Nota:** J. Basantes & A. Trujillo

#### Materiales:

- Tubos de ensayo de 10 y 15mL
- Cajas petri estériles
- Vasos de precipitación 100 y 250 mL.
- Gradilla
- Celdas plásticas para espectrofotómetro
- Pinzas estériles
- Asas estériles
- Hisopos de algodón estériles
- Micropipeta graduada
- Puntas de plástico para micropipeta estériles
- Roll of pack
- Regla pie de rey
- Discos de papel para antibiograma estériles (6 mm de diámetro)
- Cepas bacterianas KWIK-STIK™ de Microbiologics (*Staphylococcus aureus* ATCC\* 6538P™\*, *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, *Escherichia coli* ATCC\* 8739™, *Pseudomona aeruginosa* ATCC\* 9027™, *Candida tropicalis* ATCC® 13803™\* y *Candida albicans* ATCC®10231™\*)
- Cryobank

## **Equipos**

- Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML204/01
- Incubadora SHEL -LAB modelo 120VAC
- Vórtex MIXER modelo VM-300
- Cámara de flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845
- Espectrofotómetro SHIMADZU modelo uvmini-1240
- Centrifugadora SELECTA modelo 540
- Autoclave TUTTNAVER modelo 3870 M

## **Reactivos**

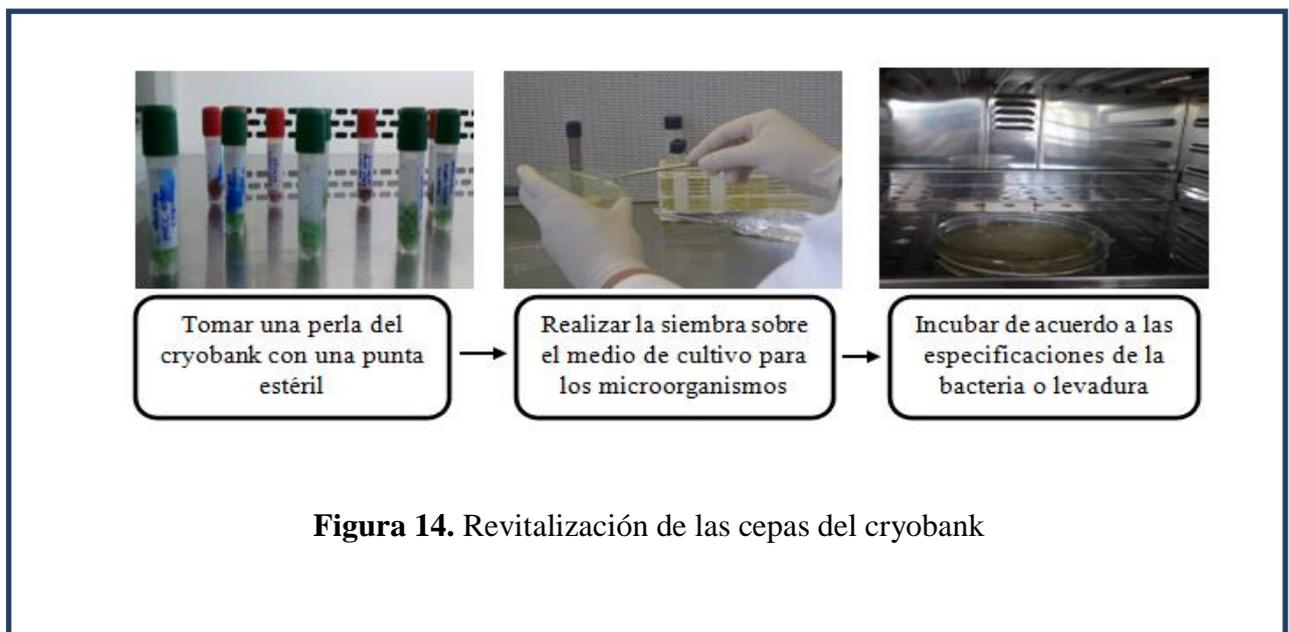
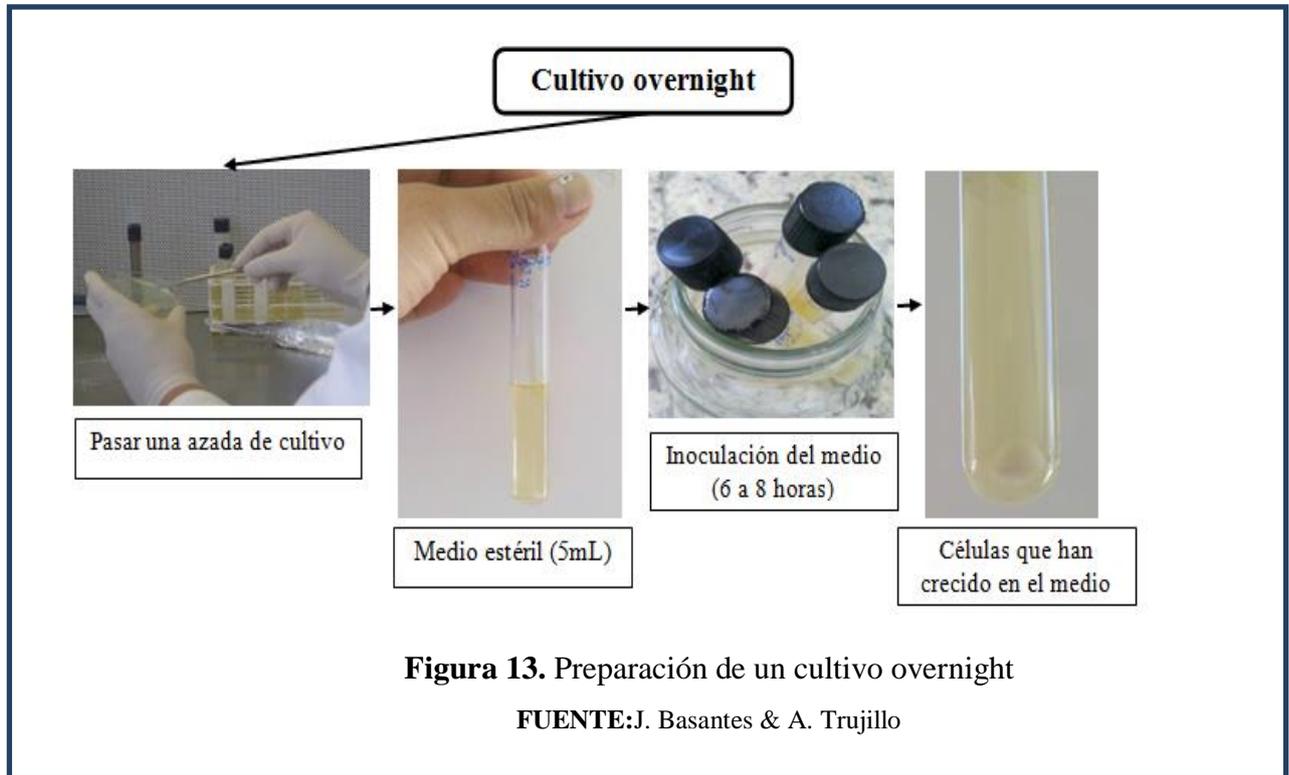
- Aceite esencial de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*.
- Aceite esencial de *Thymus vulgaris*
- Caldo tripticasa soja (TSB)
- Agar tripticasa soya (TSA)
- Agar nutriente (CM3)
- Sabouraud dextrosa agar (SDA)
- Mueller Hinton Agar (MH)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Suero fisiológico estéril
- Discos de fluconazol (6 mm de diámetro)
- Discos de gentamicina (6 mm de diámetro)

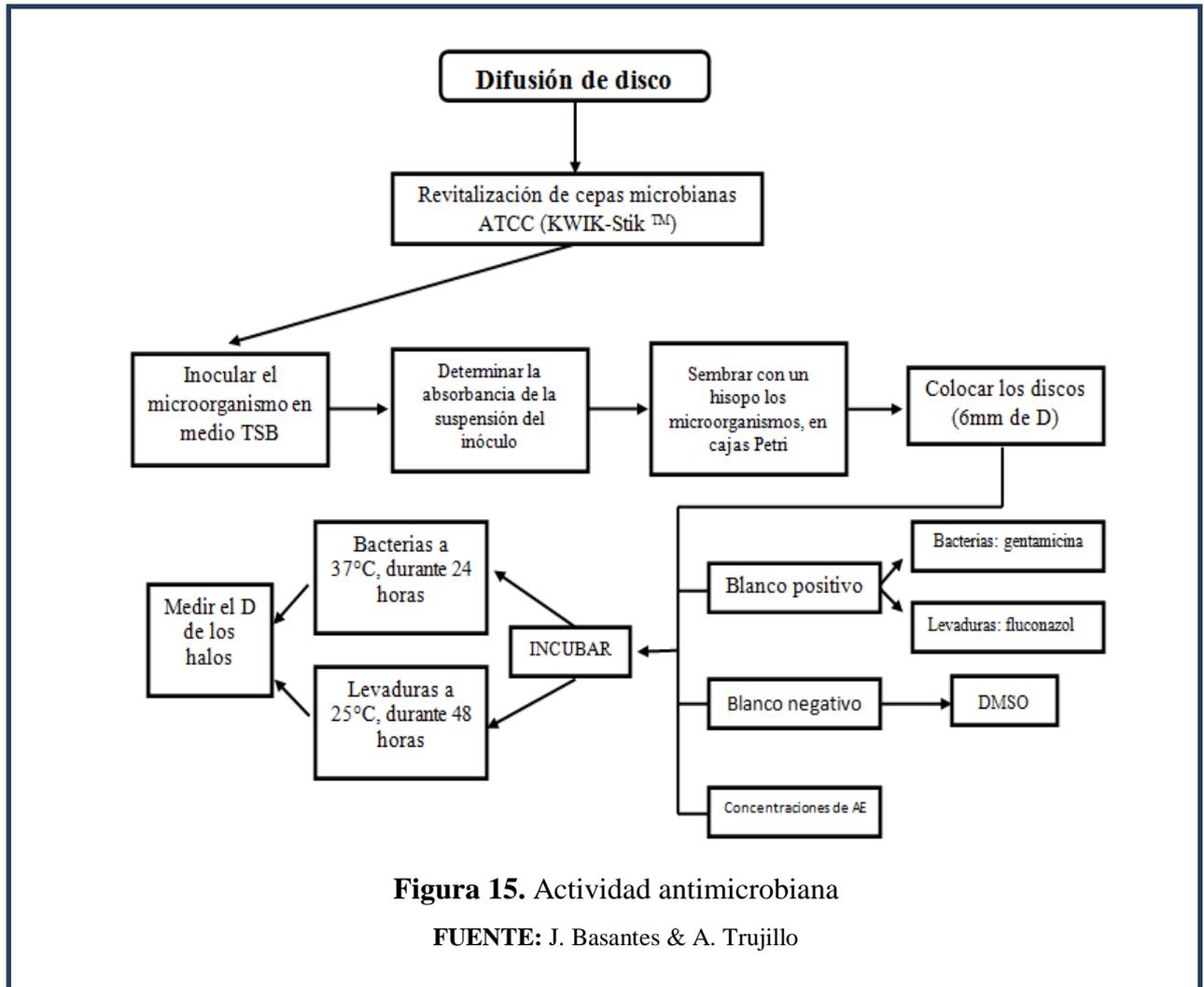
### **3.9.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la actividad antimicrobiana**

Para revitalizar las cepas bacterianas se preparó agar TSA, mientras que para revitalizar a las levaduras se utilizó agar SDA. Posteriormente se procedió a la incubación de las bacterias durante 24 horas a una temperatura de 37°C y a las levaduras a 25°C de 24 a 48 horas.

Previo a la siembra para el antibiograma se realizó un cultivo overnight <<cultivo fresco que ha crecido de la noche a la mañana en un medio líquido; consiste en pasar una azada de un cultivo previo (sólido o líquido) a 5mL de medio estéril y luego llevarlo a inoculación. Es definido por la cantidad de células que han crecido en el medio, este número es aproximadamente  $2 \times 10^9$  células/mL entre 6 a 8 horas (Abad, 2014)>> de las bacterias y levaduras en caldo TSB a 37°C por 18 horas, cumplido el tiempo establecido, se colocó en una centrífuga para precipitar el inóculo y luego se

realizó la suspensión en solución fisiológica al 0.9% para medir la absorbancia a una longitud de onda de 655 nm, dando como resultado un inóculo bacteriano de  $1 \times 10^8$  ufc. Para las levaduras la lectura fue realizada a una longitud de onda de 530 nm donde se obtuvo un inóculo de  $1 \times 10^6$  ufc.





## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1. Rendimiento de los aceites extraídos

El rendimiento de la extracción del aceite esencial de las hojas frescas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*, con una masa vegetal de 86636,21g, una densidad relativa de 0,8685 g/mL y un volumen final de 26mL de aceite es:

$$D_{25} \frac{m}{v}$$

$$0,8685 \frac{g}{mL} = \frac{m}{26mL}$$

$$m = 22,581g$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{22,581g * 100}{86636,21g}$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 0,026$$

#### 4.2. Control de calidad

##### 4.2.1. Evaluación sensorial del aceite esencial

Olor: Característico, leñoso, intenso y con un dulce cítrico frutal.

Sabor: Característico, intenso, desagradable y astringente.

Apariencia: Viscosa y libre de cuerpos extraños a 20° C

Color: Amarillo intenso

##### 4.2.2. Índice de refracción de los aceites

El índice de refracción del aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* es:

**Tabla 10.** Índice de refracción a una T ° promedio de 22,8° C del aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*

	m1	m2	m3	Promedio	Desviación Estándar	CV	% CV
Índice de Refracción	1,481	1,482	1,481	1,48133333	0,000471405	0,00031823	0,03182299

Nota: J. Basantes & A. Trujillo

#### 4.2.3. Densidad del aceite

La densidad relativa del aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* es:

**Tabla 11.** Picnometría de 10 mL del aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*

	m1	m2	m3	Promedio			
M	27,5886	27,5918	27,587	27,589133			
M1	36,1922	35,8716	35,7944	35,952733			
M2	37,2087	37,3052	37,141	37,2183	Desviación Estándar	CV	% CV
D25	0,8943358	0,8524101	0,8590538	0,8685999	0,018399058	0,0211824	2,1182432

Nota: J. Basantes & A. Trujillo

#### 4.2.4. Determinación del índice de acidez

El índice de acidez del aceite de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* es: 0,173 mg de KOH por g de aceite.

### 4.3. Determinación de la composición química

#### 4.3.1. Cromatografía de gases

**Tabla 12.** Índice de Kovats calculado

Picos	Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Porcentaje	Porcentaje Compuestos Identificados	Porcentaje Compuestos No Identificados	Desviación Estándar	Índice de Kovats Experimental	Índice de Kovats Teórico
1	7,861	$\alpha$ -pineno	0,616	0,616	-	0,150	936	932
2	8,235	Canfeno	8,525	8,525	-	2,126	943	954
3	12,426	$\alpha$ -felandreno	0,358	0,358	-	1,201	1017	1002
4	10,344	$\beta$ -felandreno	6,456	6,456	-	6,065	985	1029
5	10,693	Silvestreno	28,783	28,783	-	0,128	992	1030
6	13,161	Terpinolen	1,044	1,044	-	0,127	1026	-
7	14,062	<- $\epsilon$ - $\beta$ -> occimeno	2,864	2,864	-	0,343	1038	1050
8	16,395	Terpinoleno	2,085	2,085	-	0,176	1067	1088
9	18,719	1-4- metil ciclohexeno	1,314	1,314	-	0,083	1096	1120
10	28,335	4- terpineol	2,392	2,392	-	0,194	1190	1174
11	48,840	$\alpha$ -copaeno	3,130	3,130	-	0,272	1386	1374

12	49,285	$\beta$ -burbuneno	1,447	1,447	-	0,148	1391	1388
13	49,854	$\beta$ -elemeno	0,252	0,252	-	0,079	1398	1389
14	50,670	$\alpha$ -gurjuneno	0,273	0,273	-	0,018	1415	1409
15	51,278	<2-epi- $\beta$ > funebreno	0,509	0,509	-	0,085	1430	1412
16	51,847	$\beta$ -cedreno	0,476	0,476	-	0,080	1430	1420
17	52,201	$\beta$ -ylangueno	0,559	0,559	-	0,077	1451	1420
18	52,557	no identificado	0,492	-	0,492	0,153	1459	NI
19	53,169	Adomadendreno	3,691	3,691	-	0,534	1474	1441
20	53,746	Cadina	0,398	0,398	-	0,071	1487	1463
21	53,888	$\gamma$ -muuroleno	1,023	1,023	-	0,160	1490	1479
22	54,166	Aristolocheno	4,339	4,339	-	0,638	1496	1488
23	54,302	Selineno	0,576	0,576	-	0,083	1501	1492
24	54,507	Guaieno	1,550	1,550	-	0,256	1506	1493
25	54,636	Valenceno	0,840	0,840	-	0,087	1510	1496
26	54,727	Epizonareno	0,943	0,943	-	0,176	1513	1501
27	54,809	<trans $\beta$ > guaieno	0,420	0,420	-	0,048	1515	1502
28	54,945	$\delta$ -amorfeno	0,313	0,313	-	0,069	1520	1512
29	55,223	$\gamma$ -carineno	1,209	1,209	-	0,230	1529	1513
30	55,291	no identificado	0,352	-	0,352	0,046	1531	NI
31	55,498	$\delta$ -cadineno	2,307	2,346	-	0,378	1538	1522
32	55,626	no identificado	0,517	-	0,517	0,091	1542	NI
33	55,958	< $\epsilon$ -iso- $\gamma$ > bisoboleno	0,213	0,213	-	0,065	1552	1529
34	56,964	Nerolidol -z-	6,371	6,371	-	1,415	1585	1532
35	57,227	3,7(11)-dieno selina	0,124	0,124	-		1591	1546
36	57,398	Espatulanol	0,781	0,781	-	0,239	1599	1578
37	57,651	no identificado	0,859	-	0,859	0,231	1609	NI
38	57,905	Dietilftalato	0,565	0,565	-		1619	1590
39	58,196	Globulol	0,315	0,315	-	0,094	1630	1590
40	58,761	Viridiflorol	0,633	0,633	-	0,195	1635	1592
41	58,775	Rosifoliol	0,563	0,563	-	0,164	1651	1600
42	58,847	no identificado	0,452	-	0,452	0,164	1655	NI
43	58,897	no identificado	1,294	-	1,294	0,344	1660	NI
44	59,251	Guaiol	0,477	0,477	-	0,220	1670	1600
45	59,314	no identificado	0,226	-	0,226	0,012	1673	NI
46	59,628	no identificado	0,275	-	0,275	0,151	1685	NI
47	60,128	II-humuleno epoxido	0,986	0,986	-	0,986	1704	1608
48	61,852	<cis-> isolongifolanona	0,813	0,813	-	0,813	1779	1613
49	63,155	no identificado	0,334	-	0,334	0,335	1839	NI
			95,334	90,572	4,801			
			100%	95,005%	4,995%			

**Nota:** J. Basantes & A. Trujillo

### 4.3.2. Resonancia Magnética Nuclear

En el aceite entero de las hojas de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* se localizaron señales correspondientes al Nerolidol, que se detallan en la siguiente figura.

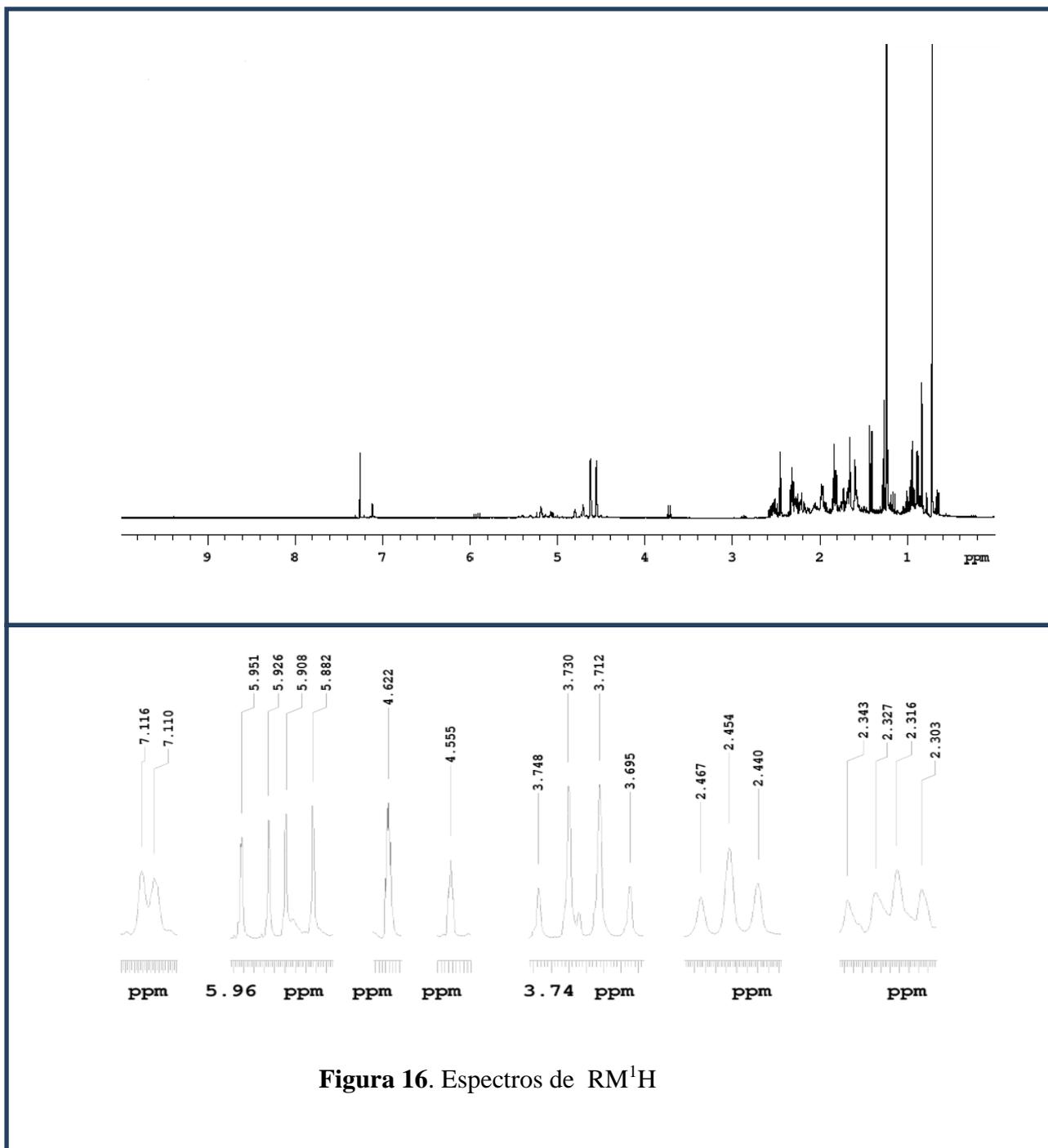
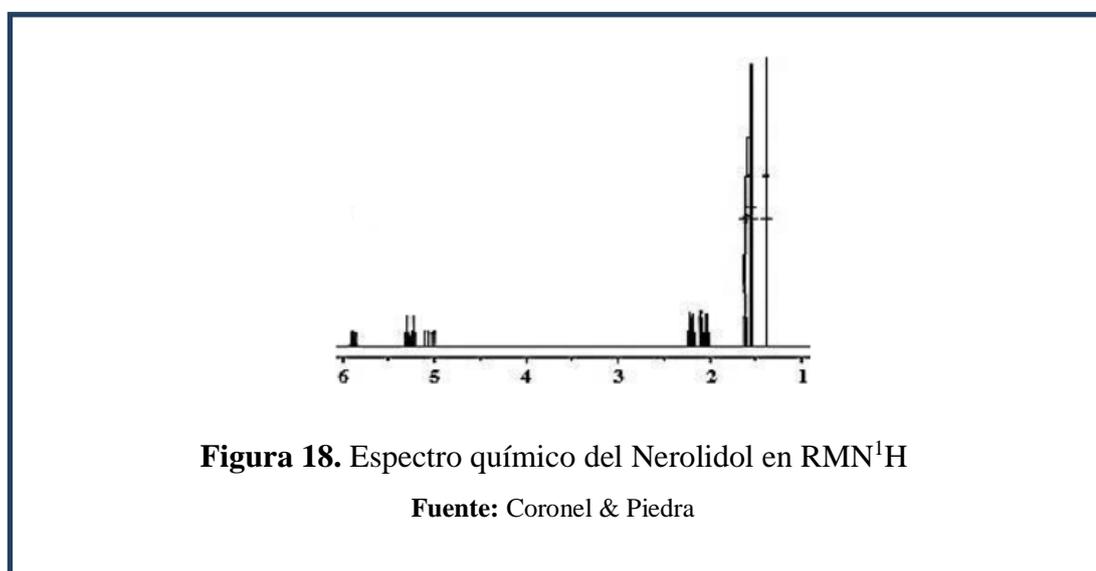
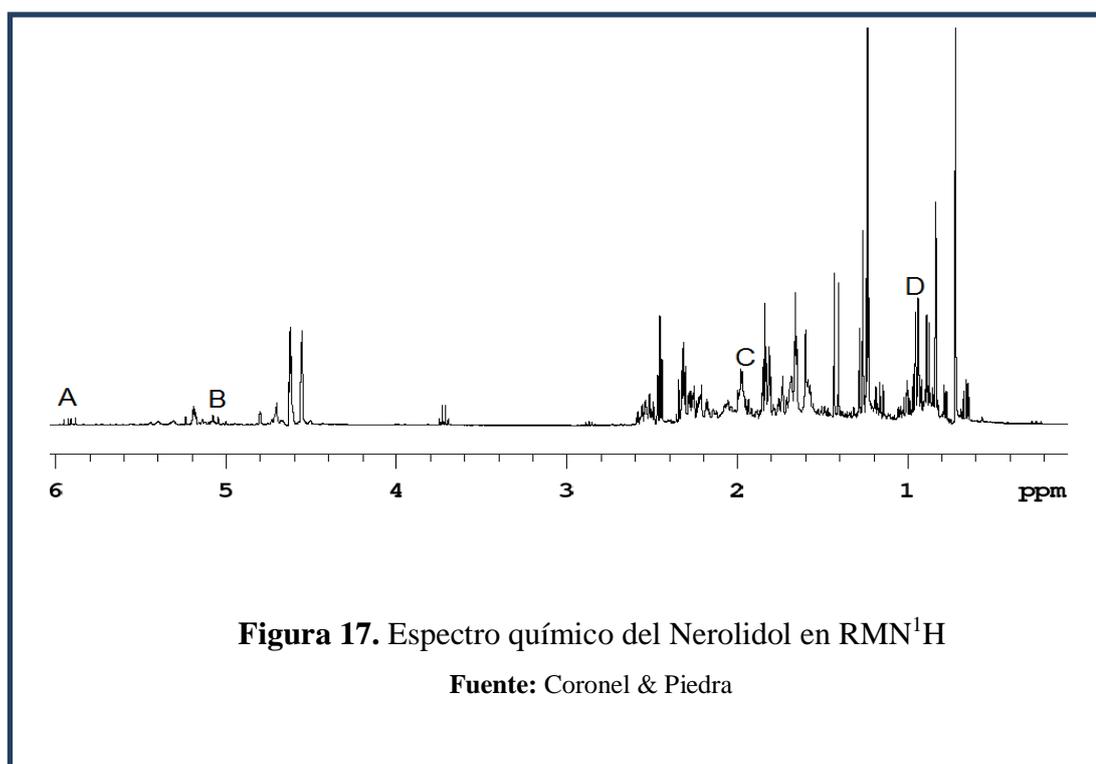


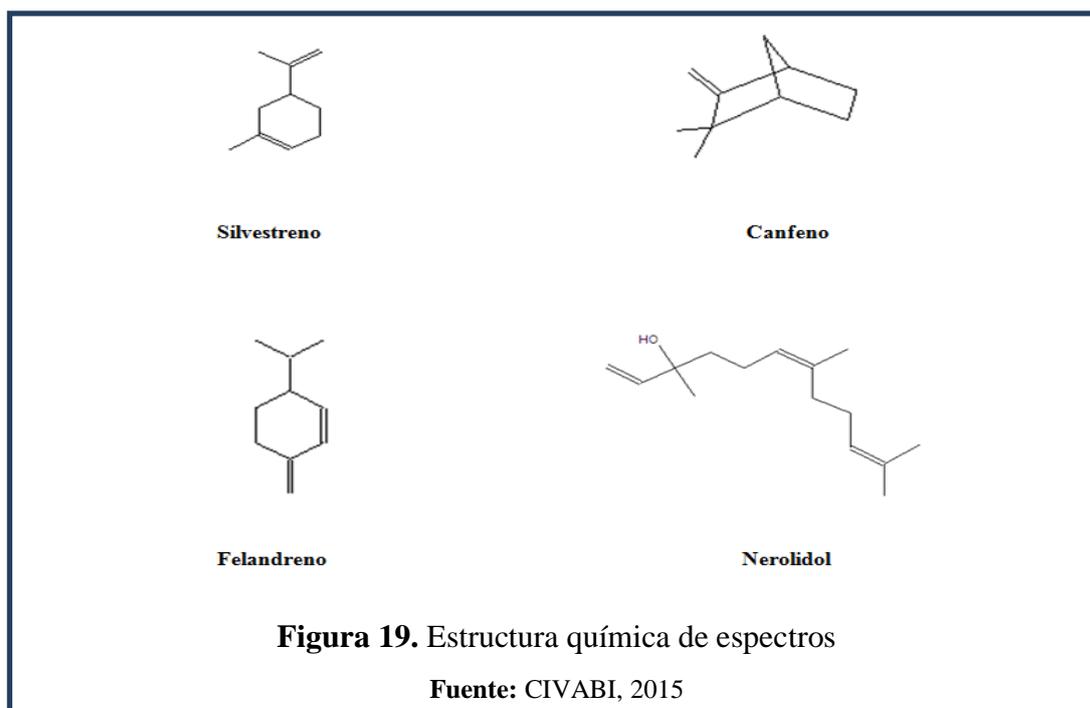
Figura 16. Espectros de  $\text{RM}^1\text{H}$

#### 4.3.2.1. Interpretación química

Los picos A, B, C, D, corresponden al espectro químico del Nerolidol conocido también como peruviol. Posee una forma natural de sesquiterpeno y existen dos formas de isómeros cis y trans, que difieren en la geometría alrededor del doble enlace central. El Nerolidol exhibe un aroma leñoso y con reminiscencias de corteza fresca. Es usado como un agente aromatizante y en perfumería, así como en pruebas para potenciar la penetración transdérmica de fármacos terapéuticos en la piel. (Moser, 2001)



## Estructura química de los espectros encontrados en GC/MS



### 4.4. Actividad antioxidante

Para la determinación de estos ensayos se tomó como referencia los datos expuestos en el trabajo investigativo de Almeida y Suárez del año 2014, con el fin de complementar la pesquisa de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*.

#### 4.4.1. Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

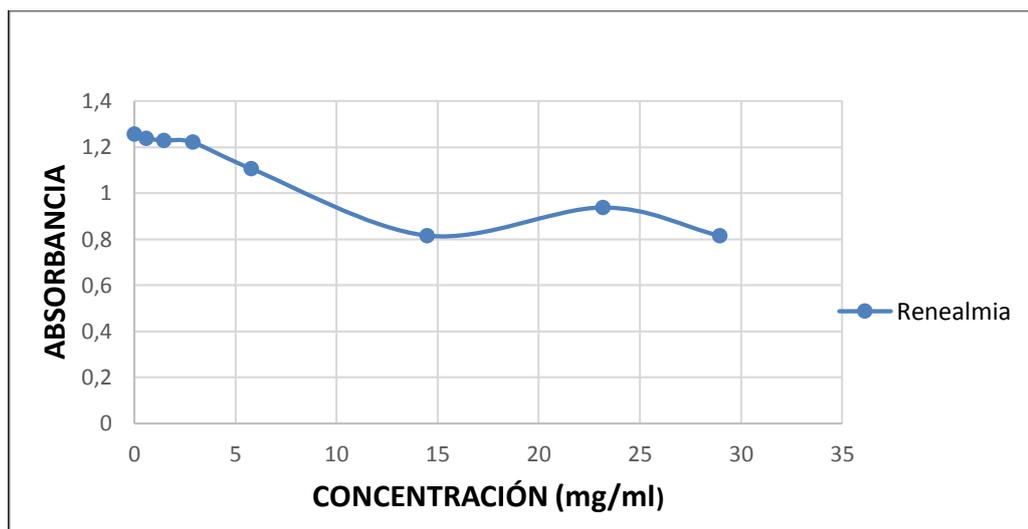
En la tabla 13. se muestran las concentraciones utilizadas de aceite esencial de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* con sus respectivos valores de absorbancia ( $\pm$ ), desviación estándar y porcentaje de inhibición.

**Tabla 13.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas del AE de las hojas de *Renalmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*

CONCENTRACIÓN mg/ml	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	1,258 $\pm$ 0,001	0
0,579	1,239 $\pm$ 0,001	1,51033386
1,447	1,230 $\pm$ 0,000577	2,22575517
2,895	1,222 $\pm$ 0,001	2,86168521
5,79	1,107 $\pm$ 0	12,0031797
14,475	0,819 $\pm$ 0,579	35,1351351

**Nota:** J. Basantes & A. Trujillo

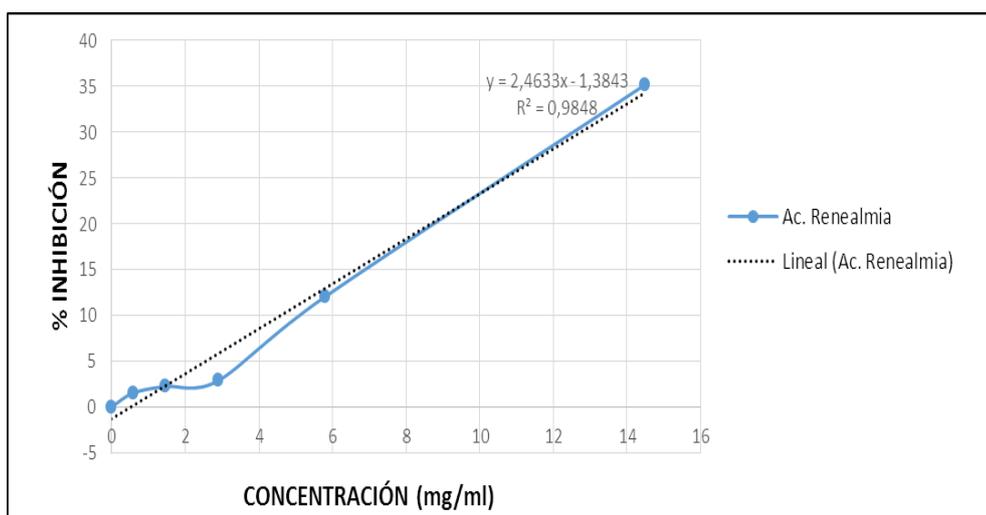
La siguiente figura representa la concentración del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* versus la absorbancia del mismo.



**Figura 20.** Absorbancia VS concentración del A.E de las hojas de *Renealmia thyrsoidea*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

La figura 21. muestra la relación de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* versus el porcentaje de inhibición



**Figura 21.** Porcentaje de Inhibición VS concentración del A.E de las hojas de *Renealmia thyrsoidea*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

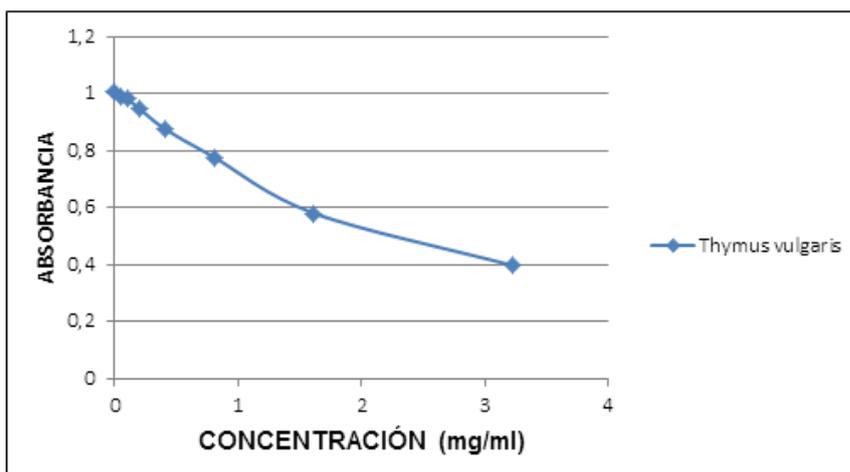
En la tabla 14. se presentan las concentraciones utilizadas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* con sus respectivas absorbancias ( $\pm$ ) la desviación estándar y el porcentaje de inhibición.

**Tabla14.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas de aceite esencial de *Thymus vulgaris*

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	10,084	0
0,04845	0,9934	1,487504958
0,10013	0,9816	2,657675526
0,20026	0,9482	5,969853233
0,40375	0,8776	12,97104324
0,8075	0,7766	22,98690996
1,615	0,5808	42,40380801
3,23	0,3968	60,6505355

Nota: S. Suarez & G. Almeida, 2014

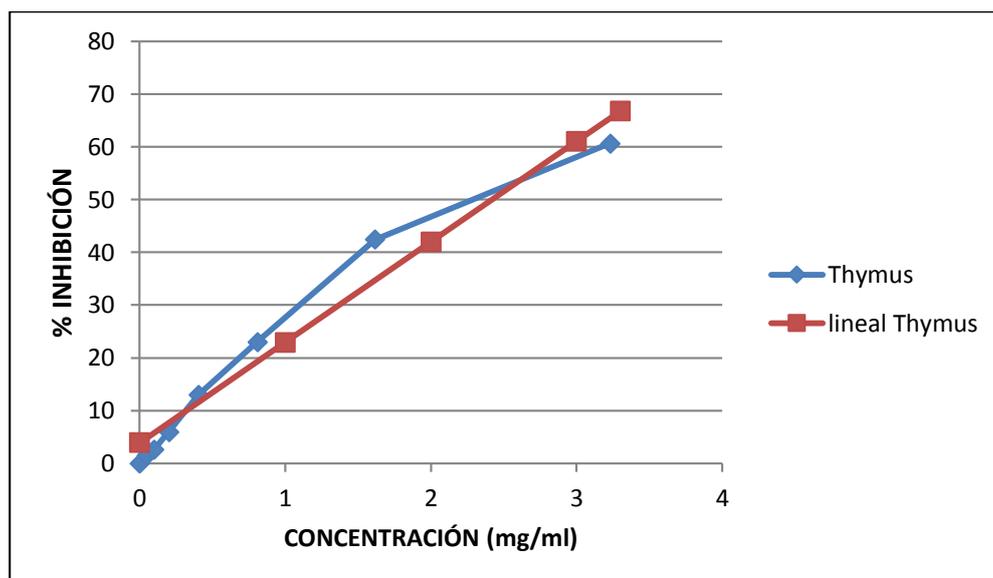
Se presenta la figura de la concentración del A.E. de *Thymus vulgaris* vs la absorbancia



**Figura 22.** Concentración del A.E de *Thymus vulgaris* VS la absorbancia.

FUENTE: S. Suarez & G. Almeida, 2014

La figura 23, muestra la relación de la concentración del A.E. de *Thymus vulgaris* VS el % de inhibición



**Figura 23.** Porcentaje de inhibición del A.E. de *Thymus vulgaris* VS concentración

FUENTE: S. Suarez & G. Almeida, 2014

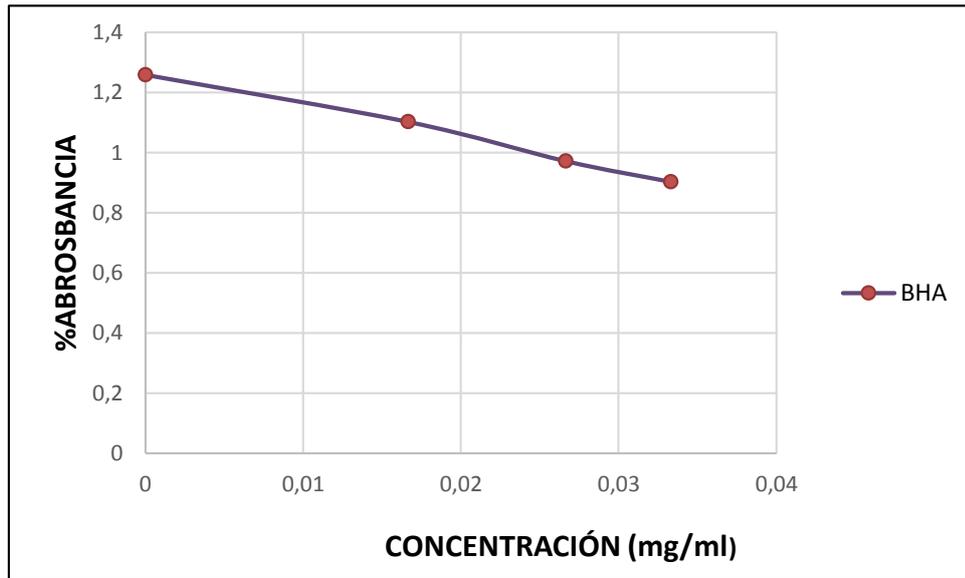
En la tabla 15 se presentan las concentraciones con sus respectivas absorbancias, y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA (Butilhidroxianisol)

**Tabla 15.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA (ButilHidroxiAnisol)

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	1,258±0,001	0
0,01666	1,102±0,001	12,4006359
0,02666	0,972±0,002	22,7609963
0,0333	0,903±0,001	28,1928988

Nota: J. Basantes & A. Trujillo

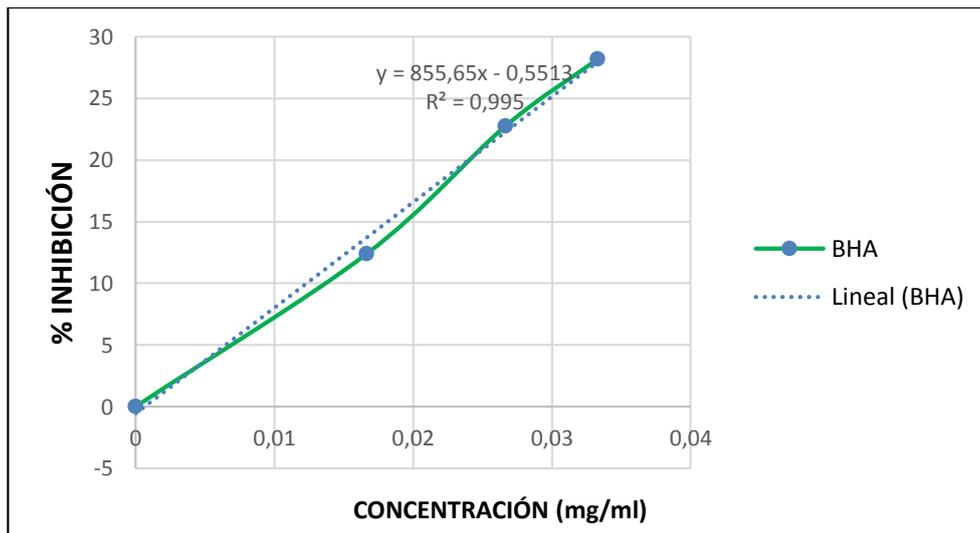
La siguiente figura 24, muestra la absorbancia vs la concentración (mg/ml) de BHA



**Figura 24.** Concentración del BHA VS Absorbancia

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

A continuación se presenta una figura de la concentración del BHA (Butilhidroxianisol) utilizado como blanco versus el % de inhibición



**Figura 25.** Concentración del BHA VS % de inhibición

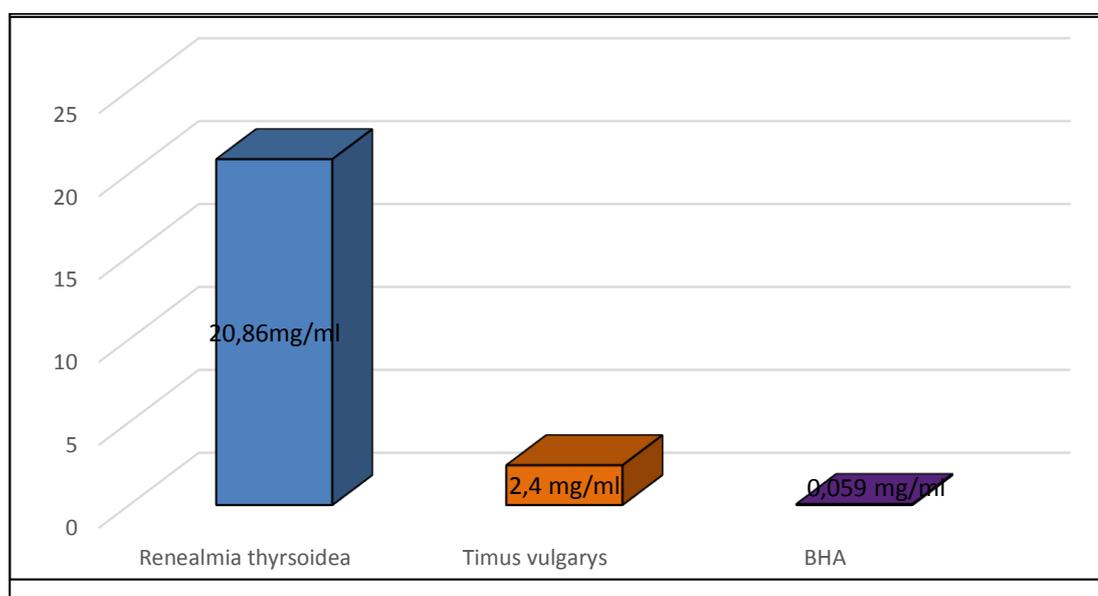
FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

**Tabla 16.** Valor de IC<sub>50</sub> del AE de *Renealmia thyrsoidea* y *Thymus vulgaris*, BHA.

ACEITE ESENCIAL	IC <sub>50</sub> (mg/mL) DPPH
<b>Renealmia thyrsoidea</b>	20,86
<i>Thymus vulgaris</i>	2,4 (S. Suarez & G. Almeida, 2014)
<b>BHA</b>	0,059

Nota: J. Basantes & A. Trujillo

La siguiente figura muestra los porcentajes de inhibición de *Renealmia thyrsoidea*, *Thymus vulgaris* y BHA.



**Figura 26.** Porcentaje de inhibición del A.E. de *Renealmia thyrsoidea*, *Thymus vulgaris* y BHA

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

#### 4.4.2. Método ABTS (2,2 - azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-acidosulfónico)

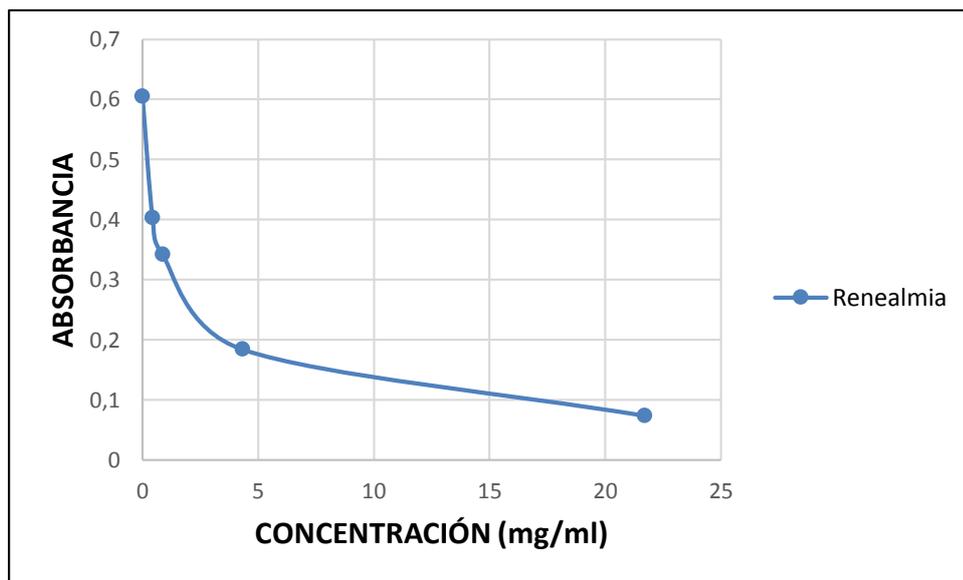
En la tabla 24. se muestran las concentraciones utilizadas de aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* con sus respectivos valores de absorbancia ( $\pm$ ), desviación estándar y porcentaje de inhibición.

**Tabla 17.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas del AE de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*

CONCENTRACIÓN mg/ml	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	0,605	0
0,4342	0,403	33,38842975
0,8685	0,342	43,47107438
4,3425	0,184	69,58677686
21,7125	0,074	87,76859504

NOTA: J. Basantes & A. Trujillo

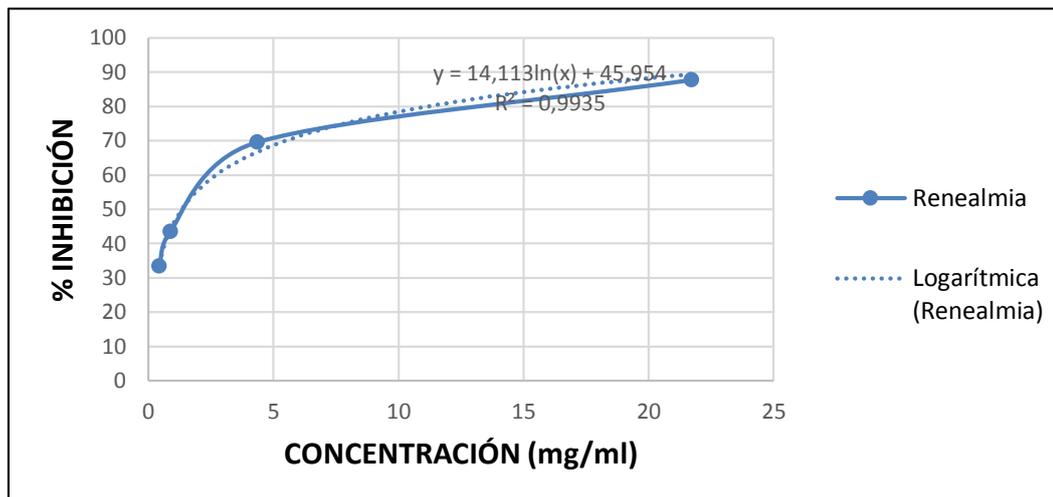
La siguiente figura representa la concentración del aceite esencial de las hojas de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* versus la absorbancia del mismo.



**Figura 27.** Absorbancia VS concentración del AE de *Renealmia thyrsoides*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

La figura muestra la relación de la concentración del A.E. de *Renealmia thyrsoides* versus el % de inhibición



**Figura 28.** Porcentaje de inhibición del A.E. de *Renealmia thyrsoidea* VS concentración

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

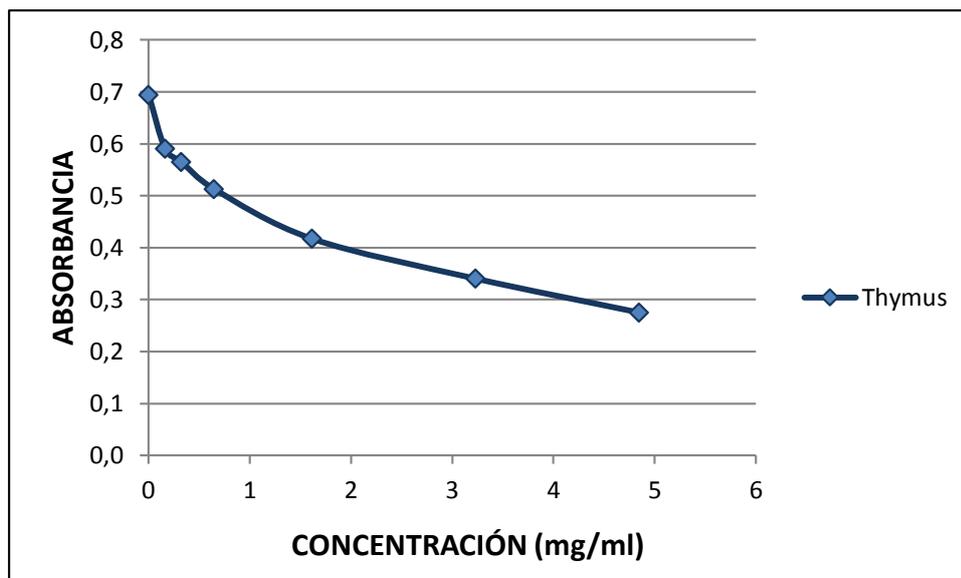
En la tabla 18 se muestra las concentraciones utilizadas de A.E. de *Thymus vulgaris* con sus respectivas absorbancias ( $\pm$ ), desviación estándar y el porcentaje de inhibición.

**Tabla 18.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Thymus vulgaris*

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	0,6938	0
0,1615	0,5902	14,93225713
0,323	0,5646	18,62208129
0,646	0,5126	26,11703661
1,615	0,4168	39,92505045
3,23	0,3402	50,96569617
4,845	0,275	60,35321707

NOTA: S. Suarez & G. Almeida, 2014

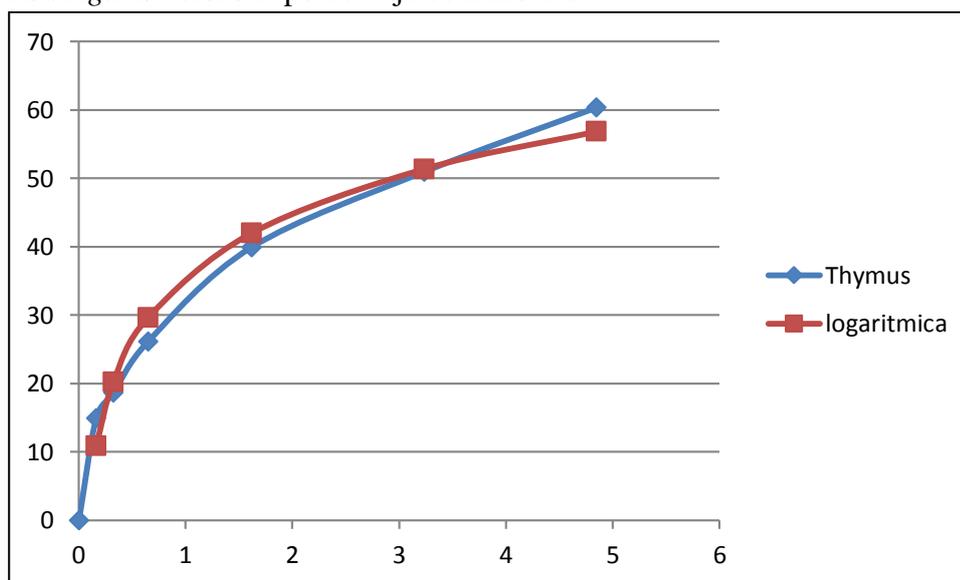
A continuación se presenta una figura de la concentración del A.E. de las hojas de *Thymus vulgaris* vs la absorbancia del mismo



**Figura 29.** Concentración del *Thymus vulgaris* vs. Absorbancia

**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

En la figura 30. se muestra la relación de la concentración del A.E. de las hojas de *Thymus vulgaris* versus el porcentaje de inhibición.



**Figura 30.** Concentración del A.E. de las hojas de *Thymus vulgaris* VS el porcentaje de inhibición.

**FUENTE:** S. Suarez & G. Almeida, 2014

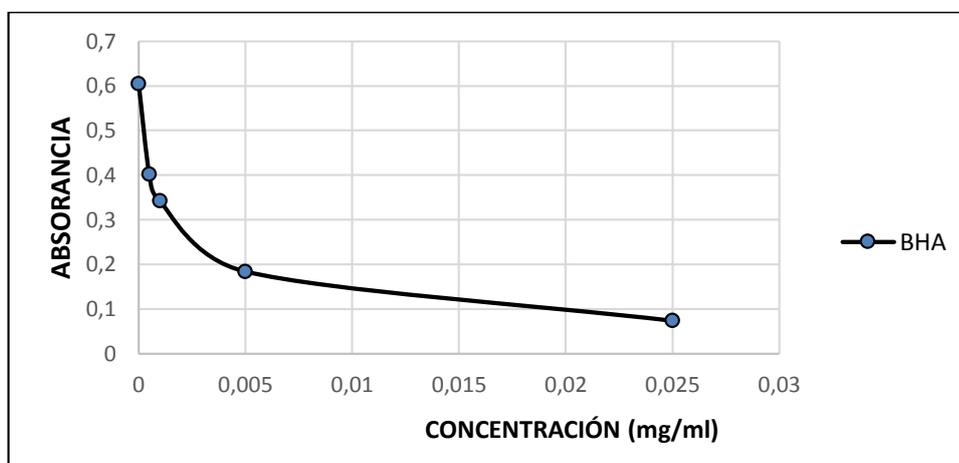
En la tabla 19 se presentan las concentraciones con sus respectivas absorbancias y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA (Butilhidroxianisol)

**Tabla 19.** Concentraciones, absorbancia y porcentaje de inhibición utilizadas en el blanco BHA

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% INHIBICIÓN
0	0,60466667	0
0,0005	0,401	33,6824697
0,001	0,34166667	43,4950386
0,005	0,184	69,470011
0,025	0,07366667	87,8169791

NOTA :J. Basantes & A. Trujillo

A continuación se presenta una figura de la concentración del BHA (Butilhidroxianisol) utilizado como blanco versus la absorbancia del mismo.

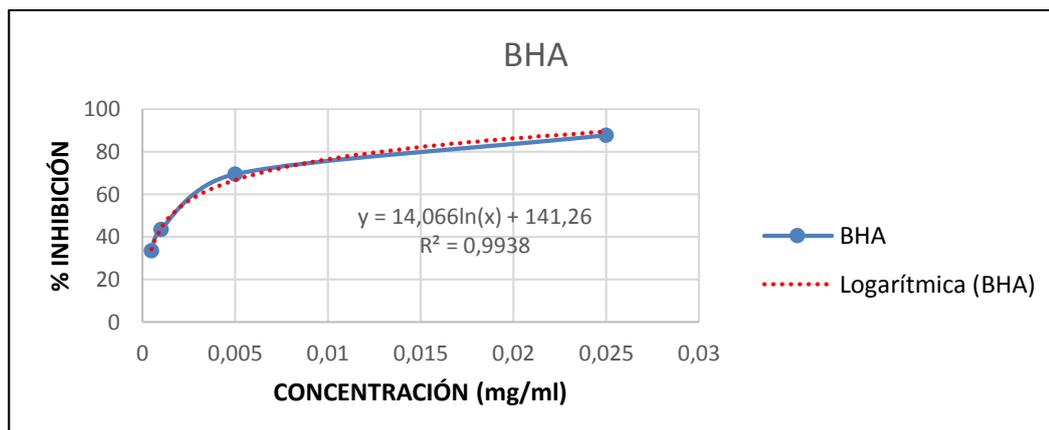


**Figura 31.** Concentración del BHA vs. Absorbancia

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

A continuación se presenta una figura de la concentración del BHA (Butilhidroxianisol) utilizado como blanco versus el % de inhibición

A continuación se presenta una figura de la concentración del BHA (Butilhidroxianisol) utilizado como blanco Vs. el % de inhibición



**Figura 32.** Concentración del BHA vs. % de inhibición

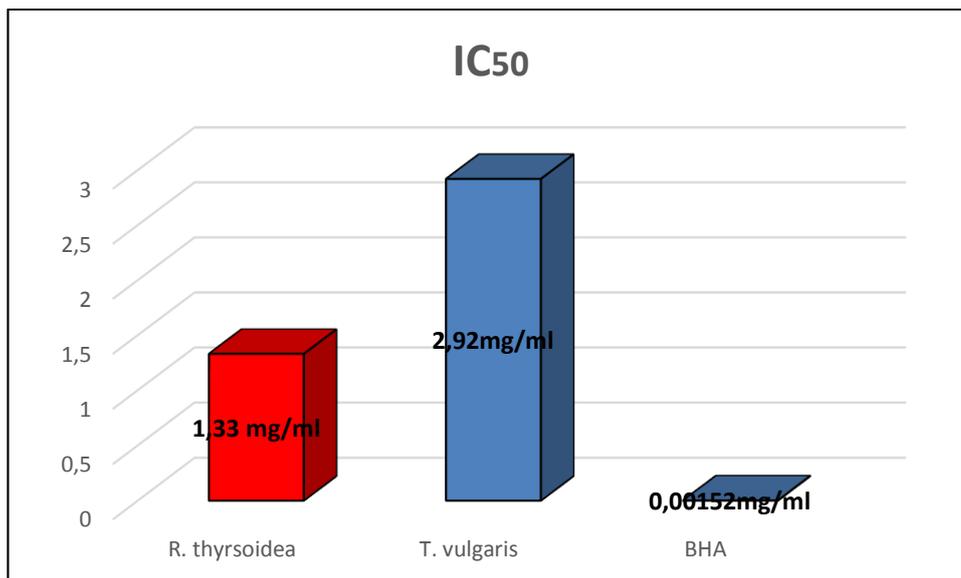
**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

**Tabla 20.** Valor de IC<sub>50</sub> del A.E. de *Renalmia thyrsoidea* y *Thymus vulgaris*, BHA.

ACEITE ESENCIAL	IC <sub>50</sub> (mg/ml) ABTS
<i>Renalmia thyrsoidea</i>	1,33
<i>Thymus vulgaris</i>	2,9204
BHA	0,00152

**NOTA:** J. Basantes & A. Trujillo

La siguiente figura muestra los porcentajes de inhibición de *Renalmia thyrsoidea*, *Thymus vulgaris* y BHA.



**Figura 33.** Porcentaje de inhibición de *Renealmia thyrsoidea*, *Thymus vulgaris* y BHA.

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

#### 4.5. Actividad antimicrobiana

##### 4.5.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

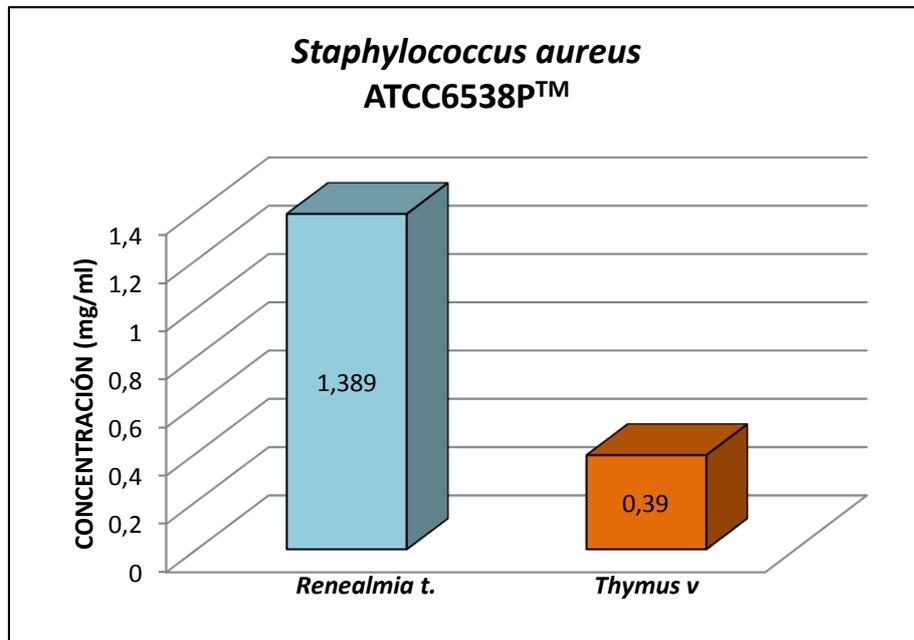
Las concentraciones utilizadas para determinar la CMI para todas las bacterias y levaduras fueron las siguientes:

**Tabla 21.** Cuadro de las concentraciones en porcentaje y su equivalente en (mg/mL) del AE de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* y del AE de *Thymus vulgaris*.

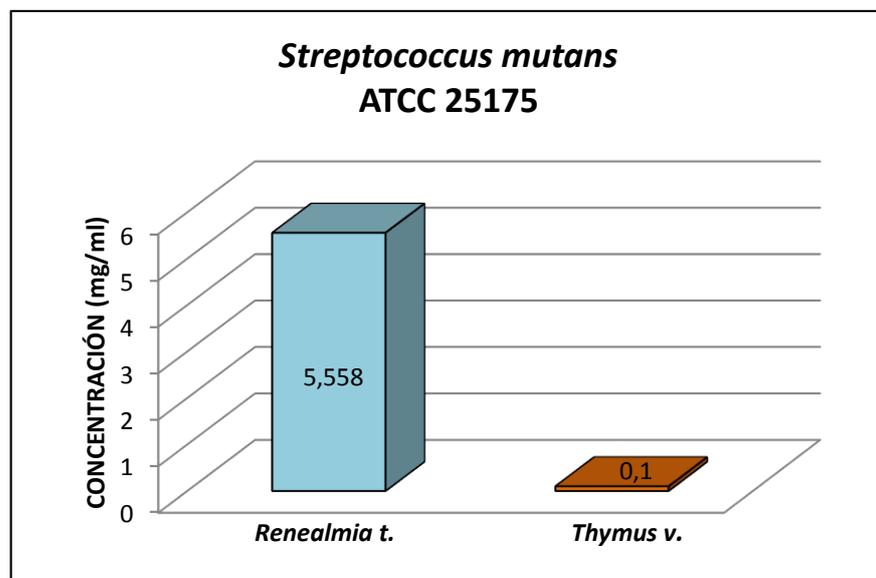
<i>Renealmia thyrsoidea</i>		<i>Thymus vulgaris</i>	
Porcentaje	Concentración (mg/mL)	Porcentaje	Concentración (mg/mL)
5	43,425	1,25	12,06
2,5	21,712	0,63	6,08
1,25	10,856	0,32	3,09
0,63	5,558	0,16	1,54
0,32	2,779	0,08	0,77
0,16	1,389	0,04	0,39
0,08	0,694	0,02	0,19
0,04	0,347	0,01	0,1

NOTA: J. Basantes & A. Trujillo

**Figura 34.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC6538P™ y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a los aceites esenciales de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *Thyrsoidea* y *Thymus vulgaris*

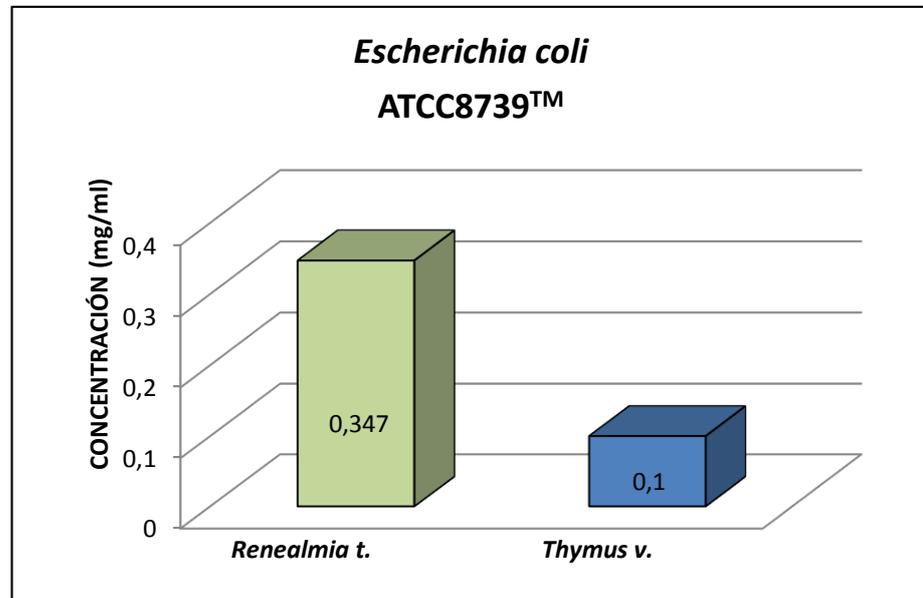


Fuente: J Basantes & A. Trujillo

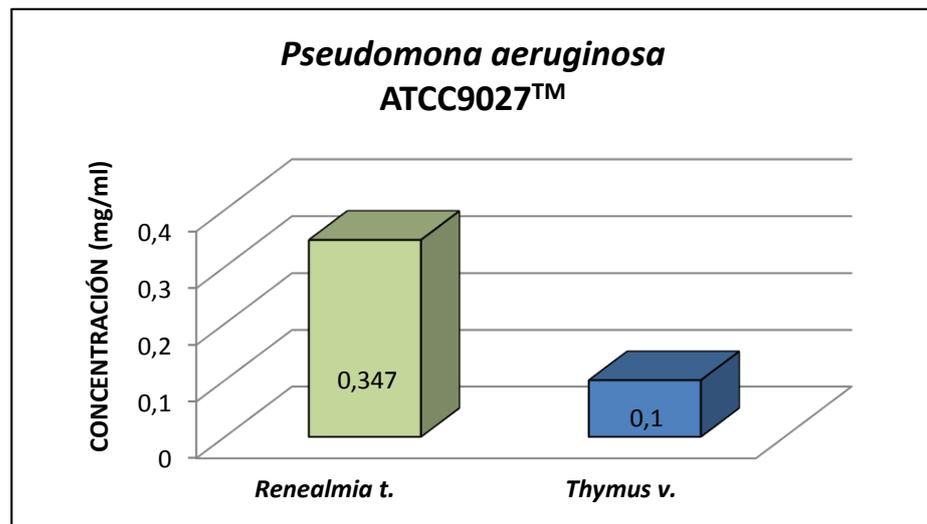


Fuente: J Basantes & A. Trujillo

**Figura 35.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias Gram (-) *Escherichia coli* ATCC8739<sup>TM</sup> y *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027<sup>TM</sup> frente a los aceites esenciales de las hojas de *Renealmia thyrsoidea* subespecie *Thyrsoidea* y *Thymus vulgaris*.

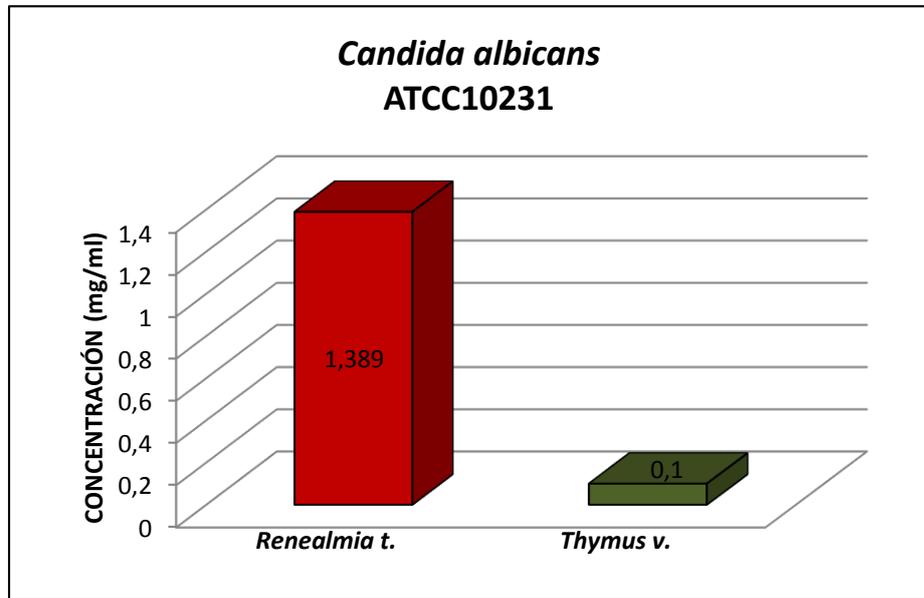


Fuente: J Basantes & A. Trujillo

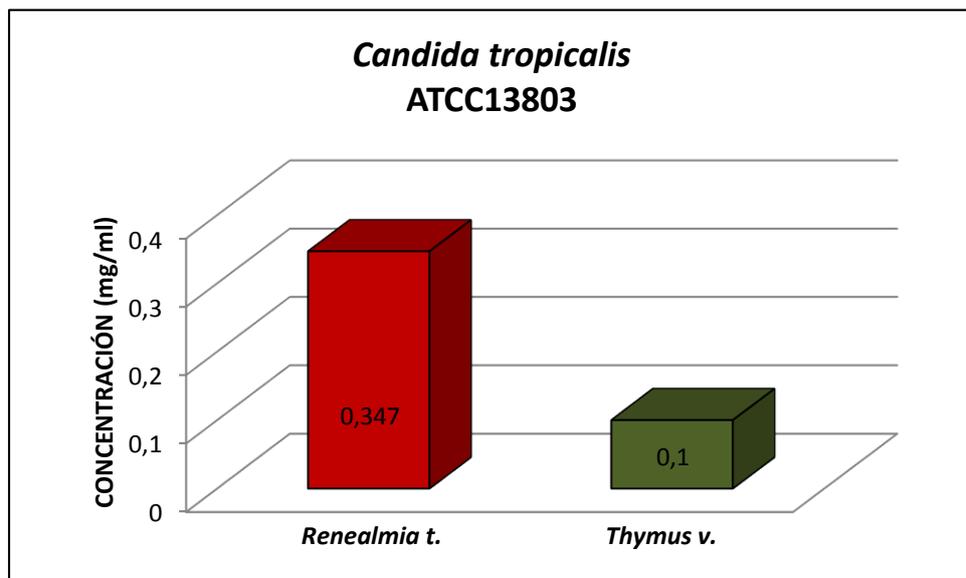


Fuente: J Basantes & A. Trujillo

**Figura 36.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de levaduras *Candida albicans* ATCC10231 y *Candida tropicalis* ATCC13803 frente a los aceites esenciales de las hojas de *Renealmia thyrsoides* subespecie *Thyrsoidea* y *Thymus vulgaris*.



Fuente: J Basantes & A. Trujillo

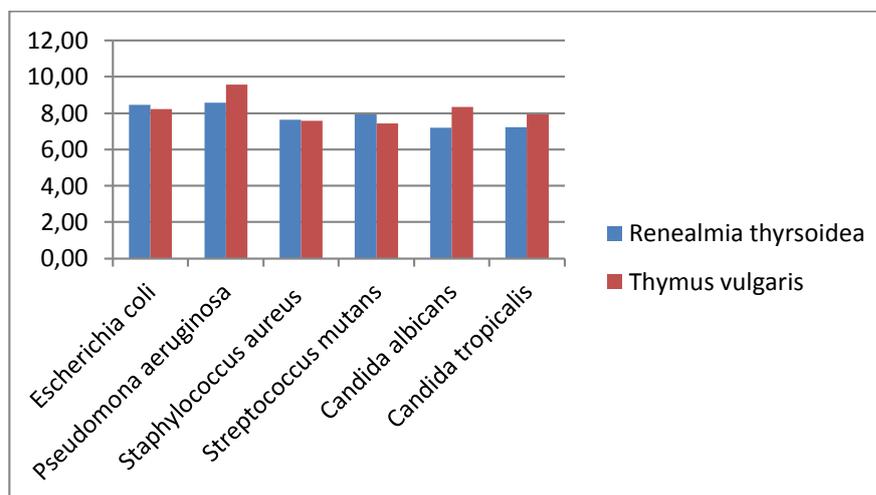


Fuente: J Basantes & A. Trujillo

**Tabla 22.** Promedio de halos de inhibición de los m.o. frente a los AE.

AE \ m.o.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Renealmia thyrsoidea</i>	8,45	8,58	7,64	7,94	7,20	7,23
<i>Thymus vulgaris</i>	8,23	9,58	7,58	7,42	8,33	7,94

NOTA: J Basantes& A. Trujillo



**Figura 37.** Promedio de halos de inhibición de los m.o. frente a los AE.

Fuente: J Basantes& A. Trujillo

**Tabla 23.** Promedio de halos de inhibición de los m.o. frente al blanco positivo (antibiótico).

microorganismos	Bacterias: GENTAMICINA				Levaduras: FLUCONAZOL	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
aceites esenciales						
<i>Renealmia thyrsoidea</i>	17,6	20,1	20,1	19,3	22,7	23,3
<i>Thymus vulgaris</i>	18,7	20	19,1	18,2	21,9	26,8

NOTA: J Basantes& A. Trujillo

**Tabla 24.** Cuadro de resultados de la actividad antimicrobiana CMI expresada en concentración (mg/ml)

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>AE de las hojas de <i>Renalmia thyrsoides</i> (mg/ml)</b>	<b>AE de <i>Thymus vulgaris</i> (mg/ml)</b>
<b>GRAM (-)</b>		
<i>Escherichia coli</i> ATCC8739 <sup>TM</sup>	0.347	0.1
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC9027 <sup>TM</sup>	0.347	0.1
<b>GRAM (+)</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P <sup>TM</sup>	1.389	0.39
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	5.558	0.1
<b>LEVADURAS</b>		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	1.389	0.1
<i>Candida tropicalis</i> ATCC13803	0.347	0.1

NOTA: J Basantes & A. Trujillo

## CONCLUSIONES

- El volumen obtenido de AE de las hojas de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* mediante destilación por arrastre de vapor refleja un buen porcentaje de rendimiento, siendo éste de 26 mL.
- Al evaluar los parámetros de calidad se determinó que el AE posee un olor característico a tierra por la presencia de terpenos en su composición, además de exhibir un color amarillo intenso.
- La composición química del aceite esencial de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* fue determinada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, demostrando la presencia de terpenos y otros compuestos derivados. Siendo los predominantes: silvestreno, canfeno, aristolocheno y nerolidol.
- A partir de las pruebas realizadas para evaluar la actividad antioxidante; DPPH test y el ensayo de ABTS se determinó que el AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides* posee un IC<sub>50</sub> de 20,86 mg/ml y 1,33 mg/ml respectivamente para cada análisis. Mientras que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* presentó un IC<sub>50</sub> de 2,4 mg/ml y 2,92 mg/ml; partiendo de la relación inversamente proporcional para calcular los valores antes mencionados, se concluye que el AE evaluado posee una discreta actividad antioxidante frente al AE usado como referente.
- El IC<sub>50</sub> de las cepas de bacterias obtuvo una mejor respuesta frente al IC<sub>50</sub> del referente natural (AE de *Tymus vulgaris*).
- La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de difusión de disco, posteriormente se calculó la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) la cual reflejó que las bacterias Gram (-) *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan un halo de inhibición en una concentración de 0,347 mg/mL, frente al referente natural (AE de *Thymus vulgaris*) con un valor de

0,1 mg/mL; demostrando que el AE estudiado (*Renelamia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*) muestra una actividad antimicrobiana considerable.

Para las levaduras *Candida albicans* y *Candida tropicalis* la CMI mostró un halo de inhibición en porcentaje de concentración de 1,389 mg/ml y 0,347 mg/ml correspondientemente, frente al referente natural que arrojó una CMI 0,1 mg/mL en ambos procesos, mostrando menor porcentaje de actividad antimicrobiana que las bacterias Gram (-).

Finalmente las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* no registran halos de inhibición en concentraciones de AE de *Renelamia thyrsoidea* subespecie *thyrosidea* demostrando que la actividad antimicrobiana es imperceptible frente al referente natural.

- La evaluación del antibiótico (gentamicina) frente a los AE de *Renelamia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* y *Thymus vulgaris* tuvieron mayor potencial cuando fueron enfrentados a *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, mostrando un halo de inhibición de: 20,075 y 20,125 mm respectivamente para el primer AE, mientras que para el otro AE mencionado, los halos fueron de: 20,05 mm y 19,1 mm.
- En el caso de las levaduras, los halos que mostraron mayor inhibición al antibiótico (fluconazol) fueron los enfrentados a *Candida tropicalis* con 23,35 mm con el AE de *Renelamia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea*. Y el halo para *Thymus vulgaris* frente al mismo antibiótico fue 26,8 mm.
- Al comprobar que la actividad antimicrobiana es alta, podría considerarse el uso del AE de *Renelamia thyrsoidea* subespecie *thyrsoidea* en formulaciones fitofarmacéuticas.

## RECOMENDACIONES

- Se podría evaluar otras especies de patógenos Gram (+), para probar la actividad biológica de los aceites esenciales.
- Se debería realizar estudios de las diferentes especies de *Renalmia* para un análisis de sus componentes químicos y así diversificar los beneficios de uso cosmético, farmacéutico, etc.
- En posteriores investigaciones, realizar estudios ecológicos de la especie *Renalmia* con la finalidad de proponer una explotación herbórea sostenible.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Ariza, Oscar. Estudio de la composición química de la fragancia de las flores de *posoqueria latifolia*, utilizando diferentes técnicas de extracción. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias Escuela de Química Bucaramanga. 2008.
- Berdonces. (1995). Las plantas medicinales hoy día. *Natura Medicatrix. Ecología aplicada* .
- Bernard, C.B; Chauret, D y otros. Insecticidal defenses of piperaceae from the neotropics. En: *Journal of Chemical Ecology*. Vol 21. No 6. 1995. pag 801- 811.
- Beyra. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey. *Anales del Jardín Botánico de Madrid [en línea]* .
- Cajas, C. Novillo, J. Peña, M & Vizuete, J.C. 2010. Plan Piloto de Restauración del Bosque Seco Tropical Alterado por la Minería en el Bosque Protector Cerro Blanco, parroquia Chongón, provincia del Guayas. Ecuador.
- Calle, Melania. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos. Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Máster en producción vegetal y ecosistemas agroforestales. Control de la germinación in vitro de *Araujia sericifera* con aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Myrtus communis*, *Citrus sinensis* y *Citrus limon*. 2010
- Callejas, Paulo. Obtención de extractos etanólicos de plantas en medios acuosos. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. 2001.
- Cañadas, L. 1983. El Mapa Bioclimático y Ecológico del Ecuador. MAG – PRONAREG. Quito. Cerón, C.E. 2003. Manual de Botánica Sistemática, Etnobotánica y métodos de estudio en el Ecuador. Herbario “Alfredo Paredes” QAP, Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador
- Ciccio, José F; Ballesteros Cynthia M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *piper aduncum* (piperaceae) de Costa Rica. En: *International Journal of Tropical Biology and Conservation*. Vol 15. No 2. Junio 1997. pag 783-790.

- Coloma, L. A.; Quiguango-Ubillús, A.; Ron, S. R. 2000-2008. Reptiles de Ecuador: lista de especies y distribución. Crocodylia, Serpentes y Testudines. [en línea]. Ver.1.1.1. 25 Mayo 2000. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.  
<http://www.puce.edu.ec/zoologia/vertebrados/reptiliawebec/reptilecuador/index.html>
- De La Torre, L., H. Navarrete, P. Muriel M., M.J. Macía & H. Balslev (eds.). 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- EcoCiencia.2000. Aves del Choco Ecuatoriano, diversidad y tradiciones orales. EcoCiencia. Quito – Ecuador.
- Gamazo, Carlos y otros. (2005) Manual Práctico de Microbiología. Universidad de Navarra - Pamplona. Departamento de Microbiología y Parasitología. Editorial Masson. Tercera edición.
- García, P. (s.f.). *Microbiología Clínica Práctica*. Cadiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cadiz, Segunda Edición.
- Getry, A. 1993. A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on herbaceous taxa. Conservation International, Department of Conservation Biology. Washinton, DC. USA.
- Gupta, M.P. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello-CYTED-SECAB. Santa fé de Bogotá. Colombia. 1995.
- Gutiérrez M. y Droguet M., (2002), *La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de compuestos causantes del mal olor*, Universidad Politécnica de Cataluña. Extraído el 8 de Febrero de 2012. Disponible en:  
<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf>
- Harris, D. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. New York: Reverté.

- Herrera, C. (2003). *Química de los alimentos*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Kiritsakis A. y Markakis P. (1978). *Olive oil: a review. Advance in food research. Vol. 31.*
- Lamarque, A. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*. Córdoba: Encuentro.
- Maia, J.G.S., M.G.B. Zohhbi, E.H.A. Andrade, A.S. Santos, M.H. L. da Silva, A.I.R. Luz, C.N. Bastos, and M.H.L. da Silva. 1998. Constituents of the essential oil of *Piperaduncum* L. Growing wild in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal* Vol 13. N°4. Pág 269-272.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Murga, J. (2012). *Química orgánica general*. Castellón: Low Cost Books.
- Noriega, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *Revista la Granja*. Vol. 10.
- Paloma, B. (2013). *Química Orgánica Avanzada*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Pokorny, J. Yanishlieva, N. Gordón, M. (2001) *Antioxidants in Food: Practical Applications*; CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge
- Restrepo, León Jaime (2006) *Aceites vegetales*, Colombia. En línea: <http://higuerillo.blogspot.com>
- Rebolo, S. (2012). *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos*. Santiago de Compostela: Universidad Santiago de Compostela.
- Rivas, K. &. (2011). Importancia de los Aceites como Agentes Farmacológicos. *El Universitario del Chocó*, .
- Santamarina, M. (1997). *Biología y Botánica*. Valencia: Colección Libro Docente

- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá: Quebecor - Impreandes.
- Sies, H.(1997) Oxidative stress: oxidant and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (2):291-5.
- Vargas, M. (2002). *Ecología y Biodiversidad del Ecuador*. Quito.
- Vovides, A. (1993). *Familia Zingiberaceae*. Mexico: Instituto de Ecología.
- Zekaria, Dan. Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. (En línea), lugar de publicación desconocido, fecha de publicación desconocida. (Citado 20-10-2010). Laboratorios Calier. Formato pdf. Disponible en internet:  
[http://www.calier.es/pdf/Microsoft\\_Word\\_\\_Aceites\\_esen\\_como\\_promotores](http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word__Aceites_esen_como_promotores).

## ANEXOS

**Anexo 1.** Certificado correspondiente a la especie vegetal en estudio avalado por el Herbario “Alfredo Paredes” de la Universidad Central de Ecuador



**Herbario “ALFREDO PAREDES” QAP**  
Escuela de Biología, Universidad Central del Ecuador  
Entre la Av. Américo y Carvajal, Ciudadela Universitaria, Edif. Facultad de Filosofía,  
Torre Norte, sexto piso Ap. Postal 17.01.2177, E-mail: carlosceron57@hotmail.com  
Telf.: 2547212 Quito - Ecuador

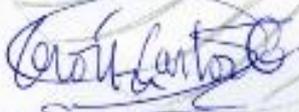
**CERTIFICACIÓN**

A quién corresponda:

La presente es para señalar que la muestra de planta remitida por las señoritas Sandra Elizabeth Suárez Cedillo y Giselle Alejandra Almeida Velasco como parte de su tesis: Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial del rizoma de *Renealmia thyrsoides* (Zingiberaceae) de la Universidad Politécnica Salesiana, corresponde a la especie *Renealmia thyrsoides* subsp. *thyrsoides* de la familia Zingiberaceae. Un duplicado de dicha muestra respectivamente etiquetada se encuentra depositado en nuestro Herbario.

Doy fe que lo expresado en este escrito es verdad.

Atentamente,



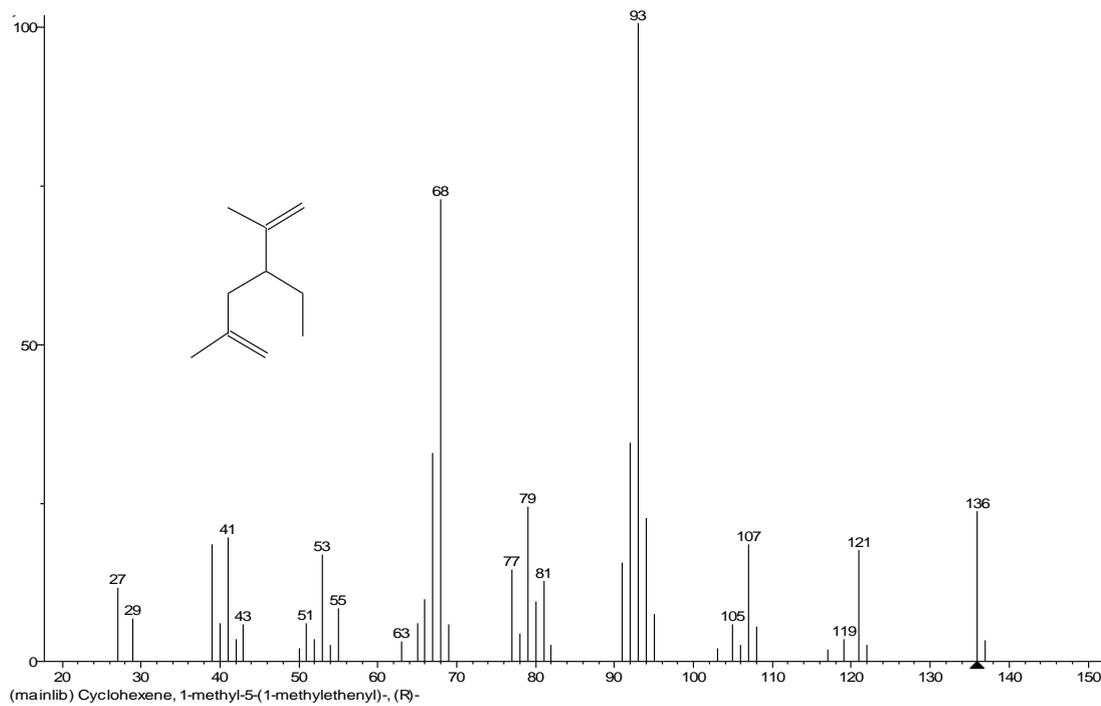
Dr. Carlos E. Cerón Martínez MSc.  
DIRECTOR AD-HONOREM DEL HERBARIO  
ALFREDO PAREDES (QAP)

Quito DM, octubre 22 del 2012

**Fuente:** Alejandra Almeida y Sandra Suárez

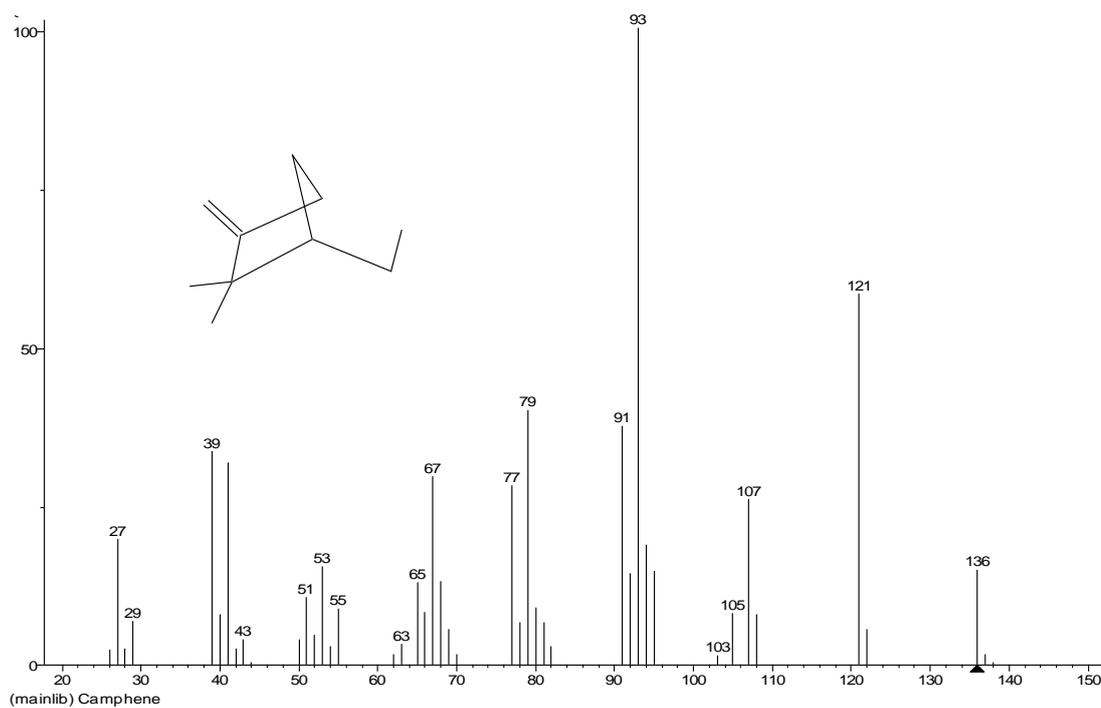
**Anexo 2.** Cromatogramas obtenidos de la base de datos de GC/MS de los compuestos con mayor porcentaje.

**Silvestreno**



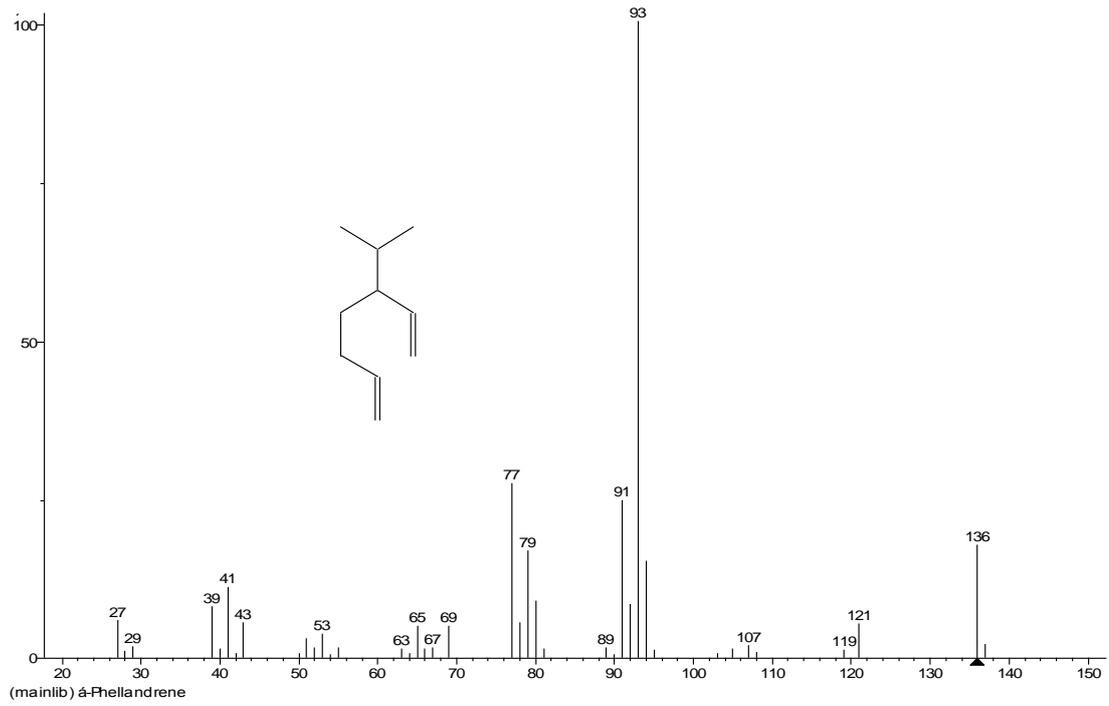
Fuente: CIVABI

**Canfeno**



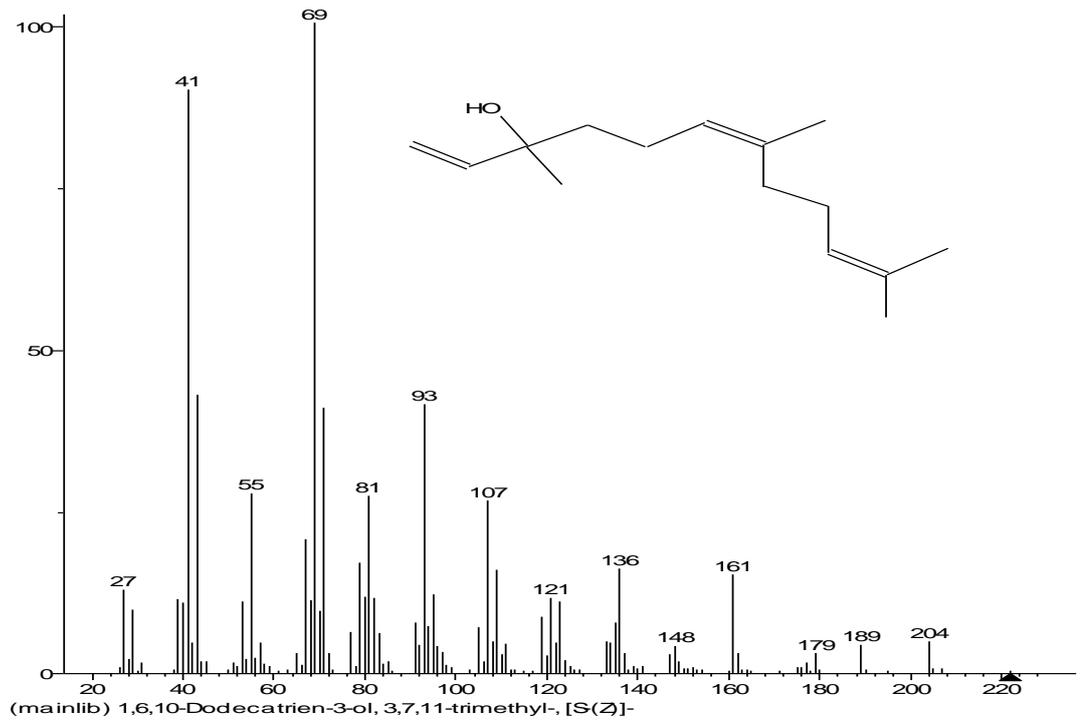
Fuente: CIVABI

**Felandreno**



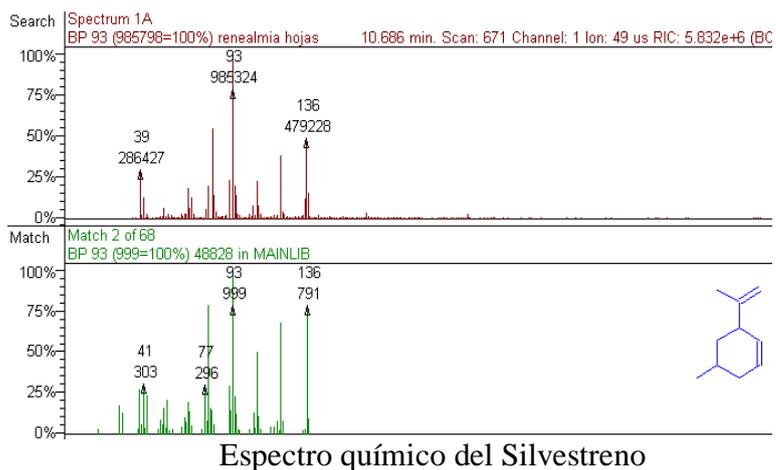
Fuente: CIVABI

**Nerolidol**

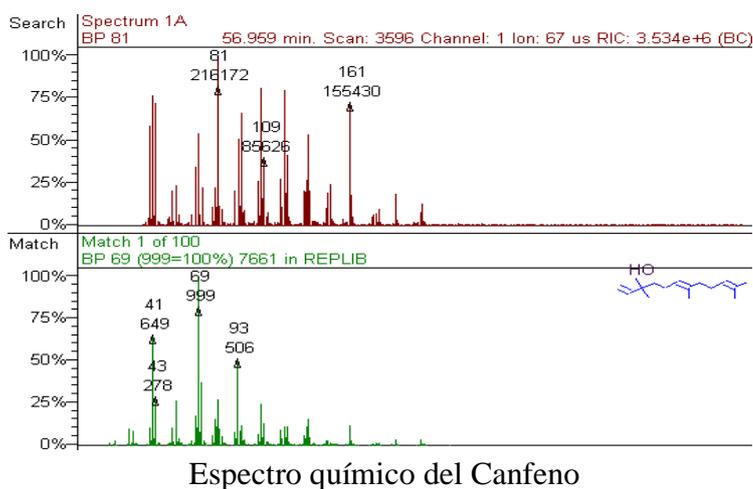


Fuente: CIVABI

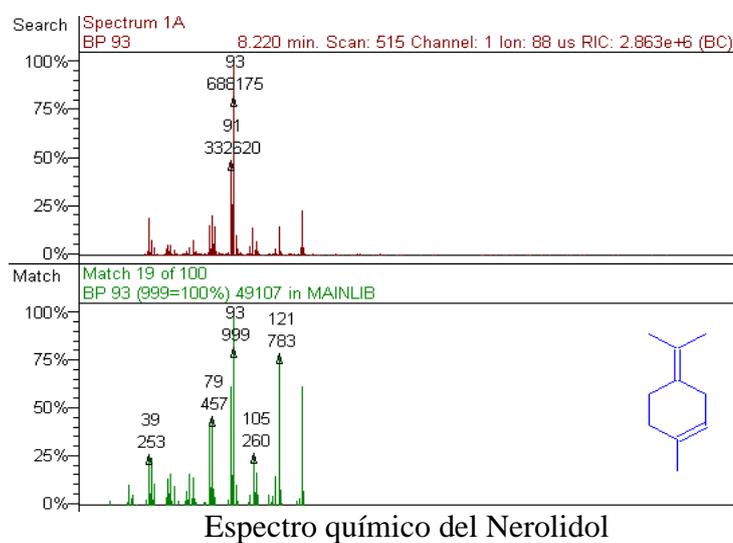
### Anexo 3. Estructura química de los espectros encontrados en GC/MS



Fuente: CIVABI, 2015



Fuente: CIVABI, 2015



Fuente: CIVABI, 2015

**Anexo 4.** Fotografías del proceso de recolección y destilación del A.E. de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*.



Planta de *Renealmia thyrsoides*



Recolección de material vegetal de *Renealmia thyrsoides*

**Fuente:** J. Basantes & A. Trujillo



Proceso de destilación del A.E. de la planta de *Renealmia thyrsoides*



Obtención de aceite esencial

**Fuente:** J. Basantes & A. Trujillo

**Anexo 5.** Ensayos DPPH y ABTS test para la determinación de la actividad antioxidante del A.E. de las hojas de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*.



Preparación de reactivos  
DPPH, ABTS Y BHA



Preparación de soluciones de A.E de  
*Renalmia thyrsoides* + DMSO

**Fuente:** J. Basantes & A. Trujillo



Adición de reactivo DPPH en  
soluciones de *Renalmia thyrsoides*  
(A.E.+DMSO)



Adición de reactivo ABTS en  
soluciones de *Renalmia thyrsoides*  
(A.E.+DMSO)

**Fuente:** J. Basantes & A. Trujillo



Adición de BHA en soluciones de *Renalmia thyroidea* (A.E.+DMSO)



Agitación de soluciones en Shaker

Fuente: J. Basantes & A. Trujillo



Lectura en espectrofotómetro DPPH Longitud de onda 517nm



Lectura en espectrofotómetro. DPPH Longitud de onda 517nm

Fuente: J. Basantes & A. Trujillo

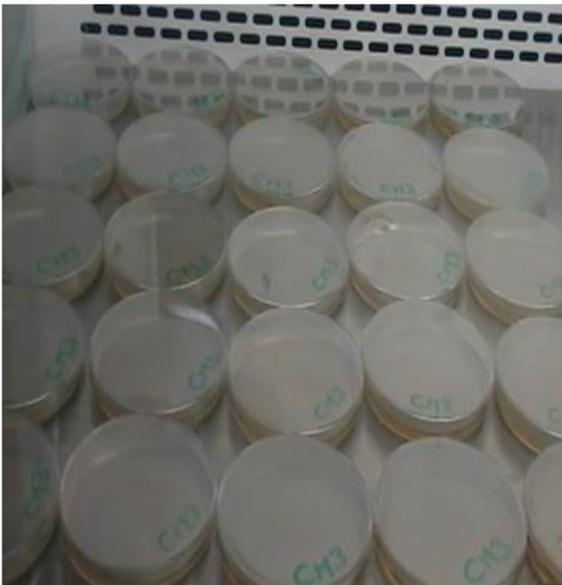
**Anexo 6.** Fotografías de la actividad antimicrobiana



Preparación de medios TSA, CM<sub>3</sub>, SDA, TSB, suero fisiológico



Esterilización de medios de cultivo y materiales



Distribución del medio en cajas petri



Etiquetado de las cajas con agar para el almacenamiento y refrigeración

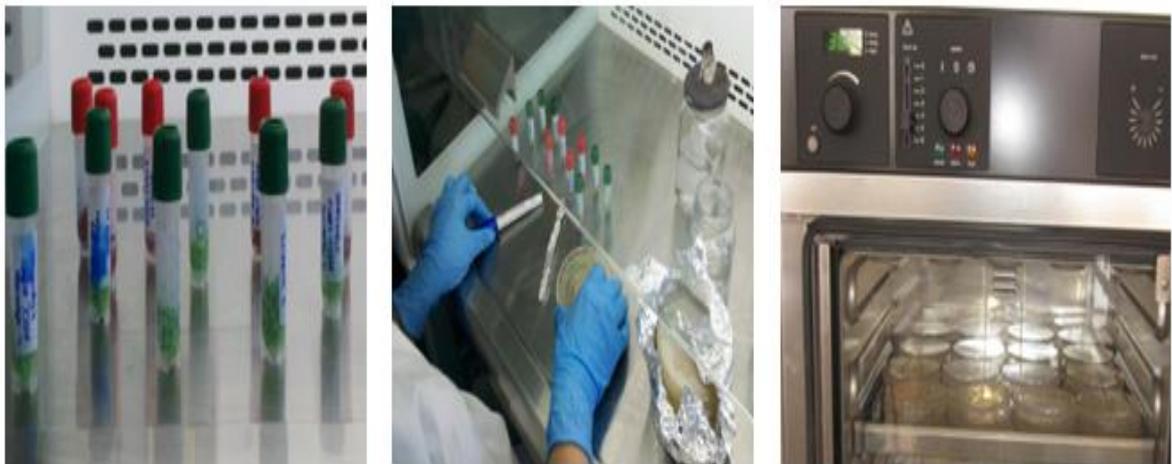
**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

## Elaboración de las soluciones de A.E. + DMSO



**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo

## Revitalización de las cepas almacenadas en cryobanks



**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo

## Absorbancia del inóculo bacteriano



Inóculo



Centrifugar durante  
20' a 3500 r/m



Obtención del  
pellet



Resuspender el pellet  
en suero fisiológico



Agitar



Agregar suero hasta  
obtener una  
turbidez uniforme



Colocar la solución  
en la celda



Medir la  
absorbancia

**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

## Siembra del inóculo en placas petri



Inóculo idóneo para sembrar



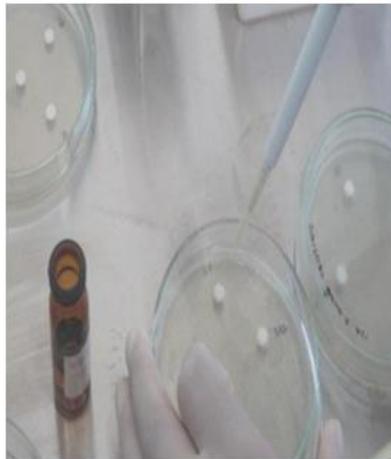
Hisopo sumergido en el inóculo



Sembrar frotando y rotando a 60°



Colocar discos de antibiótico en la caja petri



Colocar las concentraciones de AE

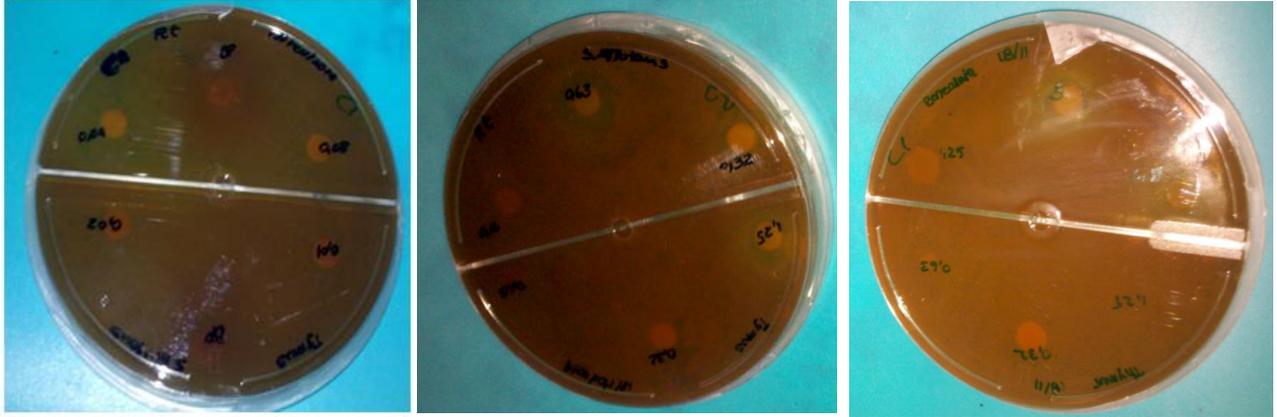


Incubar según especificaciones para cada m.o.

**FUENTE:** J. Basantes & A. Trujillo

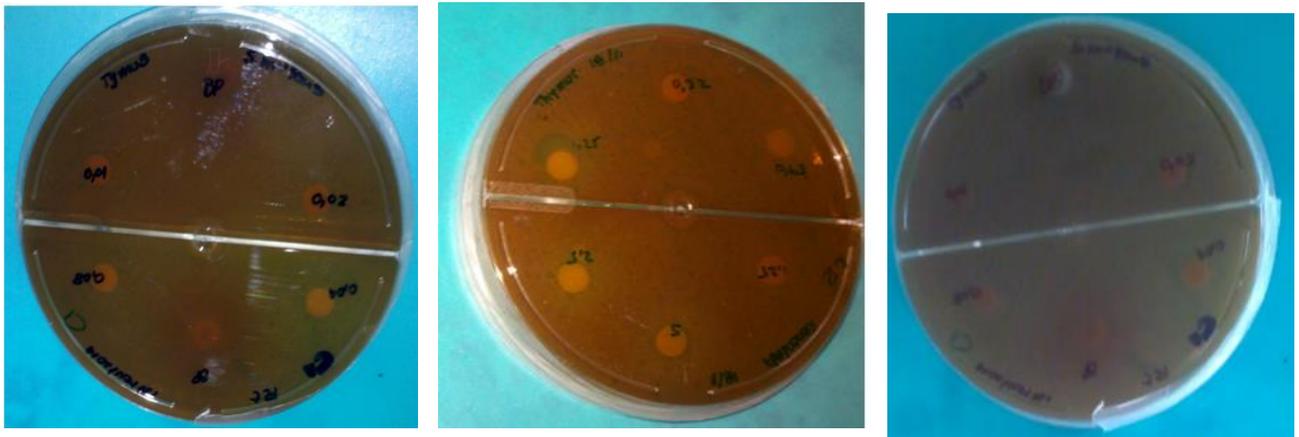
Anexo 7. Lectura de halos de inhibición

**BACTERIAS GRAM (+)**



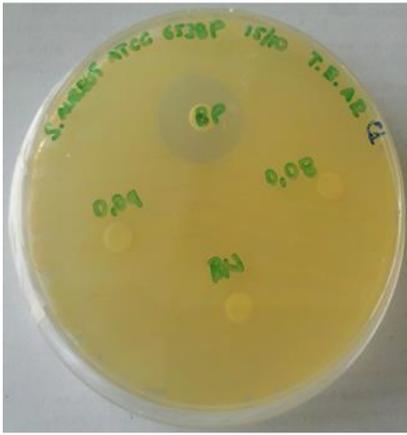
Halos de inhibición de *Streptococcus mutans* con AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Streptococcus mutans* con AE de *Thymus vulgaris*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con AE de *Renalmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*

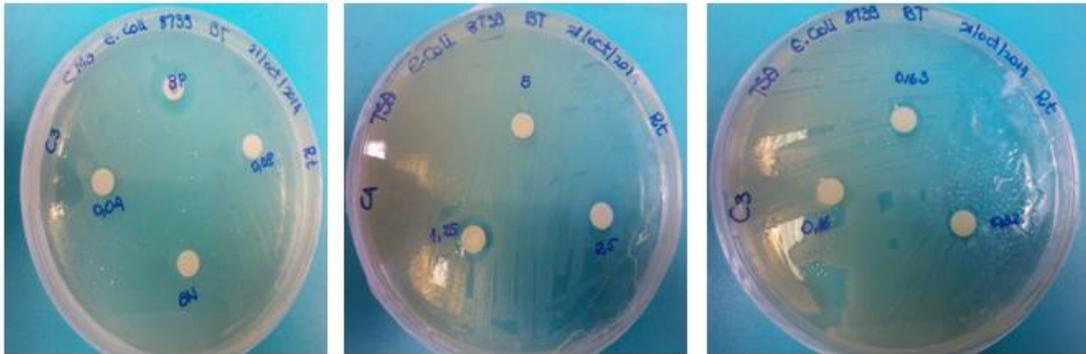
FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con AE de *Thymus vulgaris*

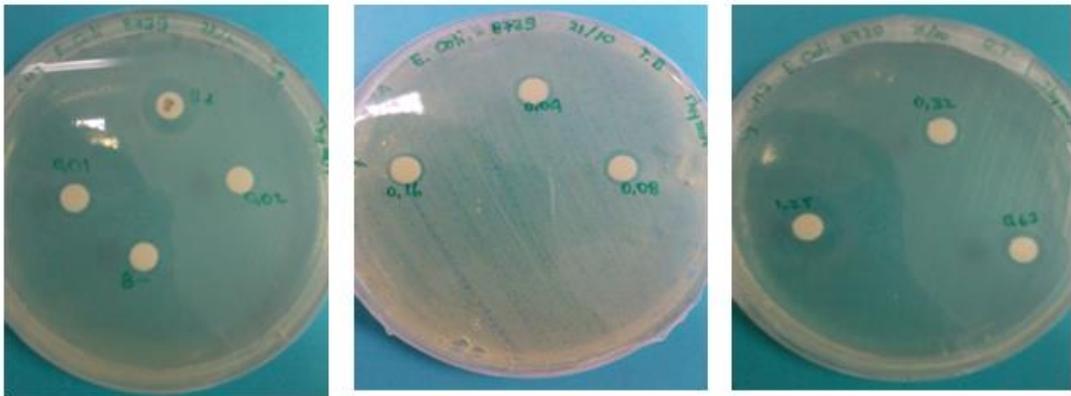
FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

## BACTERIAS GRAM (-)



Halos de inhibición de *Escherichia coli* con AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*

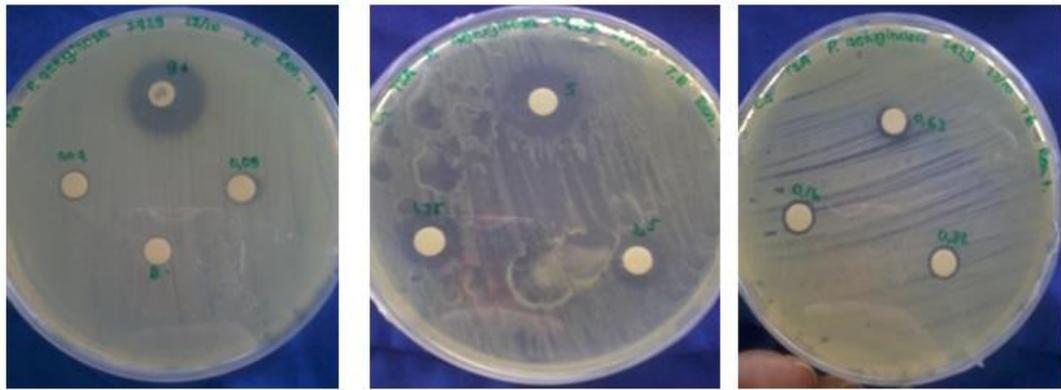
FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo



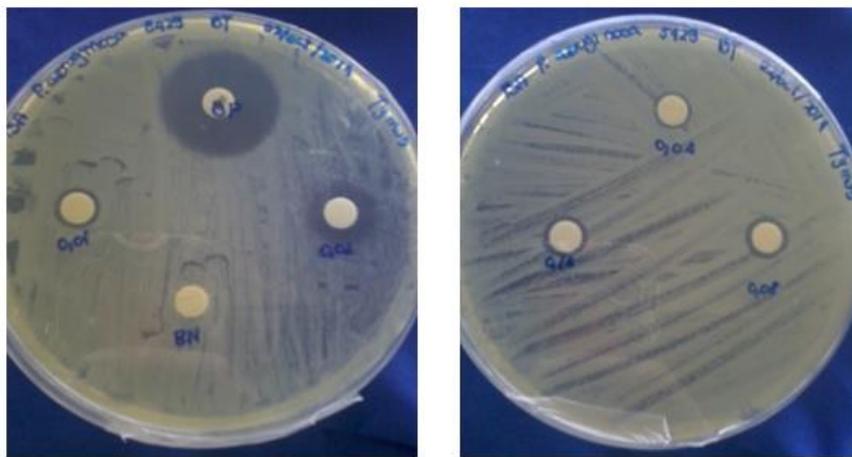
Halos de inhibición de *Escherichia coli* con AE de *Thymus vulgaris*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

Halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* con AE de *Renealmia thyrsoides*  
subespecie *thyrsoides*



FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* con AE de *Thymus vulgaris*

FUENTE: J. Basantes & A. Trujillo

## LEVADURAS



**Figura.** Halos de inhibición de *Candida albicans* con AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*

**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Candida albicans* con AE de *Thymus vulgaris*

**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Candida tropicalis* con AE de *Renealmia thyrsoides* subespecie *thyrsoides*

**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo



Halos de inhibición de *Candida tropicalis* con AE de *Thymus vulgaris*

**FUENTE:**J. Basantes & A. Trujillo