

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS
EXTRACTOS Y DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDOS DE *Lippia
origanoides* H.B.K. CULTIVADA EN EL QUINDÍO”**

**JULIETH HENAO GALLEGO 75648
LEIDY JOHANNA MUÑOZ 78023**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
ARMENIA
2009**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS
EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE *Lippia origanoides*
H.B.K. CULTIVADA EN EL QUINDÍO”**

**JULIETH HENAO GALLEGO 75648
LEIDY JOHANNA MUÑOZ 78023**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
Químico.**

**Dirigido por:
LEONARDO PADILLA SANABRIA M. Sc.
EUNICE RÍOS VÁSQUEZ M. Sc.**

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
DISEÑO DE NUEVOS PRODUCTOS D.N.P.**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
ARMENIA
2009**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiar nuestros caminos, por ser la base de nuestras vidas, y por iluminarnos para lograr nuestros propósitos.

A nuestras familias, por darnos la grandiosa oportunidad que pocos tienen en la vida, formarnos profesionalmente, brindándonos el apoyo necesario para salir adelante y no rendirnos a mitad del camino.

A Leonardo Padilla y Eunice Ríos, nuestros directores de tesis, con su paciencia y total entrega, brindándonos sus conocimientos, para formarnos no solo como profesionales sino como personas.

A las personas que siempre estuvieron colaborándonos en la realización de nuestro proyecto, Carolina López, Roberto Arrubla, Jorge Iván Sierra, Milton Gómez, Alba Duque, Clara Mejía, Germán Giraldo, a nuestros profesores durante la carrera.

A nuestros compañeros de laboratorio, por su compañía y amistad, aunque algunos ya no estén, David León, Angélica Moreno, Alexander Velásquez, Deiby Beltran, Juliana Jaramillo, Patricia Pianda.

A nuestros amigos, por todos los momentos compartidos, las alegrías y por permitirnos crecer a su lado como seres humanos y profesionales, Cristian Villa, Jhon Nieto, Ana María Vásquez, Jennifer González, Lina Mosquera, Paulo Díaz, Phanor Vásquez, Odulfo Ladino, Gina Mejía, Natalia Carvajal, Laura Ávila, Claudia Restrepo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con el desarrollo de nuestro proyecto.

DEDICATORIA

A Dios, quien sostiene mi vida y me lleva por el camino del bien, en mis crisis y en mis alegrías, A mis padres y a mi hermano por su incondicional apoyo, porque les debo todo cuanto soy, y a la memoria de mi abuelo, quien me dio el valor y la fuerza para alcanzar este logro.

Julieth Henao Gallego

Dedico este proyecto y toda mi carrera universitaria a Dios, a mi madre Melba y a mi tía Almeida por ser quienes han estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten, ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, pues fueron los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, les debo todo, horas de consejos, de regaños, de tristezas y de alegrías de las cuales estoy muy segura que las han hecho con todo el amor del mundo que junto con mis tías Marina y Magda han ayudado a formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgullosa, a mi hermanito Juan David el cual siempre ha estado a mi lado, en los ratos tristes y alegres, simplemente por ser como es, con todas sus manías y defectos, con todas sus virtudes y bellezas, a Diego por caminar a mi lado durante todo este tiempo y a por enseñarme con una sonrisa a no desfallecer.

Leidy Johanna Muñoz

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
TABLA DE CONTENIDO	iii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ESQUEMAS	xi
INTRODUCCIÓN	4
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. OBJETIVOS	8
3.1.GENERAL	8
3.2.ESPECÍFICOS	8
4. ANTECEDENTES	9
5. MARCO TEÓRICO	11
5.1. <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	11
5.1.1. Descripción botánica	11
5.1.2. Clasificación taxonómica	12
5.1.3. Composición química	12
5.1.4. Usos tradicionales	12
5.1.5. Nombres comunes	13
5.2.LOS ACEITES ESENCIALES	13
5.2.1. Definición	13
5.2.2. Usos	13
5.2.3. Composición	13
5.2.4. Métodos de extracción	14

5.2.5. Factores que influyen en la extracción	15
5.2.6. Métodos de reconocimiento y análisis	15
5.2.7. Caracterización espectral	17
5.3. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR	17
5.3.1. Taninos	17
5.3.2. Flavonoides	18
5.3.3. Quinonas	19
5.3.4. Carotenoides	19
5.3.5. Esteroles	19
5.3.6. Glicósidos cardiotónicos	20
5.3.7. Saponinas y sapogeninas	21
5.3.8. Sesquiterpenlactonas	21
5.3.9. Cumarinas	22
5.3.10. Alcaloides	22
5.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN FITOQUÍMICOS	23
5.4.1. Extracción por Soxhlet	23
5.4.2. Lixiviación o percolación	23
5.5. SEPARACIÓN CUALITATIVA POR TLC	23
5.6. SEPARACIÓN CUANTITATIVA COLUMNA	24
5.7. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA	24
5.7.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible	24
5.7.2. Espectroscopía Infrarroja	25
5.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	25
5.8.1. Antibiograma	25
5.8.2. Pruebas de sensibilidad	25
5.8.3. Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	26
5.8.4. Medio de cultivo	26
5.8.5. Bacterias Gram-negativas	27
5.8.6. Bacterias Gram-positivas	28
5.8.7. Levaduras	29
5.9. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL ₅₀	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1. MATERIAL VEGETAL	30
6.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	30
6.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y ETÉREO	30
6.3.1. Desengrase del material vegetal y obtención del extracto apolar	30
6.3.2. Obtención del extracto polar	30
6.3.3. Separación de clorofilas del extracto polar	30
6.3.4. Percolación del material vegetal	30

6.3.5. Pruebas fitoquímicas preliminares	30
6.4. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	34
6.4.1. Destilación por arrastre de vapor	34
6.4.2. Hidrodestilación asistida por microondas	35
6.5. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL	36
6.5.1. Peso específico	36
6.5.2. Índice de refracción	36
6.5.3. pH	36
6.5.4. Solubilidad en soluciones etanol-agua	36
6.5.5. Solubilidad en Tween 80 y dimetilsulfóxido	36
6.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS	36
6.6.1. Espectroscopía infrarroja	36
6.6.2. Espectroscopía UV-Vis	36
6.6.3. Cromatografía CG-MS	37
6.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	37
6.7.1. Preparación del estándar de turbidez del inóculo	37
6.7.2. Preparación del inóculo	38
6.7.3. Actividad antimicrobiana de los extractos polar y apolar y los extractos de la percolación	38
6.7.4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial	39
6.8. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	39
6.9. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀)	40
6.9.1. Eclosión de los crustáceos	40
6.9.2. Preparación de las soluciones de los aceites esenciales y los extractos etéreo y etanólico	40
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	86

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

MWHD	Hidrodestilación Asistida por Microondas
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas
UFC	Unidades formadoras de colonia
CMI	Concentración mínima inhibitoria
TLC	Cromatografía en capa delgada
<i>Et al.</i>	<i>et alius</i> / y otros
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
m.s.m.n.	Metros sobre el nivel del mar
μL	Microlitro(s)
mm	Milímetro(s)
D.A.V.	Destilación por Arrastre con Vapor
min.	Minutos
h	Horas
g	gramos
w/w	Peso a peso
nm	Nanómetros

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica realizada por el herbario de la Universidad del Quindío	12
Tabla 2.	Composición química de <i>Lippia origanoides</i> según Castañeda et al (2007)	12
Tabla 3.	Escala de McFarland	37
Tabla 4.	Concentraciones de aceite esencial a evaluar con células VERO	40
Tabla 5.	Contenido de humedad de las hojas de <i>L. origanoides</i> , para dos jornadas de recolección	43
Tabla 6.	Pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 6:00 a.m.	44
Tabla 7.	Pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 4:00 p.m.	45
Tabla 8.	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con hexano	47
Tabla 9.	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con diclorometano	48
Tabla 10.	Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con etanol	49
Tabla 11.	Porcentajes de rendimiento del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> , con hojas frescas y secas, recolectadas a las 6:00 a.m. y a las 4:00 p.m. por el método de DAV	51
Tabla 12.	Porcentajes de rendimiento del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> , con hojas frescas y secas, recolectadas a las 6:00 a.m. y a las 4:00 p.m. por el método de MWHD.	53
Tabla 13.	Propiedades físicas del aceites esencial de <i>Lippia origanoides</i>	55
Tabla 14.	Solubilidad del aceite esencial en mezclas etanol-agua de diferentes concentraciones.	55
Tabla 15.	Solubilidad del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> en diferentes concentraciones de Tween 80 y Dimetilsulfóxido	56
Tabla 16.	Longitudes de onda máximas obtenidas del espectro UV del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> .	57

Tabla 17.	Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> extraído por D.A.V. con hojas secas, empleando CG-MS	60
Tabla 18.	Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> extraído por D.A.V. con hojas frescas picadas, empleando CG-MS	60
Tabla 19.	Diámetros de los halos de inhibición de los extractos polar y apolar por el método de difusión en disco.	63
Tabla 20.	Diámetros de los halos de inhibición de los extractos obtenidos por percolación utilizando el método de difusión en disco.	64
Tabla 21.	Zonas de inhibición del crecimiento en mm de los microorganismos con el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	67
Tabla 22.	Diámetros de los halos de inhibición de aceite esencial sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.	70
Tabla 23.	Valor de R _f para la fracción separada por CCD con hexano	71
Tabla 24.	Valores de R _f de las fracciones separadas por CCD con hexano - acetato de etilo (4:1)	71
Tabla 25.	Análisis fitoquímico de las fracciones separadas por métodos cromatográficos	72
Tabla 26.	Longitudes de onda máximas obtenidas del espectro UV de la fracción B1	72
Tabla 27.	Tamaño de los halos de inhibición de la fracción B1 por el método de difusión en disco	73
Tabla 28.	Lectura de larvas muertas en el aceite esencial	75
Tabla 29.	Análisis del probit aceite esencial 6 horas	75
Tabla 30.	Análisis del probit aceite esencial 12 horas	76
Tabla 31.	Análisis de Probit aceite esencial 24 horas	77
Tabla 32.	Lectura de larvas muertas extracto etanólico	78
Tabla 33.	Análisis de probit extracto etanólico 24 horas	78
Tabla 34.	Análisis de probit extracto etanólico 48 horas	79
Tabla 35.	Análisis de probit extracto etanólico 72 horas	80
Tabla 36.	Lectura de larvas muertas extracto etéreo	81
Tabla 37.	Análisis de probit extracto etéreo 6 horas	81
Tabla 38.	Análisis de probit extracto etéreo 12 horas	82
Tabla 39.	Análisis de probit extracto etéreo 24 horas	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cultivo de <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	11
Figura 2.	Equipo de Destilación por Arrastre con Vapor (DAV)	35
Figura 3.	Equipo de Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHD)	35
Figura 4.	Gráfico de comparación de la extracción de aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> por el método de DAV, con hojas frescas picadas y hojas frescas enteras, recolectadas a las 4:00 p.m.	52
Figura 5.	Comparación de las extracciones del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> por el método de DAV variando el estado de las hojas y la jornada de recolección, con respecto al tiempo de extracción	52
Figura 6.	Comparación de las extracciones de aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> por el método de MWHD variando el estado de las hojas y la jornada de recolección, con respecto al tiempo de extracción.	53
Figura 7.	Comparación de las extracciones realizadas por DAV y MWHD de hojas secas recolectadas a las 6:00 a.m.	54
Figura 8.	Espectro UV del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	56
Figura 9.	Espectro I.R. del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	58
Figura 10.	Comparación con los espectros I.R. de los compuestos mayoritarios del aceite esencial a) IR del carvacrol, b) IR del timol (Fuente SBDS)	59
Figura 11.	Cromatograma del aceite esencial obtenido por DAV con hojas secas	59
Figura 12.	Espectros de masas de los compuestos mayoritarios del aceite esencial con hojas secas y hojas frescas, a) Timol; b) Carvacrol.	60
Figura 13.	Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	61
Figura 14.	Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y etéreo empleando el método de Kirby-Bauer	64

	modificado.	
Figura 15.	Perforaciones sobre el agar Mueller Hinton.	66
Figura 16.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial, utilizando Tween 80 como disolvente.	66
Figura 17.	Actividad antimicrobiana del aceite esencial con etanol al 98 % como disolvente	68
Figura 18.	Diámetros de los halos de inhibición de todos los microorganismos evaluados con respecto a la concentración del aceite esencial.	68
Figura 19.	Halo de inhibición de aceite esencial al 20% contra <i>Pseudomona aeruginosa</i> multirresistente	70
Figura 20.	Cromatograma del extracto etéreo de las 6:00 a.m. utilizando hexano como eluyente	71
Figura 21.	Cromatograma del extracto etéreo de las 6:00 a.m. utilizando una mezcla hexano - acetato de etilo (4:1)	71
Figura 22.	Espectro UV de la fracción B1	72
Figura 23.	Halo de inhibición de la fracción B1 con <i>Proteus mirabilis</i>	73
Figura 24.	Células formando monocapa	74
Figura 25.	Daños ocurridos en las células por el aceite esencial	74
Figura 26.	Efecto citotóxico del solvente en las células	74
Figura 27.	Aceite esencial, tiempo de análisis 6 horas	76
Figura 28.	Aceite esencial, tiempo de análisis 12 horas	76
Figura 29.	Aceite esencial, tiempo de análisis 24 horas	77
Figura 30.	Extracto etanólico, tiempo de análisis 24 horas	78
Figura 31.	Extracto etanólico, tiempo de análisis 48 horas	79
Figura 32.	Extracto etanólico, tiempo de análisis 72 horas	80
Figura 33.	Extracto etéreo, tiempo de análisis 6 horas	81
Figura 34.	Extracto etéreo, tiempo de análisis 12 horas	82
Figura 35.	Extracto etéreo, tiempo de análisis 24 horas	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Posibles rutas de fragmentación del Timol	61
Esquema 2.	Posibles rutas de fragmentación del Carvacrol	62

INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos en la medicina tradicional es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial en prácticamente todas las culturas. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Maguna *et al*, 2006).

Las plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables como propiedades antimicrobianas y antioxidantes, atrayendo la atención de importantes sectores de la industria farmacéutica, perfumería, cosmética, alimentos, entre otras, por sus posibles y viables aplicaciones (Acevedo *et al*, 2007).

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en las plantas son compuestos identificados, principalmente, como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas que actúan sobre las membranas de los microorganismos invasores. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Minami, 1999).

El género *Lippia* (Verbenaceae) es uno de los más importantes en el campo de la medicina natural. Consiste en aproximadamente 250 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles. La mayoría son utilizados tradicionalmente como remedios gastrointestinales y respiratorios (Pascual *et al*, 2001).

Una de las especies más destacadas de este género es *Lippia origanoides* H.B.K., conocida como “*Orégano de monte*”, nativa de algunos países de América Central y del norte de América del Sur, especialmente en la Amazonía (Oliveira *et al*, 2007). Esta especie presenta un alto contenido en timol y carvacrol, que son compuestos fenólicos, considerados como posibles antioxidantes y agentes antimicrobianos (Acevedo *et al*, 2007). El uso de *Lippia origanoides* H.B.K. en la medicina popular puede ser explicado, en parte, por los constituyentes volátiles bio-activos.

La infusión de sus hojas y flores es indicada para el tratamiento de dolor de estómago, indigestión, diarrea, acidez estomacal, náuseas, cólicos menstruales, y fiebre, así como un antiséptico general para la boca, garganta y heridas, entre otros. (Oliveira *et al*, 2007).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antibióticos han revolucionado el estado de la salud de la humanidad, permitiendo el tratamiento de muchas de las infecciones que frecuentemente pueden amenazar la vida de las personas. Sin embargo, con el incremento de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos que se encuentran disponibles en la actualidad, se hace necesaria la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana (Sarker *et al*, 2007).

La mayoría de los antibióticos disponibles en la actualidad son de origen natural, puesto que las plantas producen sustancias para protegerse de los ataques microbianos. Los estudios de plantas en el área de productos naturales, tienden a establecer relaciones entre la composición química de sus metabolitos secundarios y propiedades farmacológicas. Estas propiedades pueden variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano, hasta la acción bactericida o fungicida (Maguna *et al*, 2006).

Por esto es necesaria la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y los extractos de *Lippia origanoides* H.B.K., una planta que tradicionalmente se ha usado con fines medicinales.

2. JUSTIFICACIÓN

Los aceites esenciales son producidos por las plantas aromáticas con diversos fines, entre ellos, como mecanismo de defensa frente a agresiones externas, por lo que no sorprende que algunos de sus componentes químicos sean potentes sustancias antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Martínez *et al*, 2003).

Muchas de las drogas corrientemente usadas para tratar infecciones bacterianas y otras infecciones fueron aisladas primero de recursos naturales, incluyendo plantas etnomedicinales. Tales plantas pueden proveer nuevas fuentes de agentes terapéuticos contra múltiples bacterias resistentes a las drogas tal como el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Pesewu, 2008), y también contra las bacterias Gram-negativas, dada su particular resistencia que es atribuida, en parte, a la efectividad en sus membranas externas como barrera de permeabilidad (González *et al*, 2005).

Lippia organoides H.B.K. es una de las plantas que tiene un gran interés fitoterapéutico, pues tradicionalmente se ha utilizado, entre otros, como antiséptico (Acevedo *et al*, 2007) y para el tratamiento de diarrea y disentería (Méndez *et al*, 2007), y se tienen reportes de actividad la producción de halos de inhibición de los aceites esenciales en placas donde se han crecido bacterias Gram-negativas, hongos y levaduras (Oliveira *et al*, 2007; Méndez *et al*, 2007).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta que esta especie presenta una característica variación en la composición, sujeta a variables tales como: técnica de extracción, tratamiento o almacenamiento del material vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento (Ruiz *et al*, 2007), lo que se pretende con esta investigación es evaluar la actividad antimicrobiana, tanto del aceite esencial, como de los extractos, de las hojas de esta especie cultivada en el departamento del Quindío frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras, utilizando dos métodos diferentes de extracción, con material vegetal fresco y seco, recolectado en dos jornadas, 6:00 a.m. y 4:00 p.m.

Finalmente, los conocimientos que se adquirieran con el presente estudio son de importancia para la naciente industria colombiana de aceites esenciales, que necesita una base científica sólida y la justificación para la selección correcta de especies vegetales promisorias, su cultivo industrial, el procesamiento y la obtención de esencias, con miras a satisfacer los mercados nacional e internacional con productos de calidad garantizada y valor agregado alto. Además, el conocimiento de las propiedades químicas de los aceites esenciales y otros extractos, permite proponer a éstos productos como fuente alternativa y natural, de compuestos útiles en la industria y tecnología (cosmética, alimentos, fragancias y síntesis orgánica).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antimicrobiana de los extractos y los aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de *Lippia organoides* H.B.K. cultivada en el departamento del Quindío.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer los aceites esenciales de las hojas de *Lippia organoides* H.B.K. utilizando dos métodos de extracción (Destilación por Arrastre con Vapor, DAV, e Hidrodestilación Asistida por Microondas, MWHD), utilizando hojas recolectadas a las 6:00 a.m. y a las 4:00 p.m., tanto frescas como secas.
- Determinar la influencia de variación del método de extracción, el horario de corte de la planta (6:00 a.m. y 4:00 p.m.) y la utilización de hojas frescas y secas en el rendimiento, composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos de *Lippia organoides* H.B.K.
- Identificar de manera preliminar el o los compuestos presente(s) en los extractos que muestren actividad antimicrobiana.

4. ANTECEDENTES

Las plantas de la familia *Verbenaceae* llaman la atención de los investigadores, no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su variable uso (Stashenko, Jaramillo y Martínez, 2003). La familia *Verbenaceae* presenta alta variedad en la composición de sus aceites esenciales, de la cual se determinan sus propiedades físicas, organolépticas, químicas y biológicas, y por ende las aplicaciones comerciales de las mismas (Celis *et al*, 2007).

Dentro de esta familia, el género *Lippia* se caracteriza por reunir especies a las que se les atribuyen cualidades aromáticas. Algunas plantas del género han sido ampliamente estudiadas en relación con la composición química de sus aceites esenciales (Ruiz *et al*, 2007). Varias especies del género *Lippia* han demostrado actividades antimalárica, antiviral y citostática (Pascual *et al*, 2001). Particularmente, es de gran importancia el estudio de la especie *L. organoides*, un arbusto muy aromático, nativo de Centro y Sur América, el cual posee un gran número de propiedades curativas y ha sido ampliamente usado en la medicina tradicional. Existen básicamente dos tipos de orégano: orégano europeo (mejorana, orégano común, etc.) nativo de la región mediterránea y el orégano americano (cimarrón) (Suramérica o México) perteneciente al género *Lippia* (*L. organoides*, *L. graveolens*, entre otras), los cuales se destacan por su alto contenido de compuestos fenólicos (timol y carvacrol, 44.4 % y 14.3 % respectivamente) (Acevedo *et al*, 2007).

Lippia organoides H.B.K. es una especie caracterizada especialmente por una variabilidad en su morfología y en la composición química del aceite esencial, dependiendo del estado de desarrollo de la planta, la parte empleada para la extracción y el método empleado, la ubicación geográfica, las características fisicoquímicas del suelo y el clima (humedad, concentración de oxígeno e intensidad lumínica) donde se desarrolla la planta, entre otras. Sin embargo, al mantener algunas de estas variables constantes entre diferentes plantas comparadas, se han advertido diferencias persistentes en la naturaleza química de los metabolitos secundarios, las cuales podrían ser resultado de variaciones genéticas (Ruiz *et al*, 2007).

L. organoides, es una especie dominante en ambientes desfavorables, especialmente zonas semiáridas caracterizadas por suelos secos, pobres en nutrientes y de alta incidencia lumínica (Albesiano *et al*., 2003).

Esta especie tradicionalmente se ha empleado como antiséptico, indicado para el tratamiento de dolor de estómago, indigestión, diarrea, acidez estomacal, náuseas, desórdenes menstruales y fiebre (Oliveira *et al*, 2007). Además, es ampliamente utilizada como sazónante culinario, y para el tratamiento de enfermedades respiratorias, utilizando para este fin la infusión de sus flores y hojas (Pascual *et al*, 2001; Ruiz *et al*, 2007).

Santos *et al* (2004) presentó el primer reporte de actividad antimicrobiana de *L. origanoides*, mostrando una alta actividad contra la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, y las levaduras *Candida albicans* y *Candida tropicalis* en concentraciones superiores a las concentraciones activas para la amoxicilina, presentando una actividad cercana al 40% de la actividad del antibiótico, para cada bacteria. Presenta, además, propiedades bacteriostáticas sobre bacterias Gram-negativas de la especie *Nocardia*, ya que detiene su crecimiento pero no las inactiva permanentemente (Méndez *et al*, 2007).

Según Celis *et al* (2007), el aceite esencial de *Lippia origanoides* no presenta toxicidad alguna, lo que permite relacionar esta propiedad con la presencia de compuestos fenólicos, haciéndolo apto para el consumo humano.

Para el aceite esencial de *Lippia origanoides* se han encontrado dos quimiotipos. El quimiotipo A (típico) cuyos componentes mayoritarios son: carvacrol (36.6%), *p*-cimeno (14.0%), γ -terpineno (13.3%), timol (9.1%), y α -terpineno (3.8%); mientras que, para el quimiotipo B (atípico) los componentes mayoritarios son: *p*-cimeno (15.7%), *trans*- β -cariofileno (9.4%), α -felandreno + δ -3-careno (8.7%), limoneno (6.9%) y β -felandreno + eucaliptol (6.8%). Este último quimiotipo no había sido reportado antes en la literatura (Castañeda *et al*, 2007).

El timol exhibe múltiples actividades biológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, e inhibición de radicales libres (Bukovská *et al*, 2007).

Los rendimientos obtenidos para la extracción de los aceites esenciales de *L. origanoides* por Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHM) son de alrededor del 1% (Oliveira *et al*, 2007).

5. MARCO TEÓRICO

5.1. *Lippia origanoides* H.B.K.

5.1.1. Descripción botánica: Arbusto silvestre, delgado, muy aromático, con olor a orégano en la mayoría de quimiotipos, ocasionalmente cítrico o excepcionalmente inodoro, alcanza 3 m de longitud, muy ramificado; posee hojas verdes ovadas muy aromáticas de tamaño variable según los ambientes sean propicios, e inflorescencias en racimo, axilares verticiladas, 4-6 por axila y blancas, en 4 series, fragantes de pétalos unidos, cáliz comprimido, ovado (López, 1997; Stashenko *et al*, 2007).



Figura 1. Cultivo de *Lippia origanoides* H.B.K.

Todas las características indican que es conespecífica con *Lippia suaveolens* que crece desde el sur de E.U. hasta Guatemala (González, 2001).

En México *L. origanoides* se llama orégano, y la Farmacopea Mexicana lo reconoce como un suplente para el orégano común *L. graveolens* Kunth. Su aroma característico, tan similar al del orégano, pudo haber inspirado este nombre a Humboldt, Bondpland y Kunth (Oliveira *et al*, 2007).

5.1.2. Clasificación taxonómica:

Tabla 1. Clasificación taxonómica realizada por el herbario de la Universidad del Quindío

Reino	<i>Plantae</i>
Orden	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>Lippia origanoides</i>
Nombre común	<i>Orégano</i>

5.1.3. Composición química: El extracto de sus hojas contiene: altas proporciones de aceite esencial, carvacrol y timol, γ -terpineno, *p*-cimeno (Acevedo *et al*, 2007), en menor proporción también posee sesquiterpenos como β -cariofileno y umbelulona, además contiene α -terpineno, 1,8-cineol y timil acetato (Pascual *et al*, 2001), y ácidos fenólicos y ursólico, minerales y taninos (López, 1997).

Tabla 2. Composición química de *Lippia origanoides* según Castañeda *et al* (2007).

Especie vegetal	MT	MTO	ST	STO	PhOH	HC	OTROS
<i>Lippia origanoides</i> (típica)	25.8	3.4	3.4	0.6	46.2	14.0	6.7

MT: Monoterpenos; **MTO:** Monoterpenos oxigenados; **ST:** Sesquiterpenos; **STO:** Sesquiterpenos oxigenados; **PhOH:** Fenoles; **HC:** Hidrocarburos; **OTROS:** Otros compuestos oxigenados.

5.1.4. Usos tradicionales: Además de su uso como condimento, la infusión de sus hojas y flores se usa para el tratamiento de dolores estomacales, indigestión, descargas vaginales, y fiebre, así como antiséptico general para la boca, garganta y heridas (Oliveira *et al*, 2007). Su aceite esencial, así como sus hojas en cocimiento son carminativas y mejoran el funcionamiento gastrointestinal, posee propiedades antiespasmódicas y contra las náuseas, se utiliza además como sedante, contra resfriados, gripe, bronquitis y asma (Méndez *et al*, 2007), asimismo tiene efecto diurético, diaforético, desinfectante, emenagogo y se utiliza también contra la caspa (López, 1997). Se le atribuyen efectos de tónico estomacal, broncolítico, y se recomienda su uso en caso de espasmo y nerviosismo. Además, por su rico contenido en timol y carvacrol, se ha reportado que tiene un considerable efecto antioxidante (Montoya *et al*, 2007).

5.1.5. Nombres comunes: Orégano criollo (Venezuela), Orégano cimarrón, Orégano común, Orégano de monte (Colombia).

5.2. LOS ACEITES ESENCIALES

5.2.1. Definición: Los aceites esenciales son compuestos volátiles, de olor característico, producidos por las plantas para su supervivencia. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. Son producidos por un gran número de plantas como subproductos de su metabolismo secundario. La planta produce aceites esenciales en las flores, cáscaras (de frutas, denominados cítricos), hojas y pequeños granos ("petitgrain"), raíces, tallos, cortezas (de árboles), resinas (de las cáscaras), y semillas. Se denominan tricomas las "bolsas" donde están encapsulados los aceites esenciales en la planta. Estos tricomas son rotos naturalmente por la especie vegetal, liberando el aceite esencial, que forma una especie de "nube aromática" a su alrededor. Los tricomas también se rompen durante los procesos intencionales de extracción del aceite esencial (Nunes, 2007). Varios reportes se han enfocado en las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y de los principales monoterpenos encontrados en ellos. De hecho, muchos terpenos son conocidos por ser activos contra una amplia variedad de microorganismos, incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas y hongos (Trombetta *et al*, 2005).

5.2.2. Usos: Los aceites esenciales son sustancias químicas que ejercen las funciones de auto-defensa y de atracción de polinizadores. Su uso farmacéutico se fundamenta en sus propiedades fisiológicas: el perfume y el sabor; las propiedades desinfectantes y la acción bactericida y antibiótica (Minami, 1999; Méndez *et al*, 2007).

5.2.3. Composición: El aceite esencial no es un producto simple de un solo componente, es un producto compuesto que puede sobrepasar los 300 componentes químicos diferentes (suele poseer de diez a quince componentes principales y otros tantos muy escasos, o incluso trazas). Los análisis de los aceites esenciales muestran que, de los diferentes constituyentes, los terpenoides son los más abundantes y están presentes como hemiterpenos, monoterpenos, o sesquiterpenos, y como sus derivados. El número y tipo de componentes, así como sus proporciones, pueden experimentar importantes cambios dentro de una misma especie botánica, sea por razones ecológicas (luz, temperatura, altitud), o puramente genéticas (quimiotipos o variedades químicas). Tal diversidad y

complejidad hacen del aceite esencial puro un producto altamente valorizado, con aplicación en diversas áreas (Nunes, 2007).

5.2.4. Métodos de extracción: los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son:

5.2.4.1. Expresión: el material vegetal es sometido a presión para liberar el aceite, bien sea en prensas tipo batch ó en forma continua, y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de los cítricos. Los aceites obtenidos por este método se les comercializa como “expresión en frío” y cumplen la función de odorizantes (smell oils) y saborizantes (taste oils) (Martínez, 2003).

5.2.4.2. Destilación por arrastre con vapor de agua: la muestra vegetal, generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido, y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2003).

5.2.4.3. Extracción con solventes volátiles: la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio ya que en el ámbito industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impuras, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Martínez, 2003).

5.2.4.4. Extracción con fluidos supercríticos: es de desarrollo más reciente, el material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico, las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura (Martínez, 2003).

5.2.4.5. Enfleurage: el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa,

jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Martínez, 2003).

5.2.4.6. Hidrodestilación asistida por microondas (MWHD): Consiste en aplicar la extracción por microondas sin uso de disolventes (Microwave Assisted Hydro-Distillation o MWHD), exceptuando el agua contenida en el propio material vegetal. Se aprovecha el agua contenida en la planta para “arrastrar” al aceite esencial. Los rendimientos son similares a la hidrodestilación y el tiempo de operación es muy inferior al usado comúnmente. Las propiedades físicas del aceite obtenido por este proceso son similares a los aceites comerciales (Cerpa, 2007).

5.2.5. Factores que influyen en la extracción:

5.2.5.1. Tiempo de secado del material: El eucalipto puede durar hasta 4 meses. La limonaria, la albahaca, la menta, la citronella si quedan en arrumes, generan hongos, los que transfieren un olor terroso mohoso al aceite, debido a la formación de ácidos grasos; por esto si el material no se procesa pronto (3 días) se dispone en literas para su oreo (Sánchez, 2006).

5.2.5.2. Tiempo de extracción: pasado un tiempo ya no sale más aceite y el vapor posterior causa el arrastre por solubilidad o emulsión del aceite, presentando una disminución en el rendimiento (Sánchez, 2006).

5.2.5.3. Presión de vapor: si la presión de vapor del arrastre es muy alta (máximo 6 psi), se presenta hidrólisis en el aceite disminuyendo su calidad y su rendimiento (Sánchez, 2006).

5.2.5.4. Factor de empaquetamiento: si el material queda muy suelto, el proceso termina muy pronto, presentando un alto consumo energético; si queda muy apretado, el vapor se acanala disminuyendo el rendimiento del aceite (Castellanos, 2006) (Sánchez, 2006).

5.2.6. Métodos de reconocimiento y análisis: Existe una gran cantidad de métodos de complejidad variada para reconocer un aceite esencial así como para analizar sus componentes. Se puede saber incluso el origen geográfico del producto o el procedimiento empleado en su obtención, si está adulterado con otros componentes o con mezclas de aceites esenciales (Ortuño, 2006).

Entre los ensayos de reconocimiento que se pueden aplicar a un aceite esencial se tienen:

5.2.6.1. Densidad: la densidad de un aceite esencial, medida a una temperatura estándar, es un parámetro fácil de obtener y que permite distinguir un aceite esencial auténtico de esencias sintéticas comunes. Un aceite esencial tiene, a una temperatura dada, un valor de densidad que se encuentra en un pequeño intervalo dependiendo de su procedencia, etc. La mayoría de los aceites esenciales, al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos, tienen una densidad menor que el agua (densidad menor que 1 g/cm³) pero hay algunos aceites esenciales con densidad mayor, como los de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo (Ortuño, 2006).

5.2.6.2. Viscosidad: la viscosidad de un aceite esencial es un parámetro que se puede determinar con un viscosímetro, operando a temperatura constante como en el caso de la medida de densidad. Éste parámetro permite diferenciar un producto puro de otro mezclado con diluyentes (Ortuño, 2006).

5.2.6.3. Índice de refracción: cuando un rayo de luz pasa a través de una sustancia cambia su dirección de forma proporcional al índice de refracción de ésta, de acuerdo con la ley de Snell. Con un refractómetro se puede determinar el índice de refracción de un aceite esencial, que también es una magnitud exclusiva de cada aceite esencial y que cambia si ésta se diluye o mezcla con otras sustancias (Ortuño, 2006).

5.2.6.4. Solubilidad en mezclas alcohol/agua: los aceites esenciales son completamente solubles en alcohol puro. Si al alcohol le vamos añadiendo agua de forma progresiva, la mezcla disolverá cada vez menos al aceite esencial. Dependiendo del aceite esencial de que se trate se disolverá completamente en una mezcla alcohol-agua que lleve como máximo una determinada proporción de agua. Si la proporción de agua es mayor, parte del aceite esencial no se disolverá. Se trata de un equilibrio líquido-líquido, en un sistema formado por 3 componentes: aceite esencial, agua y alcohol (Ortuño, 2006).

5.2.6.5. Cromatografía en capa fina: la cromatografía en capa fina es una técnica empleada en química orgánica y bioquímica para la identificación de componentes en una mezcla. Dentro de las técnicas de análisis e identificación más económicas y asequibles es, sin duda, la más potente (Ortuño, 2006).

5.2.7. Caracterización espectral: los monoterpenos y sesquiterpenos en un buen número se pueden caracterizar químicamente por métodos espectroscópicos (Martínez, 2003).

5.2.7.1. Infrarrojo: el espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C cis y trans, etc (Martínez, 2003).

5.2.7.2. Ultravioleta: el espectro UV de los monoterpenos y sesquiterpenos permite el reconocimiento de grupos funcionales y grupos cromóforos (Martínez, 2003).

5.2.7.3. Cromatografía de gases - Espectrometría de masas: es una herramienta analítica para la separación de mezclas complejas de compuestos químicos y analizar su contenido usando su espectro de masas (Ramanadhan, 2005).

5.3. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA PRELIMINAR

La investigación fitoquímica preliminar se apoya en un tratamiento general de extracción y sucesivas separaciones mediante solventes de diferentes polaridades con el fin de agrupar en fracciones los metabolitos estructuralmente semejantes y poder caracterizarlos por su comportamiento químico frente a ciertas reacciones químicas estandarizadas.

La prueba fitoquímica preliminar es la prueba química de caracterización consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas (Bilbao, 1997). Entre los metabolitos que se pueden identificar encontramos los siguientes:

5.3.1. Taninos: son productos de la excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas, contra organismos parásitos. Químicamente son polímeros de polifenoles, sustancias con alto peso molecular (comprendido entre 500 a 3000 g/mol), con 1 a 2% de hidroxilos fenólicos libres, los cuales permiten la formación de enlaces cruzados estables con proteínas y otros biopolímeros como la celulosa y las pectinas.

- **Aislamiento:** la estructura química de los taninos hidrolizables más comunes está constituida por polímeros del ácido gálico o el ácido elágico, unidos a la glucosa. Los taninos hidrolizables, mediante acción de álcalis, ácidos o enzimas específicas, liberan los compuestos fenólicos individuales y la unidad de carbohidrato (Domínguez, 1978).
- **Reacciones de reconocimiento:** los taninos actúan como potentes inhibidores enzimáticos cuando se enlazan a las proteínas. Los taninos transforman la piel en cuero, precipitan las proteínas y los alcaloides, e igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico y acetato de plomo. En estas propiedades se basan las reacciones de reconocimiento. Los taninos reaccionan con solución acuosa de tricloruro férrico al 1 % dando coloración azul (taninos derivados del ácido gálico) o verde (taninos derivados del ácido protocatéquico). Con acetato de plomo al 10 % producen turbidez o precipitado blanco. Los taninos precipitan las proteínas de sus soluciones al reaccionar con solución acuosa de gelatina-sal (Bilbao, 1997).

5.3.2. Flavonoides: Los flavonoides son pigmentos naturales que aparecen en las plantas superiores en los estadios de maduración y están presentes en los capítulos florales y en la superficie de los frutos. Muchos de ellos presentan propiedades farmacológicas contra numerosas patologías. Son compuestos polifenólicos con quince átomos de carbono, cuya estructura consta de dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos. El esqueleto de los flavonoides se representa por el sistema C6 - C3 - C6.

- **Aislamiento:** los poliglicósidos son muy solubles en agua y escasamente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos. La posición ocupada por la porción de azúcar influye en la solubilidad de la molécula y su capacidad para formar lacas insolubles con los metales. Las flavonas y flavonoles son poco solubles en agua, en tanto que los dihidroflavonoles sí. La cromatografía en papel ha sido ventajosa para separar y aislar antocianinas y glicósidos muy solubles en agua. Por cromatografía en columnas empacadas con adsorbentes poco polares se han logrado buenas separaciones (Domínguez, 1978).
- **Reacciones de reconocimiento:** los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones coloridas y propiedades de solubilidad. Los flavonoides con anillo de gamma-benzopirona reaccionan en presencia de ácido clorhídrico concentrado y magnesio, y esta es la reacción de Shinoda. Los flavonoides con esqueleto de flavilio dan positiva

la prueba de Rosenhein, por tener en su anillo C, un sistema de dieno conjugado (Bilbao, 1997).

5.3.3. Quinonas: son dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles, siendo fácilmente reversible esta reacción por oxidación. Por sus colores, amarillo a violeta, contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales y de algunos animales.

- **Aislamiento:** las *para*-benzoquinonas no hidroxiladas y algunas naftaquinonas parecidas pueden arrastrarse con vapor o extraerse con éter, benceno o disolventes no polares. Las hidroxiladas pueden extraerse con soluciones acuosas de bicarbonato o carbonato de sodio. Las bases fuertes en presencia de aire favorecen su descomposición oxidativa. Las *orto*-benzoquinonas no son arrastrables con vapor. Las antraquinonas se extraen con agua, etanol o mezclas de ambos (Domínguez, 1978).
- **Reacciones de reconocimiento:** las quinonas tienden a dar colores amarillos, rojos o púrpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados, lo que puede usarse para identificarlas (Bilbao, 1997).

5.3.4. Carotenoides: Los carotenoides son compuestos ubicuos en la naturaleza, cuya presencia en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias se ha descrito desde hace décadas. Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos, de estructuras animales como las plumas y picos de algunos pájaros, el exoesqueleto de crustáceos y el músculo o la piel de algunos peces. Son pigmentos amarillos, anaranjados o rojos, solubles en las grasas. En las plantas superiores se encuentran en las hojas junto con la clorofila.

- **Aislamiento:** los carotenoides son solubles en las grasas y esta característica es básica para su separación de otros compuestos en un extracto.
- **Reacciones de reconocimiento:** la reacción con ácido sulfúrico es característica de los carotenoides y sirve para distinguirlos de otros pigmentos naturales como las antocianinas. La reacción puede consistir en la transferencia de nube electrónica π a través de toda la cadena conjugada, con adición de H^+ y HSO_4^- en el carbocatión inicial y carbanión formados (Bilbao, 1997).

5.3.5. Esteroles: son compuestos cuya estructura presenta el sistema anular del ciclopentano perhidrofenantreno, metilos en los carbonos 10 y 13, y un radical lineal en el carbono 17.

- **Aislamiento:** los extractos con disolventes no polares, como el éter de petróleo, bisulfuro de carbono, cloroformo, éter etílico, contienen esteroides y sus ésteres junto con otros lípidos, carotenoides y lecitinas. Para separarlos, se saponifica este extracto y luego se sacan de la solución con un disolvente no polar. Posteriormente se separan del insaponificable por cristalización fraccionada, cromatografía o precipitación con digitonina. Los glicósidos se extraen con etanol u otros disolventes polares (Domínguez, 1978).
- **Reacciones de reconocimiento:** no hay reacciones verdaderamente específicas para esteroides, ya que otros tipos de sustancias, tales como glicósidos cardiotónicos, esteroalcaloides, di y triterpenos, saponinas, también las dan por contener detalles estructurales comunes o análogos. La prueba de Lieberman-Burchard es la más utilizada en el análisis de esteroides. Esta reacción consiste en someter la sustancia problema a la acción de anhídrido acético en cloroformo y ácido sulfúrico concentrado, empleando gotas. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva. El orden y tiempo de aparición tiene cierto valor diagnóstico, dependiendo del grado de insaturación de la estructura (Bilbao, 1997).

5.3.6. Glicósidos cardiotónicos: son sustancias amargas, derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. Estructuralmente están constituidos por el sistema anular esteroideal con los grupos metilo C-18 y C-19; un grupo hidroxilo en el carbono 3 y otro hidroxilo, en el carbono 14, con orientación Beta; y un anillo lactónico $\alpha - \beta$ insaturado de cuatro carbonos (butenólido) o de cinco carbonos (pentadienólido o bufadienólido) unido al carbono 17 del núcleo esteroideal. La porción del azúcar contiene 3-5 moléculas de monosacáridos, por lo general, metilpentosas y desoxiazúcares muy especiales.

- **Aislamiento:** si el material vegetal es rico en lípidos se le desengrasa antes con éter de petróleo y después, el glicósido se extrae en caliente (inactivándose las enzimas con etanol del 50% al 95% o con acetato de etilo). La separación y purificación final se hace por cromatografía en alúmina neutra o en gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo puro o metanol. La hidrólisis enzimática permite la obtención de la aglicona y sus azúcares o de productos de hidrólisis parcial (Domínguez, 1978).
- **Reacciones de reconocimiento:** el anillo lactónico de los glicósidos cardiotónicos reacciona con compuestos aromáticos nitrados, generando, con previa ruptura de la lactona y por sustitución electrofílica en el anillo

aromático, compuestos coloreados, válidos para caracterización. En este comportamiento se basan las pruebas de Baljet, Kedde y Legal. El grupo aldehídico de los azúcares que acompañan la aglicona cardenólida dan positivo para las reacciones de Tollens, Fehling y Molish (Bilbao, 1997).

5.3.7. Saponinas y sapogeninas: son un grupo de glicósidos solubles en agua, que tienen las propiedades de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente *sapogenina*. La sapogenina puede tener el sistema anular esteroidal, o el de triterpeno pentacíclico.

- **Aislamiento:** las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Para obtener sapogeninas, se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (este último se prefiere en el caso de sapogeninas insaturadas).
- **Reacciones de reconocimiento:** las saponinas esteroidales dan colores característicos con el reactivo de Rosenthaler. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta (λ_{\max} 575 nm) y los esteroides no reaccionan o dan un color verdoso (Domínguez, 1978).

5.3.8. Sesquiterpenlactonas: son compuestos con 15 átomos de carbono formados a partir del ácido mevalónico por la unión cabeza-cola de tres unidades de isopreno. Parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido. Algunas sesquiterpenlactonas poseen acción citotóxica. Otros son analgésicos o amebicidas. Son sustancias amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes medicinales.

- **Aislamiento:** por lo general, las sesquiterpenlactonas son lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo, aunque también son insolubles en agua. El etanol o metanol caliente las disuelven, pero son aún más solubles en cloroformo o éter etílico.
- **Reacciones de reconocimiento:** las lactonas terpénicas dan respuesta positiva con la reacción de hidroxamato férrico. Cuando la lactona terpénica es una γ -lactona α - β -insaturada, reacciona positivamente con las pruebas de Legal, Kedde y Raymond.

5.3.9. Coumarinas: son probablemente los metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corisinato. Constituyen un grupo importante de compuestos naturales; son lactonas derivadas de la α -benzopirona, biogenéticamente formadas a partir del ácido cinámico. Son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles. Presentan acción anticoagulante, sedante, vasodilatadora, antihelmíntica, antibacteriana y antifúngica. Las coumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de leguminosas, *Orchidaceae*, *Rutaceae* y *Umbeliferae*, y en cualquiera de los órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos.

- **Aislamiento:** el empleo sucesivo de disolventes de polaridad creciente ha dado buenos resultados. Así, el éter de petróleo o el éter etílico extraen aceites que ayudan a solubilizar las cumarinas, por los que frecuentemente cristalizan durante las extracciones en Soxhlet o al concentrar la solución etérea. Las cumarinas son solubles en soluciones acuosas o alcohólicas de hidróxidos de sodio.
- **Reacciones de reconocimiento:** la mayoría de las cumarinas tienen fluorescencia azul cuando se les expone a la luz ultravioleta, las que tienen oxígeno en la posición 7 pueden exhibir fluorescencia hasta con luz visible, particularmente cuando se tratan con H_2SO_4 . Las cumarinas como lactonas que son, dan positiva la prueba del hidroxamato férrico. La presencia de un grupo de furano puede determinarse mediante la prueba de Ehrlich, formando una coloración naranja.

5.3.10. Alcaloides: constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales. La mayoría de los alcaloides se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides. Algunos alcaloides se encuentran en forma de glicósidos de la rhamnosa, galactosa y glucosa. Otros se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable. Aunque con frecuencia se agrupan los alcaloides de acuerdo con su procedencia botánica, es más racional clasificarlos de acuerdo con alguno de los 254 tipos estructurales en que hasta el momento se les ha dividido.

- **Aislamiento:** las soluciones al 1% de ácido cloroáurico ($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$) o al 1% de ácido cloroplatínico ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$) dan precipitados característicos con los alcaloides. La solubilidad se emplea para extraerlos y purificarlos.
- **Reacciones de reconocimiento:** las reacciones se basan en los siguientes comportamientos: el yoduro potásico cuando reacciona con cloruro

mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxyoduro mercuriamónico, que es soluble en exceso de complejo alcalino, generando intenso color amarillo. Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco ante estos reactivos.

5.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN FITOQUÍMICOS:

5.4.1. Extracción por Soxhlet: Es un equipo que trabaja con un disolvente orgánico en ciclos continuos de evaporación y condensación, de manera que el disolvente líquido caliente y puro está en contacto con la materia prima, mientras que otra parte del disolvente acumula los compuestos extraídos. Esta técnica se basa en el coeficiente de partición, en donde a mayor número de extracciones se obtendrá una mayor concentración de los compuestos de interés. Las temperaturas de tratamiento no deben sobrepasar los 40°C para evitar la degradación de metabolitos termolábiles. Las ventajas residen en su fácil manejo, su funcionamiento automático y la capacidad de obtener la mayor cantidad de compuestos químicos presentes en una planta aromática.

5.4.2. Percolación o Lixiviación: consiste en hacer pasar el disolvente a temperatura ordinaria, o superior a ella, por gravedad a través del material convenientemente pulverizado. El disolvente se renueva continuamente, pues al atravesar la primera capa de muestra y disolver cierta cantidad de principios cambia la composición convirtiéndose en un “disolvente nuevo” capacitado para disolver una nueva cantidad de principios diferentes a los que disolvió primero. La calidad del extracto depende del grado de finura del material vegetal, la velocidad de difusión de las sustancias activas al disolvente y en la velocidad de corrida del disolvente (Bilbao, 1997).

5.5. SEPARACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Desde la muestra vegetal hasta los compuestos puros, las estrategias de purificación comprenden siempre un procedimiento de múltiples pasos, incluyendo extracción, prepurificación y luego uno o varios pasos cromatográficos. La cromatografía en capa fina puede ser usada para comprobar la pureza de un

compuesto y también algunas veces como un paso adicional de purificación (Dinan *et al*, 2001).

La cromatografía es un procedimiento físico-químico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento, por adsorción o separación diferencial de estos compuestos sobre una superficie inmóvil. En la cromatografía en capa fina, se emplean como adsorbentes o fase estacionaria: óxidos, óxidos hidratados o sales. Los más comunes son la gel de sílice, la alúmina, la celulosa y las poliamidas (Bilbao, 1997).

Como el disolvente y la sustancia empiezan a moverse al disolverse al mismo tiempo, la relación puede entre estos dos puede expresarse en términos de las distancias recorridas por cada uno de la siguiente manera

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por compuesto}}{\text{Distancia recorrida por solvente}}$$

5.6. SEPARACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Los absorbentes comúnmente usados son óxido de aluminio para compuestos no polares o de polaridad media y sílica gel para compuestos orgánicos polares. La velocidad de elución debe controlarse para obtener una buena separación. El seguimiento de separación en el desarrollo de la columna, se hace por cromatografía en capa delgada, para cada fracción colectada. La presencia de cualquier compuesto se conoce por la aparición de cristales en el mismo, y por respuesta positiva a la prueba fitoquímica correspondiente. (Bilbao, 1997).

5.7. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN ESPECTROSCÓPICA:

5.7.1. La espectroscopía es el estudio de la interacción de los átomos y moléculas con la radiación electromagnética. la espectroscopía de absorción electrónica, al igual que otros métodos de espectroscopía, se utilizan para resolver preguntas de diferente índole al estudiar la estructura propiedades de sustancias orgánicas y su análisis cualitativo y cuantitativo.

5.7.2. Espectroscopía Ultravioleta y Visible: La región Visible (se percibe con los ojos humanos) abarca desde 380 hasta 800 nm, la región Ultravioleta se extiende desde 100 hasta 380. Se han formulado dos leyes empíricas que relacionan la intensidad de la absorción de la luz con la concentración de la muestra. La Ley de Lambert establece que la fracción de luz incidente absorbida es independiente de la

intensidad de la luz. La Ley de Beer dice que la absorción es proporcional al número de moléculas absorbentes.

Las principales características de una banda de absorción son su posición e intensidad. La posición de la absorción corresponde a la longitud de onda (λ) de la radiación cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica. La intensidad de la absorción depende principalmente de dos factores: la probabilidad de interacción entre la energía de radiación y el sistema electrónico para pasar de un estado fundamental a un estado excitado, así como de la polaridad del estado excitado (Zuluaga, 2000).

5.7.3. Espectroscopía Infrarroja: la espectroscopía infrarroja es de gran utilidad en el análisis cualitativo orgánico. El espectro infrarrojo puede obtenerse en delgadas películas de muestras líquidas, en muestras en solución, en muestras en fase gaseosa, y en muestras sólidas dispersas en una sal inorgánica (típicamente KBr). (Young, 2000).

La molécula no es rígida, la podemos comparar con un sistema de esferas y resortes, donde las esferas representan a los átomos y los resorts a los enlaces. Hay dos clases fundamentales de vibraciones para las moléculas: stretching (tensión, elongación o estiramiento), en la cual la distancia entre dos átomos aumenta o disminuye, pero los átomos permanecen en el mismo eje de enlace, bending (flexión o deformación), en la cual la posición de los átomos varía en relación al eje de enlace original.

Las vibraciones de deformación generalmente necesitan menor energía y ocurren a longitudes de onda mayor (menores frecuencias, número de onda menor), que las vibraciones de tensión.

Los espectros de IR proporcionan numerosas bandas de absorción, muchas de las cuales no pueden ser asignadas con exactitud, sin embargo proporcionan una vasta información estructural sobre la molécula (Zuluaga, 2000).

5.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

5.8.1. Antibiograma: es un estudio de la sensibilidad in vitro del comportamiento de los microorganismos frente a diferentes antimicrobianos. Cuando se realiza, se trata de reproducir experimentalmente lo que pudiera ocurrir en el huésped, sin que se pueda asegurar que su comportamiento en el paciente será el mismo que el observado en la prueba. Afortunadamente existe una buena correlación entre la prueba in vitro y la efectividad del o de los antimicrobianos empleados.

5.8.1.1. Pruebas de sensibilidad: La sensibilidad de un organismo a determinados antimicrobianos ha sido definida como la menor concentración del

antimicrobiano que evita el crecimiento in vitro del microbio, y se refiere como la concentración mínima inhibitoria (CMI). El punto de corte, mejor conocido con el nombre en inglés de Breakpoint de la CMI, es la concentración del antimicrobiano que define las categorías de resistente y sensible para cada antimicrobiano.

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos se pueden realizar por diferentes métodos, como son los métodos de dilución y los métodos de difusión. Los métodos de dilución se pueden realizar en tubos, microplacas y en agar, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones bactericidas mínimas (CMB). En cambio, los métodos de difusión se emplean básicamente para realizar la prueba de disco o difusión o de Kirby-Bauer, que es la más practicada en nuestro medio (Sánchez y Feris, 1998).

Dependiendo del autor, los ensayos de dilución en caldo se realizan con distintos emulsionantes, aplicando diferentes criterios para la determinación de la CMI y la CMB (en ocasiones consideran ambos términos equivalentes) y expresando los resultados en unidades de medida muy dispares (% v/v, % p/v, µg/mL, g/mL) (Huerta, 2000).

5.8.1.2. Método de difusión en disco (Kirby-Bauer): es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Es un método sencillo, sin embargo, el efecto inhibitorio del compuesto que se va a evaluar, dependerá de su habilidad para difundirse en el medio.

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un disco de papel en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá, no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del antimicrobiano en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación microbiana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria.

5.8.1.3. Medio de cultivo: De los medios disponibles, el agar Mueller Hinton es considerado como el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de microorganismos de rápido crecimiento sin exigencias nutricionales especiales debido a que:

- Muestra buena reproducibilidad entre los distintos lotes.
- Tiene bajo contenido de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprina y tetraciclinas

- Es adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la calidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su esterilización.

5.8.2. Bacterias Gram-negativas: la membrana externa sirve como la principal barrera de permeabilidad de la célula y ayuda a retener proteínas en el espacio periplásmico. Sobre la superficie de la célula se encuentran los lipopolisacáridos y son el componente esencial de las endotoxinas. Ellos contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad. La capa de péptidoglicano de las bacterias Gram-negativas es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamida entrelazados. Esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular y es responsable de mantener la forma del organismo.

5.8.2.1. *Escherichia coli*: es un habitante usualmente inofensivo que forma parte de la microflora anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de algunos animales. La célula de *E. coli* tiene una membrana exterior protectora y una membrana plasmática interior que encierra el citoplasma y el nucleóide. Existen cepas de *E. coli* capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, entre ellas infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica (Rivero *et al*, 2004).

5.8.2.2. *Pseudomona aeruginosa*: patógeno versátil y oportunista debido a su gran adaptabilidad fisiológica, potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente a escala mundial de severas infecciones en pacientes hospitalizados, siendo capaz de infectar prácticamente todas las localizaciones del organismo humano y desarrollar entonces a partir de la infección, la diseminación hemática, septicemia y lesiones focales en diversos tejidos. Una de las características más relevantes de este germen es su elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos de más amplio uso clínico. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria invasiva y toxigénica (Esnard *et al*, 2004).

5.8.2.3. *Enterobacter cloacae*: es una bacteria comensal que ocasionalmente puede producir infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos, cuyas alternativas terapéuticas cada vez son menores, por ser importante fuente de resistencia antibiótica transferible. Más raramente se consigue aislarla de procesos infecciosos en pacientes inmunocompetentes puesto que su actividad patógena es escasa ante la integridad de los mecanismos de defensa del huésped (Pino *et al*, 2003).

5.8.2.4. *Aeromonas hydrophila*: habita en aguas dulces y es conocida por causar septicemia y estomatitis en serpientes e infecciones en peces de agua dulce. Las infecciones humanas debido a los miembros del género *Aeromonas* han sido de poco conocimiento en la medicina, pero estos organismos han sido aislados de un gran número de fuentes humanas, en pacientes con diarrea, gastroenteritis severa, gangrena, peritonitis, osteomielitis, bronconeumonía, carcinoma de ovarios y de útero y han sido obtenidos de la garganta, orina, sangre, fluido pleural, pus, placenta, heridas, y abscesos (Hussain *et al*, 1976).

5.8.2.5. *Klebsiella pneumoniae*: es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías. Con la proliferación de cepas multirresistentes, el problema de las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae* es aún mayor, ya que al ser más difíciles de tratar dan lugar a incrementos de las tasas de mortalidad (Andrade & Silva, 2004).

5.8.2.6. *Proteus mirabilis*: es un patógeno oportunista y persiste por largos periodos de tiempo. Ha sido reconocido como agente etiológico de distintos procesos infecciosos, tales como infección urinaria, infección quirúrgica, neumonías, bacteriemias, septicemias e infecciones óticas. Asimismo, varios estudios muestran su creciente implicancia en infecciones nosocomiales. Se cree que el germen alcanza la vía aérea por inhalación, implicándose el papel de la colonización intestinal como posible reservorio (Atif *et al*, 2007).

5.8.3. Bacterias Gram-positivas: puesto que la pared celular de las bacterias Gram-positivas contiene solo dos componentes principales es mucho menos complicada que la pared celular de las Gram-negativas. Los ácidos teicoicos son polímeros que están entrelazados en la capa de peptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células Gram-positivas. La capa de peptidoglicano, o capa de mureína, es mucho más gruesa que la de las bacterias Gram-negativas.

5.8.3.1. *Staphylococcus aureus*: es agente etiológico de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blancos, bacteriemia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario. Es parte de la flora normal del hombre, siendo el sitio de portación principal las fosas nasales, por lo que debe ser considerado como un patógeno oportunista. Puede causar una amplia variedad de infecciones: lesiones superficiales, infecciones sistémicas con riesgo de vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y

bacteriemia), y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada o síndrome de Shock tóxico) (Nabón, 2006).

5.8.3.2. *Enterococcus gallinarum*: se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal. Se ha reportado que es responsable del 1% de bacteriemias causadas por enterococcus. Otras infecciones causada por este microorganismo incluyen endocarditis y meningitis.

5.8.4. Levaduras:

5.8.4.1. *Candida albicans*: hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios. Asimilan y fermentan azúcares. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura.

Candida albicans puede producir infecciones superficiales que afectan la piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente.

5.9. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL₅₀

La CL₅₀ se utiliza para clasificar y comparar la toxicidad de las sustancias y se define como la dosis única de una sustancia química, obtenida estadísticamente, que se espere cause la muerte del 50% de una determinada población de organismos bajo un conjunto definido de condiciones experimentales.

Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuente de principios bioactivos, el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil con estos propósitos, especialmente porque se ha encontrado que puede existir una relación entre esta acción sobre *A. salina* y otras bioactividades como la citotoxicidad.

La artemia salina es un pequeño crustáceo que vive en los estanques de evaporación de las salinas y en lagos salobres de todo el mundo. Totalmente desarrollada, la artemia mide unos 13 mm, tiene patas planas en forma de hoja y una larga "cola" formada por los últimos ocho segmentos del cuerpo. Carece de cubierta calcárea y es transparente.

Es la presa viva más adecuada para la alimentación de los estadios post-larvarios de muchas especies de peces y crustáceos marinos.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *L. organoides*, en estado de floración, fueron donadas por la Asociación Bioagroindustrial, ASOBAI, y se recolectaron en dos jornadas, 6:00 a.m. y 4:00 p.m., en la finca El Faro de la Suiza, vereda el Plataniyal, corregimiento de Pueblo Tapao, Municipio de Montenegro, ubicado sobre 1282 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 27 °C. Para las extracciones con material vegetal en estado seco, este se sometió a secado en estufa con circulación de aire a 35 °C durante 24 horas.

6.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL MATERIAL VEGETAL (MÉTODO A.O.A.C. 20.013/1980)

Se tomó 1.0 g de hojas picadas de las dos jornadas de corte y se llevaron a una estufa con circulación de aire a 60 °C por 24 horas, en cápsulas de porcelana previamente taradas. Trascurrido este tiempo se llevaron a una estufa con vacío a una temperatura de 60 °C, por 72 horas, dejando secar hasta peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado. La diferencia del peso inicial y final de la muestra, referida al peso inicial de la misma proporciona la humedad del material vegetal, por medio de la ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{Masa inicial} - \text{masa final}}{\text{Masa inicial}} \times 100$$

6.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS POLAR Y APOLAR

6.3.1. Desengrase del material vegetal y obtención del extracto apolar:

Las hojas secas y tamizadas (100 g), de las dos jornadas de recolección, se sometieron a extracción por Soxhlet durante 24 horas, utilizando 400 mL de éter de petróleo como solvente, con el fin de eliminar las grasas, ceras, etc., reservando el material vegetal desengrasado (marco) para la obtención del extracto polar. Posterior a esto se realizó la saponificación únicamente del extracto apolar

obtenido del material vegetal de las 4:00 p.m., utilizando KOH y etanol por 5 horas, y éste se extrajo con éter de petróleo en embudo de decantación.

6.3.2. Obtención del extracto polar:

El material vegetal previamente desengrasado (marco) se secó a temperatura ambiente y se sometió a lixiviación con etanol absoluto, durante 8 días, para así obtener los metabolitos secundarios polares.

6.3.3. Separación de clorofilas del extracto polar:

Se agregó una pequeña cantidad de carbón activado al extracto etanólico, se calentó en baño de maría y se filtró. La temperatura del baño se mantuvo a 35°C, para evitar la degradación del material.

6.3.4. Percolación del material vegetal:

La percolación se realizó únicamente con el material vegetal de las 6:00 a.m., utilizando 100 g de este y realizando extracciones sucesivas con tres solventes de polaridades diferentes: hexano, diclorometano y etanol absoluto, obteniendo así tres extractos, los cuales se concentraron hasta la tercera parte a presión reducida por medio de un rotavapor.

6.3.5. Pruebas fitoquímicas preliminares:

Se realizaron pruebas fitoquímicas a los extractos de la siguiente manera (Bilbao, 1997):

6.3.5.1. Taninos:

- **Prueba con cloruro férrico:** a 0.2 mL de extracto, se agregó una gota de solución de tricloruro férrico al 1 % y se observó el color. Para taninos derivados del ácido gálico da coloración azul, y para taninos derivados del ácido protocatéquico, coloración verde.
- **Prueba con acetato de plomo:** se adicionó 1 mL de extracto en un tubo de ensayo y se agregó 1 mL de solución de acetato de plomo al 10 %, si es positiva se produce turbidez o precipitado blanco.
- **Prueba con gelatina-sal:** a 1 mL del extracto se le adicionó 1 mL de solución acuosa de gelatina-sal. La formación de un precipitado blanco indica prueba positiva.

6.3.5.2. Flavonoides:

- *Prueba de Shinoda:* a 1 mL de extracto en una placa excavada se le adicionó magnesio en polvo y gotas de ácido clorhídrico concentrado. Los colores de rosado a anaranjado indican prueba positiva.
- *Prueba de Rosenhein:* a 1 mL del extracto, se le adicionó la mitad del volumen de ácido tricloroacético al 90 %. Se mezcló y se calentó por 10 minutos a 90 °C. Se enfrió y se agitó con 0.4 mL de alcohol amílico. Se decantó y se observó el color de la fase amílica. La prueba se considera positiva si aparece un color que va desde carmesí hasta el rosado claro.

6.3.5.3. Quinonas:

- *Comportamiento ante un ácido:* a 0.2 mL de extracto, se le adicionó zinc en polvo y gotas de ácido clorhídrico concentrado. Los colores amarillos, rojos o púrpuras indican que la prueba es positiva.
- *Comportamiento ante una base:* a 0.2 mL de extracto se le adicionó una pequeña cantidad de hidróxido de sodio al 40 %. Si aparece un color rojo más o menos intenso la prueba es positiva.

6.3.5.4. Carotenoides:

- *Prueba de Carr-Price:* a 1 mL de extracto se le agregó 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado, y se observó la coloración. Un color azul en la zona de separación de ambas capas indica que la prueba es positiva.

6.3.5.5. Esteroles:

- *Reacción de Liebermann-Burchard:* se emplearon 0.5 mL de extracto y seguidamente se sometió a la acción de anhídrido acético en cloroformo y gotas de ácido sulfúrico concentrado, las cuales se adicionaron por el borde de la cavidad, muy lentamente para apreciar los cambios de color. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva.

6.3.5.6. Glicósidos cardiotónicos:

- *Prueba de Baljet:* a 0.5 mL de extracto se le agregó 0.5 mL del Reactivo de Baljet y se observó. La prueba es positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

- **Prueba de Kedde:** a 0.5 mL de la muestra se le añadió 5 gotas del Reactivo de Kedde. Los cardenólidos y sus agliconas dan color azul o violeta que desaparece en 1-2 horas.
- **Prueba de Legal:** a 0.5 mL de extracto se le adicionaron 3 gotas del Reactivo de Legal, observando el cambio de color. En caso positivo aparece un color rojo intenso.
- **Prueba de Keller-Killiani:** a 0.5 mL de la muestra se le adicionó 1 mL del Reactivo de Keller-Killiani y se agitó. Si la prueba es positiva en uno o dos minutos aparece un color azul.
- **Prueba de Tollens:** en un tubo de ensayo, a 0.5 mL de extracto se le añadieron 4-6 gotas del reactivo de Tollens recientemente preparado. El tubo se calentó y se observó la formación de una película de plata en el tubo.
- **Prueba de la Antrona:** en un tubo de ensayo se colocó 0.5 mL del extracto y por la pared del tubo se dejó resbalar una solución reciente (no mayor de 24 horas) de antrona. Si aparece un anillo azul-verdoso o azul, la prueba es positiva.
- **Prueba de Molish:** a 0.5 mL de la muestra se le agregó 0.5 mL de Reactivo de Molish y se adicionó la mezcla gota a gota por las paredes de un tubo que contenía H₂SO₄ concentrado. Si se forma un anillo violeta es positiva.

6.3.5.7. Saponinas y sapogeninas:

- **Reacción de Rosenthaler:** 0.5 mL de extracto se le adicionó 1 mL del reactivo de Rosenthaler. Las sapogeninas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta y los esteroides no reaccionan o dan color verdoso.
- **Reacción de hemólisis:** a 5 mL de sangre humana se le agregaron 50 mL de suero fisiológico 0.9 %. Luego se centrifugó por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Los glóbulos rojos se suspendieron en 100 mL de suero fisiológico 0.9 % y de esta solución se extrajeron 3 mL en 2 tubos. En uno de ellos se añadieron 3 mL del extracto a evaluar y el otro se dejó como testigo. Se incubaron los tubos en baño maría por 5 minutos a 37 °C y se observó si había oscurecimiento de la solución. Además se observó al microscopio en 100X la presencia o ausencia de eritrocitos.

6.3.5.8. Sesquiterpenlactonas:

- **Reacción del hidroxamato férrico:** a 0.5 mL de extracto se le añadió una gota de solución metanólica 2 N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de

solución 2 N de hidróxido de potasio. La mezcla se calentó durante 2 minutos, se enfrió y se aciduló con HCl 0.5 N y se adicionó una gota de FeCl₃ al 1%. Se observa la coloración violácea.

6.3.5.9. Coumarinas:

- *Reacción de fluorescencia:* en un tubo de ensayo se colocó la muestra y se tapó la parte superior del tubo con papel de filtro impregnado con solución diluida de NaOH. El tubo se calentó por 5 minutos en baño de maría. El papel se observó a la luz del U.V. La presencia de fluorescencia azul o verde es prueba positiva.
- *Reacción del hidroxamato férrico:* se realizó de igual manera que para la determinación de sesquiterpenlactonas.
- *Reacción de Ehrlich:* a 0.5 mL de extracto se le adiciona 1 mL del Reactivo de Ehrlich, consistente en una solución al 5 % de p-dimetil aminobenzaldehído en etanol y cloruro de hidrógeno gaseoso, formándose una coloración naranja, en caso de ser positiva.

6.3.5.10. Alcaloides:

- *Reacción de Mayer:* se adicionaron 5 gotas del Reactivo de Mayer a 0.5 mL de extracto. Cuando la prueba es positiva da un precipitado blanco.
- *Reacción de Ehrlich:* a 0.2 mL de muestra se agregaron 0.2 mL de reactivo de Ehrlich. La prueba se considera positiva si dentro 30 minutos da una coloración entre azul y violeta.
- *Reacción de Wagner:* a 0.5 mL del extracto se le adicionaron 5 gotas del reactivo de Wagner. La formación de precipitado café es prueba positiva.

6.4. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

6.4.1. Destilación por Arrastre de Vapor (DAV):

Se procesaron 100 g del material vegetal fresco y seco, recolectado en dos jornadas. Se utiliza un equipo de destilación por arrastre con vapor directo con 250 mL de agua, empleando una manta de calentamiento como generadora de calor, por tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos para cada tratamiento respectivamente, a fin de determinar el tiempo óptimo de extracción (Luque de Castro, 2008). La mezcla agua-aceite fue extraída con diclorometano, y se secó sobre sulfato de sodio

anhidro (Stashenko, Jaramillo, y Martínez, 2003). Los aceites esenciales se almacenaron en frascos viales ámbar a 4 °C hasta la realización de los respectivos análisis. Las determinaciones se hicieron 3 veces consecutivas, operando siempre bajo las mismas condiciones.



Figura 2. Equipo de Destilación por Arrastre con Vapor (DAV) utilizado para la extracción de aceite esencial

6.4.2. Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHD):

Se utilizaron 100 g de material vegetal fresco y seco, recolectado en dos jornadas, empleando un equipo de hidrodestilación asistida por microondas, a través de un horno microondas convencional Phillips, con una potencia de salida de 990 W, y por tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos para cada tratamiento respectivamente. La extracción del aceite esencial se realizó de igual manera que para la DAV.



Figura 3. Equipo de Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHD) utilizado para la extracción de aceite esencial.

6.5. Análisis fisicoquímicos del aceite esencial

6.5.1. Peso específico:

Se determinó con un picnómetro de 1.0 mL, a 25 °C.

6.5.2. Índice de refracción:

Se determinó usando un refractómetro thermo, a una temperatura de 25 °C.

6.5.3. pH:

El pH del aceite se determinó con un pHmetro IQ scientific, modelo IQ 240 con un electrodo previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7.

6.5.4. Solubilidad en soluciones etanol-agua:

Se probó la solubilidad del aceite esencial en soluciones etanólicas al 95 %, 90%, 80 %, 70 %, y 60 %, a 1 gota del aceite esencial, se le adicionó gota a gota las diferentes soluciones alcohólicas. Se anotó la solubilidad del aceite para cada solución respectivamente.

6.5.5. Solubilidad en Tween 80 y dimetilsulfóxido:

Se probó la solubilidad del aceite esencial en soluciones de Tween 80 al 0.05% y al 0.01 % y en dimetilsulfóxido con diferentes concentraciones, siguiendo la misma metodología expuesta para determinar la solubilidad en soluciones etanol-agua.

6.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

6.6.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible:

Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro marca UV-VIS HP-8453- D.A.D., con una celda de cuarzo de 1 cm, usando el Software Chemstation Versión A 06.01., usando diclorometano como solvente.

6.6.2. Espectroscopía Infrarroja:

Se realizó por medio de pastilla de KBr en un espectrofotómetro IR-FT marca Thermo Nicolet 380 (**Electron Corporation**), usando el Software OMNIC Versión 7.2, registro 1.04.

6.6.3. Cromatografía de Gases acoplada a un detector de Masas (CG-MS):

Se realizó en un Cromatógrafo de Gases Shimadzu QP 2010 acoplado a Masas, Ubicado en la Universidad del Valle, Departamento de Química, Laboratorio de Investigaciones Avanzadas. Se utilizó una columna capilar apolar de sílice fundida, con fase estacionaria de 5% fenil - poli (metil siloxano) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, utilizando Helio de grado 5,0 UAP como gas de arrastre, con el Software Konikrom 32.

6.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se utilizaron los siguientes microorganismos:

Gram-negativos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Aeromona hidrófila*, Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus gallinarum*, y levaduras: *Candida albicans*.

6.7.1. Preparación del estándar de turbidez del inóculo:

Para estandarizar la densidad del inóculo en la prueba de susceptibilidad se utilizó el estándar de turbidez de BaSO₄, equivalente al tubo N° 5 de McFarland o su equivalente óptico.

Tabla 3. Escala de McFarland

Estándar N°	Volumen (mL)		N° de bacterias Millones/mL
	Vol. De BaCl ₂ (1%)	Vol. De H ₂ SO ₄ (1%)	
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000
Total	6.0	100	-----

6.7.2. Preparación del inóculo:

Para la preparación del inóculo se tomó una asada del microorganismo en estudio (previamente activado) y se suspendió en caldo nutritivo, hasta lograr una turbidez comparable con el patrón N° 5 de la escala de McFarland. Esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada. Para la activación de los microorganismos se prepararon suspensiones a partir de cada uno de ellos y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

6.7.3. Actividad antimicrobiana de los extractos polar y apolar y de los extractos de la percolación:

6.7.3.1. Preparación del discos de los extractos: Se tomaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y se les adicionó el extracto correspondiente, posteriormente se colocaron a 37 °C hasta la evaporación completa del solvente (Maguna *et al.*, 2006).

6.7.3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto polar y apolar mediante la técnica de Kirby-Bauer modificado: Se tomó una caja de petri por microorganismo y a cada una se le adicionó el agar Mueller-Hinton. Sobre el medio solidificado se distribuyó uniformemente cada inóculo (siembra masiva), con la ayuda de un hisopo estéril, y efectuando un barrido en por lo menos tres direcciones, girando la placa a 90 grados y por el reborde de la placa.

A continuación se aplicó en cada placa, con la ayuda de una pinza estéril, y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio, 4 discos de papel de 6.0 mm de diámetro embebidos con los extractos etanólicos y etéreos de las 6:00 a.m. y de las 4:00 p.m., y dos discos más con los solventes respectivos, como control negativo. Para que la difusión sobre el medio fuera más efectiva, sobre cada disco se aplicaron 10µL de agua destilada. Las cajas se incubaron a 37 °C, y al cabo de 24 horas se leyeron los resultados. El diámetro de la zona de inhibición del crecimiento microbiano fue expresado en milímetros (mm).

6.7.3.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la percolación mediante la técnica de Kirby-Bauer modificado: El procedimiento fue el mismo utilizado con el extracto polar y apolar, utilizando 3 discos de 6 mm impregnados con el respectivo extracto y utilizando como control negativo los solventes correspondientes a cada extracto. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento microbiano y se expresaron en milímetros.

6.7.4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial:

Se utilizó el método de los orificios o pocillos descrito por Gatica y Gesche (2007). Se distribuyó cada inóculo microbiano sobre el medio Mueller-Hinton, de igual forma que con el método Kirby-Bauer. Se hicieron seis perforaciones de 3 mm de diámetro cada una sobre el agar. En las cuatro primeras se depositaron 10 µL de los aceites extraídos con cada una de las variaciones, tanto puro (100%), como diluido en etanol al 98 % y en Tween 80 al 0.05 %, en la quinta perforación se adicionó el control negativo, y en la última perforación, el control positivo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm).

6.8. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CITOTOXICIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

La citotoxicidad se evaluó sobre células VERO (células de riñón de mono verde africano), para lo cual se inocularon cajas de cultivo celular de 96 pozos con 50000 células por pozo, en medio DMEM modificado, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, se incubó a 35 °C por 24 h en una atmósfera de 5% de CO₂, al cabo de este tiempo las células habían llenado todo el fondo del pozo en crecimiento de monocapa; seguidamente, se retiró el medio y se adicionó nuevo medio con concentraciones diferentes del aceite esencial, se incubó a 35 °C y 5 % de CO₂, se observó el cambio morfológico de las células o el desprendimiento de la monocapa a las 0 y a las 12 h. Las cantidades especificadas en la siguiente tabla se refieren a los microlitros de aceite esencial y etanol adicionados respectivamente, partiendo de una solución de aceite esencial al 10 % (v/v) en etanol.

Tabla 4. Concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides* a evaluar con células VERO

Aceite	Etanol	Aceite	Etanol	Aceite	Etanol	Aceite	Etanol	control (-)	Control (-)
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio
10	10	5	5	1	1	0.5	0.5	Medio	Medio

6.9. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀)

La determinación de toxicidad en *Artemia salina* se realizó por exposición de los crustáceos a concentraciones variables de los extractos etanólico y etéreo y del aceite esencial de *L. origanoides*

6.9.1. Eclosión de los crustáceos:

Se adecuó un recipiente plástico, transparente, cuadrado, dividido en la mitad por una malla de mediano tamaño que permitía el paso de los crustáceos. Una de las mitades se cubrió con un plástico oscuro y allí se depositaron los huevos. La otra mitad se dejó libre. El recipiente se depositó en una zona en la que había sol la mayor parte del tiempo. Los huevos que eclosionaron, migraron desde la parte oscura del recipiente buscando el sol. La incubación de los huevos de *A. salina* (30 mg) se realizó en cantidad suficiente de solución salina (3.8 g/100 mL), durante 2-4 días.

6.9.2. preparación de las soluciones de los aceites esenciales y los extractos etéreo y etanólico:

Se prepararon diferentes soluciones de los extractos y del aceite esencial (ppm), y se transfirieron 2 mL de cada disolución en tubos de ensayo, utilizando 3 tubos por cada concentración. Además se hizo un control por muestra. A cada tubo de ensayo se le agregó 1 mL de la solución salina conteniendo 10 nauphilus. Luego se agregó solución salina hasta completar 5 mL por tubo. Además, se le agregó una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca disuelta en 5 mL de agua de mar) como alimento. Se hizo la lectura de artemias muertas por cada dilución a diferentes tiempos. Los resultados se procesaron por el programa STATGRAPHICS Plus Version 5.1. transformando los porcentajes de mortalidad en probits, los cuales se utilizaron para calcular la CL₅₀ del aceite esencial y los extractos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

El análisis estadístico de los datos de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales realizados para las dos técnicas de extracción y las jornadas de recolección del material vegetal, tanto fresco como seco, se evaluó con un diseño factorial de tres factores.

- a. Factor método de extracción: 1. DAV
2. MWHD
- b. Factor jornada de recolección: 1. 6:00 a.m.
2. 4:00 p.m.
- c. Factor estado de las hojas: 1. Fresco
2. Seco

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

i = Tipo de extracción

j = Jornada de recolección

k = Estado de la planta

l = Réplicas

Y_{ijkl} = variable de respuesta.

μ = Media general

τ_i = Efecto del tipo de extracción

Nivel 1: Destilación por arrastre con Vapor

Nivel 2: Hidrodestilación asistida con microondas

β_j = Efecto de la jornada de recolección:

Nivel 1: jornada 6:00 a.m.

Nivel 2: jornada 4:00 p.m.

γ_k = Efecto del estado de la planta:

Nivel 1: Estado fresco

Nivel 2: Estado seco

E_{ijkl} = Efecto de error aleatorio

Las hipótesis son las siguientes:

$H_0: (\tau\beta\gamma)_{ijk} = 0$

$H_a: (\tau\beta\gamma)_{ijk} \neq 0$

El análisis experimental se realizó utilizando el programa Statgraphics plus.

Con este diseño experimental se pudo analizar la mayor eficiencia del método utilizado y de la jornada de recolección, tanto fresco como seco, para lograr óptimos resultados en la extracción del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL MATERIAL VEGETAL

Los resultados obtenidos para las diferentes jornadas de recolección se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de humedad de las hojas de *L. origanoides*, para dos jornadas de recolección

Jornada de recolección	Masa fresca (g)	Humedad (%)
6:00 a.m.	1.0	58.3241
4:00 p.m.	1.0	66.2264

De los anteriores resultados notamos que el contenido de humedad es mayor en las hojas de *L. origanoides* recolectadas a las 4:00 p.m. que en las recolectadas a las 6:00 p.m., con lo cual podemos decir que las horas de la mañana son las más apropiadas para el corte pues los cúmulos de agua de la planta se han deshidratado durante la noche, es decir, que al haber condiciones de oscuridad, la planta efectúa un proceso de reposo de su actividad fotosintética, mientras que, cuando hay luz, la planta está en plena actividad y utiliza el agua del suelo como medio de transporte de los microelementos con los cuales se alimenta; ello significará obtener un material con un alto contenido de humedad (Rojas, 2003).

Sin embargo, el método utilizado para la determinación del porcentaje de humedad es un método orientativo, ya que en la calefacción pueden perderse compuestos volátiles distintos del agua.

8.2. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DE LOS EXTRACTOS POLAR Y APOLAR

Los metabolitos secundarios fueron identificados de manera cualitativa mediante ensayos de coloración y precipitación en cada uno de los extractos etéreos y etanólicos de la planta obteniendo los siguientes resultados, donde:

Presente en abundancia	+++
Presente en mediana cantidad	++
Presente en pequeña cantidad	+
Ausente	-

8.2.1. Extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 6:00 a.m.

Tabla 6. Pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 6:00 a.m.

METABOLITO	PRUEBA	ETÉREO	COLOR	ETANÓLICO	COLOR
TANINOS	FeCl ₃	-	No cambió	++	Verde
	Acetato de plomo	-	No cambió	+++	Precipitado blanco
	Gelatina-sal	-	No cambió	++	Precipitado blanco
FLAVONOIDES	Shinoda	-	No cambió	+++	Rojo-vino
	Rosenhein	-	No cambió	+	Color rosa tenue
QUINONAS	Quinona medio ácido	-	No cambió	-	No cambió
	Quinona medio básico	-	No cambió	+++	Naranja-rojo
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	+++	Azul-verdoso	++	No cambió
CARDIOTÓNICOS	Baljet	+++	Naranja-rojo	+++	Rojo ladrillo intenso
	Kedde	+++	Rosa	+++	Rosa-naranja
	Legal	++	Café-naranja	+++	Café-rojo
	Antrona	+++	Verde-azul	+++	Azul
SAPONINAS	Rosenthaler	+	Anillo violeta intenso	+	Anillo rojizo
	Hemólisis	-	No cambió	-	No cambió
LACTONAS TERPÉNICAS	Hidroxamato férrico	-	No cambió	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+++	Verde muy intenso	+++	Verde claro
AZÚCARES	Molish	-		+++	Anillo rojizo
	Tollens	-	No formó espejo	+++	Espejo de plata
	Fehling	-	No formó precipitado	+++	Precipitado rojo-ladrillo
CAROTENOIDES	Karr-Price	+++	Azul intenso-negro	-	No cambió
CUMARINAS	Fluorescencia	-	No cambió	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió	-	No cambió
ALCALOIDES	Mayer	-	No cambió	+++	Precipitado blanco
	Ehrlich	-	No cambió	-	No cambió
	Wagner	-	No cambió	+++	Precipitado café

8.2.2. Extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 4:00 p.m.

Tabla 7. Pruebas fitoquímicas preliminares de los extractos etanólico y etéreo de las hojas recolectadas a las 4:00 p.m.

METABOLITO	PRUEBA	ETÉREO	COLOR	ETANÓLICO	COLOR
TANINOS	FeCl ₃	-	No cambió	++	Verde oscuro
	Acetato de plomo	-	No cambió	+++	Precipitado blanco
	Gelatina-sal	-	No cambió	++	Precipitado blanco
FLAVONOIDES	Shinoda	-	No cambió	+++	Rojo-vino
	Rosenhein	-	No cambió	+	Rosa muy tenue
QUINONAS	Quinona medio ácido	-	No cambió	-	No cambió
	Quinona medio básico	-	No cambió	+++	Naranja oscuro
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	+++	De azul-verdoso a anaranjado	-	No cambió
CARDIOTÓNICOS	Baljet	+++	Rojo ladrillo intenso	+++	Rojo ladrillo
	Kedde	+++	Amarillo tenue	+++	Rosa intenso
	Legal	++	Café maduro	+++	Café maduro
	Antrona	+++	Verde-azul	+++	Azul
SAPONINAS	Rosenthaler	+	Anillo violeta claro	+	Anillo violeta intenso
	Hemólisis	-	No cambió	-	No cambió
LACTONAS TERPÉNICAS	Hidroxamato férrico	-	No cambió	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+++	Verde oscuro	+++	Verde esmeralda
AZÚCARES	Molish	-	No cambió	+++	Anillo violeta débil
	Tollens	-	No cambió	-	No cambió
	Fehling	-	No cambió	+++	Precipitado rojo ladrillo
CAROTENOIDES	Karr-Price	+++	Azul oscuro-negro	-	No cambió
CUMARINAS	Fluorescencia	-	No cambió	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió	-	No cambió
ALCALOIDES	Mayer	-	No cambió	++	Precipitado blanco
	Ehrlich	-	No cambió	-	No cambió
	Wagner	-	No cambió	+++	Precipitado café

8.2.3. Extractos etanólicos (6:00 a.m. y 4:00 p.m.): Según los resultados obtenidos no hubo diferencia en el contenido de metabolitos secundarios para los extractos etanólicos, con respecto a la jornada de recolección del material vegetal.

- El análisis de los extractos etanólicos de las hojas de *Lippia origanoides*, sugiere la presencia de flavonoides con anillo de γ -benzopirona (prueba de Shinoda), detectando sin embargo, la presencia de ion flavilio (prueba de Rosenhein).
- En cuanto a los taninos, se obtuvieron resultados positivos con las 3 pruebas realizadas, indicándonos la presencia de este metabolito en estos extractos, advirtiendo además, que son taninos derivados del ácido protocatéquico, debido a la coloración verde que resultó en la reacción con FeCl_3 .
- Se evidenció también la presencia de antraquinonas al haber reaccionado frente a una base fuerte.
- No se detectó la presencia del sistema anular del ciclopentanoperhidrofenantreno característico de los esteroides.
- Se encontró la presencia de glicósidos cardiotónicos y también de azúcares (cetosas, más no aldosas) y desoxiazúcares.
- No se presenciaron saponinas, coumarinas, ni sesquiterpenlactonas en los extractos.
- De acuerdo con las pruebas realizadas se determinó que si hay presencia de alcaloides en los extractos.

8.2.4. Extractos etéreos (6:00 a.m. y 4:00 p.m.): se esperaba que hubiese algunas alteraciones en el extracto etéreo de las 4:00 p.m. ya que el extracto crudo previo al análisis fitoquímico se sometió a un proceso de saponificación, con el cual, compuestos hidrofóbicos, como los esteroides, podían descomponerse o perderse junto con las grasas y ceras retiradas. Sin embargo, En ambos extractos etéreos se encontró la presencia de los mismos metabolitos secundarios.

- No se detectaron flavonoides, taninos, ni quinonas.
- La presencia de azúcares, alcaloides y coumarinas fue negativa para estos extractos, al igual que de sesquiterpenlactonas y saponinas.
- Se encontró la presencia de carotenoides por la reacción con ácido sulfúrico.
- La presencia del sistema anular de ciclopentanoperhidrofenantreno se pudo evidenciar por los cambios rápidos en la coloración observada.
- Se encontraron glicósidos cardiotónicos y desoxiazúcares.

Se comprobó que la jornada de corte de la planta no influye en la composición de metabolitos secundarios de los extractos etanólico y etéreo, de manera que podría utilizarse cualquier horario para la recolección de la planta, ya que este factor no influirá en los resultados del análisis de esta.

8.3. PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR PERCOLACIÓN

Los metabolitos secundarios fueron identificados de manera cualitativa mediante ensayos de coloración y precipitación en cada uno de los extractos de la planta obteniendo los siguientes resultados:

8.3.1. Extracto por percolación con hexano:

Tabla 8. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con hexano

METABOLITO	PRUEBA	HEXANO	COLOR
TANINOS	FeCl ₃	-	Verde claro
	Acetato de plomo	-	No cambió
	Gelatina-sal	-	No cambió
FLAVONOIDES	Shinoda	-	No cambió
	Rosenhein	-	No cambió
QUINONAS	Quinona medio ácido	-	No cambió
	Quinona medio básico	-	No cambió
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	+++	Gama de colores de azul hasta naranja pálido
CARDIOTÓNICOS	Baljet	++	Rojo ladrillo de mediana intensidad
	Kedde	++	Amarillo-rosa tenue
	Legal	++	Café-naranja
	Antrona	+	Verde-amarillo
SAPONINAS	Rosenthaler	+	Presentó anillo violeta de poca intensidad
	Hemólisis	-	No cambió
LACTONAS TERPÉNICAS	Hidroxamato férrico	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+++	Verde oscuro
AZÚCARES	Molish	-	No cambió
	Tollens	-	No cambió
	Fehling	-	No cambió

CAROTENOIDES	Karr-Price	+++	Verde-azul oscuro, muy intenso
CUMARINAS	Fluorescencia	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió
ALCALOIDES	Mayer	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió
	Wagner	-	No cambió

8.3.2. Extracto por percolación con diclorometano:

Tabla 9. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con diclorometano

METABOLITO	PRUEBA	DICLOROMETANO	COLOR
TANINOS	FeCl ₃	-	No cambió
	Acetato de plomo	-	No cambió
	Gelatina-sal	-	No cambió
FLAVONOIDES	Shinoda	-	No cambió
	Rosenhein	-	No cambió
QUINONAS	Quinona medio ácido	-	No cambió
	Quinona medio básico	-	No cambió
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	+++	Colores desde azul hasta naranja pálido
CARDIOTÓNICOS	Baljet	+++	Rojo ladrillo intenso
	Kedde	+++	Amarillo tenue
	Legal	+++	Café rojizo
	Antrona	+++	Azul medio
SAPONINAS	Rosenthaler	-	No cambió
	Hemólisis	-	No cambió
LACTONAS TERPÉNICAS	Hidroxamato férrico	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+++	Verde esmeralda
AZÚCARES	Molish	+	Anillo violeta de baja intensidad
	Tollens	-	No formó espejo de plata
	Fehling	++	Formó precipitado rojo poco intenso
CAROTENOIDES	Karr-Price	+++	Verde-azul oscuro tendiendo a negro
CUMARINAS	Fluorescencia	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió
ALCALOIDES	Mayer	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió
	Wagner	-	No cambió

8.3.3. Extracto por percolación con etanol:

Tabla 10. Pruebas fitoquímicas preliminares del extracto obtenido por percolación con etanol

METABOLITO	PRUEBA	ETANOL	COLOR
TANINOS	FeCl ₃	+++	Verde oscuro
	Acetato de plomo	+++	Precipitado blanco marfil
	Gelatina-sal	+++	Precipitado blanco
FLAVONOIDES	Shinoda	+++	Rosa oscuro
	Rosenhein	-	No cambió
QUINONAS	Quinona medio ácido	-	No cambió
	Quinona medio básico	+++	Anaranjado
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	-	No cambió
CARDIOTÓNICOS	Baljet	+	Amarillo-rojizo
	Kedde	-	No cambió
	Legal	+	Rojo-café poco intenso
	Antrona	-	No cambió
SAPONINAS	Rosenthaler	+	Anillo morado
	Hemólisis	-	No cambió
LACTONAS TERPÉNICAS	Hidroxamato férrico	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+	Verde-amarillo
AZÚCARES	Molish	+++	Anillo violeta intenso
	Tollens	+++	Formación de espejo de plata
	Fehling	+++	Precipitado rojo intenso
CAROTENOIDES	Karr-Price	-	No cambió
CUMARINAS	Fluorescencia	-	No cambió
	Ehrlich	-	No cambió
ALCALOIDES	Mayer	++	precipitado blanco
	Ehrlich	++	Coloración violeta claro
	Wagner	+++	Precipitado café

8.3.4. Extracto hexano:

- Se encontró la presencia del sistema anular del ciclopentano perhidrofenantreno, por la prueba de Liebermann-Burchard realizada para esteroides.
- Se detectaron glicósidos cardiotónicos, desoxiazúcares y carotenoides.

- Resultó negativa la presencia de quinonas, taninos, flavonoides, alcaloides, azúcares, saponinas, cumarinas y sesquiterpenlactonas.

8.3.5. Extracto diclorometano: en este extracto se encontraron los mismos metabolitos hallados en el extracto hexano, pero con una abundancia relativamente mayor.

- Se detectaron, al igual que en el extracto hexano, glicósidos cardiotónicos y desoxiazúcares, pero también azúcares por las pruebas de Fehling y Molish, de modo que no se trata de la presencia de aldosas (prueba de Tollens).
- Se presenciaron además, esteroides y carotenoides.
- No se encontraron cumarinas, sesquiterpenlactonas, saponinas, alcaloides, taninos, quinonas, y flavonoides.

8.3.6. Extracto etanol:

- Ya en este extracto, por ser de alta polaridad, se encontraron flavonoides con anillo de γ -benzopirona, sin presenciarse el ion flavilio.
- Se encontró positiva la presencia de taninos, igualmente derivados del ácido protocatéquico. Además contenía hidroquinonas, y alcaloides.
- Resultó positiva también la presencia de azúcares y desoxiazúcares, y de glicósidos cardiotónicos, aunque en abundancia relativamente pequeña.
- Resultó negativa la presencia de sesquiterpenlactonas, cumarinas y esteroides, así como de saponinas y carotenoides.

Ahora, si se compara el extracto etéreo con el extracto hexano, ambos muy apolares, se encuentra que la presencia de metabolitos es la misma, por lo tanto, se puede decir que el método de extracción (Soxhlet y Percolación respectivamente) no tiene influencia sobre la composición del extracto, pues, se creía que con el método de Soxhlet, por efectos de la utilización de temperatura, algunos metabolitos se podían descomponer o volatilizarse fácilmente. De esta forma, para obtener el extracto apolar de un material vegetal dado, el método por el cual se extraiga es indiferente, pues ambas técnicas son eficientes y seguras.

Con respecto a los extractos etanólicos de las dos técnicas utilizadas, se encontraron pequeñas variaciones principalmente en la abundancia de los metabolitos.

8.4. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial obtenido con los diferentes tratamientos, presentó coloraciones que van desde amarillo pálido hasta amarillo intenso y posee un olor característico similar al del material sometido a la extracción.

8.4.1. Destilación por arrastre con vapor DAV:

La extracción de aceite esencial por el método de arrastre con vapor se realizó de forma directa e indirecta, comparando los rendimientos de acuerdo al método, y eligiendo el método directo para esta investigación ya que se encontraron mejores resultados para un mismo tiempo de extracción.

Los rendimientos porcentuales obtenidos de acuerdo al peso en gramos de las hojas y la cantidad de aceite extraído se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de rendimiento de las extracciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides*, con hojas frescas y secas, recolectadas a las 6:00 a.m. y a las 4:00 p.m. por el método de D.A.V.

		Rendimiento % (w/w)			
		30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Hoja fresca entera	4:00 p.m.	0.1856	0.2133	0.2510	0.3345
Hoja fresca picada	6:00 a.m.	0.4220	0.4900	0.6687	0.6033
	4:00 p.m.	0.2179	0.4595	0.5473	0.4673
Hoja seca	6:00 a.m.	0.7260	1.5961	1.6579	1.5446
	4:00 p.m.	0.6315	1.1066	1.2360	1.1306

Al analizar los rendimientos de extracción entre las hojas frescas picadas y frescas enteras, recolectadas a las 4:00 p.m. (Figura 4.), se observa que el mayor rendimiento en las hojas picadas puede ser debido a que, por el proceso de picado, se produce un rompimiento de los tricomas glandulares encargados de almacenar el aceite esencial, lo que genera una mejor liberación de este en las células.

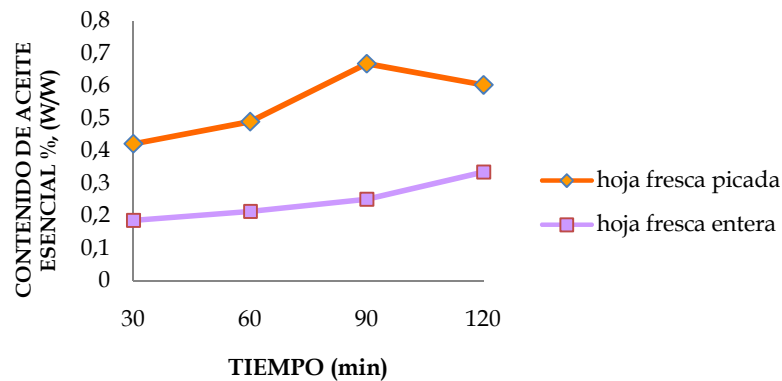


Figura 4. Comparación de la extracción de aceite esencial de *Lippia origanoides* por D.A.V, con hojas frescas picadas y hojas frescas enteras, recolectadas a las 4:00 p.m.

De esta forma, por los resultados obtenidos con esta comparación, se continuaron realizando extracciones únicamente con hojas frescas picadas y hojas secas, pues los rendimientos para las hojas frescas enteras son demasiado bajos.

En la figura 5. se presentan las extracciones de aceite esencial de *L. origanoides* por el método de D.A.V., mostrando el porcentaje de rendimiento de aceite esencial en función del tiempo de extracción para cada una de los tratamientos.

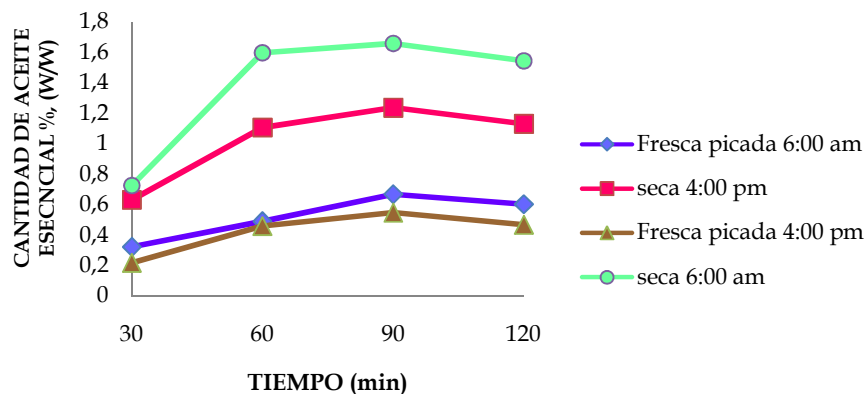


Figura 5. Comparación de las extracciones de aceite esencial de *Lippia origanoides* por el método de DAV variando el estado de las hojas y la jornada de recolección, con respecto al tiempo de extracción

La gráfica de las extracciones por DAV muestra que el tiempo óptimo de extracción para cada uno de los tratamientos fue 90 minutos. Se encontró que el material vegetal en estado seco da un mejor rendimiento que en estado fresco, de igual manera que la recolección de las 6:00 a.m. da mejor rendimiento que la de las

4:00 p.m., pues como se explicó anteriormente, el contenido de humedad en la planta cortada en la mañana es menor que en la tarde por el proceso de fotosíntesis, lo que evidencia que al haber menor cantidad de agua en las hojas la liberación del aceite se facilita y la extracción se hace más eficiente.

8.4.2. Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHD):

Los porcentajes de rendimiento de las extracciones por el método de hidrodestilación asistida por microondas se encuentran consignados en la siguiente tabla:

Tabla 12. Porcentajes de rendimiento de las extracciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides*, con hojas frescas y secas, recolectadas a las 6:00 a.m. y a las 4:00 p.m. por el método de MWHD.

		Rendimiento % (w/w)			
		30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Hoja fresca picada	6:00 a.m.	0.5933	0.6520	0.5928	0.4673
	4:00 p.m.	0.4787	0.5817	0.4356	0.4187
Hoja seca	6:00 a.m.	1.3247	1.7719	1.6399	1.5446
	4:00 p.m.	1.1527	1.4580	1.4540	1.4500

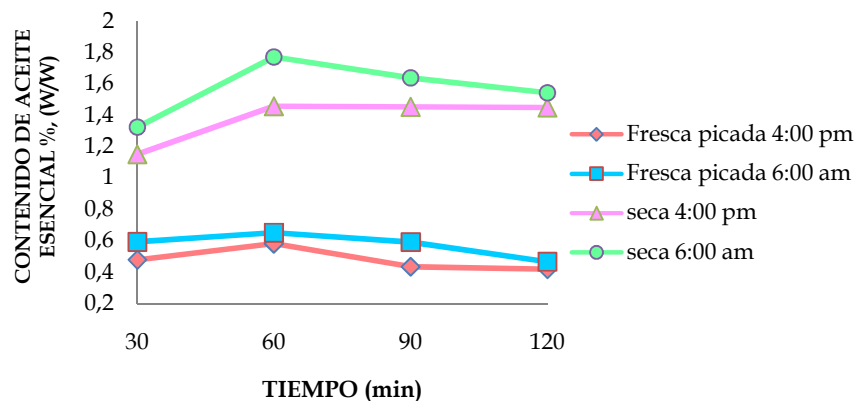


Figura 6. Comparación de las extracciones de aceite esencial de *Lippia origanoides* por el método de MWHD variando el estado de las hojas y la jornada de recolección, con respecto al tiempo de extracción.

Como se puede observar en la gráfica, de la misma forma que con el método de DAV, las extracciones con el material vegetal en estado seco tienen mayor rendimiento que en estado fresco, al igual que el recolectado a las 6:00 a.m. es mejor que el de las 4:00 p.m. Sin embargo, se pudo apreciar que el tiempo de extracción óptimo por este método fue de 60 minutos.

La comparación de los métodos de extracción, teniendo en cuenta el tratamiento que resultó óptimo para ambos (hojas secas recolectadas a las 6:00 a.m.) se muestra en la figura 7.

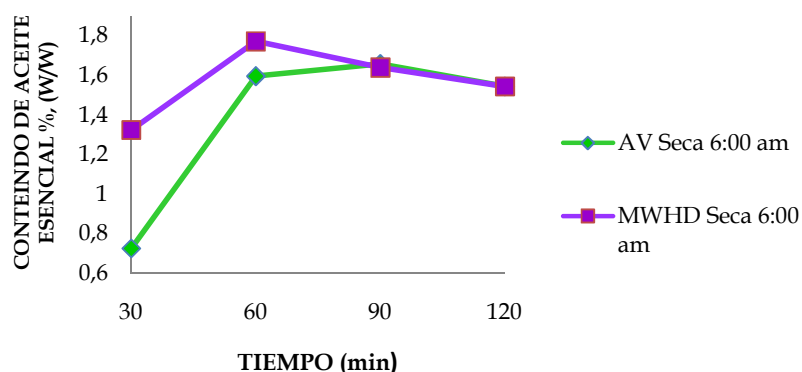


Figura 7. Comparación de las extracciones realizadas DAV y MWHD con hojas secas recolectadas a las 6:00 a.m.

Lo que podemos deducir, es que el método de MWHD es mejor al compararse con el método de arrastre de vapor, pues no solo se obtiene un mayor rendimiento porcentual del aceite extraído, sino que además se reduce el tiempo de extracción, lo cual implica una reducción en los costos de producción. Esto es debido a que las microondas involucran un flujo de calor más eficiente, pues a diferencia de los métodos clásicos de calentamiento conductivo, las microondas pueden calentar toda la muestra casi simultáneamente y a un ritmo alto de calentamiento. Además, esto puede ser también, como reportaron Golmakani & Rezaei (2007), porque las microondas causan la ruptura de las paredes glandulares más rápida y eficientemente, por la diferencia en el tipo de transferencia de calor, pues la MWHD utiliza tres modos de transferencia de calor en la muestra: irradiación, conducción y convección. Con la DAV, la transferencia de calor puede ocurrir solamente a través de conducción y convección. Como resultado, con MWHD, el calor es producido más rápidamente dentro de las glándulas así como en su exterior.

Cabe anotar que las plantas sometidas a extracción del aceite esencial se encontraban en estado de floración, lo cual optimiza los rendimientos obtenidos, pues en el ciclo de vida de las plantas, la producción de aceites alcanza altos niveles durante este periodo (Golmakani & Rezaei, 2007).

8.5. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL

Tabla 13. Propiedades físicas del aceite esencial extraído de *Lippia origanoides* H.B.K.

PROPIEDADES FÍSICAS	VALORES
Gravedad específica (25 °C)	0.93212
Índice de refracción (20 °C)	1.5158
pH (25 °C)	4.43

Con la densidad y el índice de refracción se pueden hacer deducciones sobre los componentes. Por lo tanto, densidades menores de 0.9 e índices de refracción menores de 1.47 sugieren un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es mayor de 0.9 y el índice de refracción menor de 1.47 es posible que haya compuestos oxigenados alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen densidades menores de 0.9 pero sus índices de refracción son mayores de 1.47. Los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos tienen densidades e índices de refracción superiores a los límites señalados (Domínguez, 1973). Esta información nos da una idea acerca de la composición del aceite esencial de *L. Origanoides*, ya que se ha reportado antes que los componentes mayoritarios son timol y carvacrol, dos compuestos aromáticos oxigenados (Ruiz *et al*, 2007; Oliveira *et al*, 2007).

Los aceites esenciales, generalmente, tienen pH ácido, lo que constituye otra característica de su actividad bactericida. La acidez se opone a la multiplicación o proliferación microbial y la alcalinidad la fomenta (Damian, 2004).

8.5.1. Solubilidad en soluciones etanol-agua

Tabla 14. Solubilidad de los aceites esenciales en mezclas etanol-agua de diferentes concentraciones.

Temperatura	Concentración de la solución etanólica (%)				
	98	90	80	70	60
20°C	S	PS	PS	I	I

S: Soluble; PS: Parcialmente Soluble; I: Insoluble

Se encontró que el aceite esencial es soluble en el etanol al 98%, y en las concentraciones menores a esta no se solubilizó. La solubilidad a 20 °C de una

esencia en soluciones etanol-agua depende de su contenido de compuestos oxigenados (Domínguez, 1973).

8.5.2. Solubilidad en Tween 80 y dimetilsulfóxido:

Tabla 15. Resultados de la solubilidad del aceite esencial de *Lippia origanoides* en diferentes concentraciones de Tween 80 y Dimetilsulfóxido

Solvente	Concentración	Resultado
Tween 80	0.05	S
	0.01	PS
DMSO	99	I
	90	I
	80	I

DMSO: dimetilsulfóxido; S: Soluble; PS: Parcialmente Soluble; I: Insoluble.

El aceite esencial resultó insoluble en Dimetilsulfóxido en las diferentes concentraciones, mientras que en Tween 80, fue soluble para la concentración de 0.05 %, sin embargo, este solvente no nos sirvió de vehículo de difusión del aceite esencial sobre el agar, al momento de realizar la actividad antimicrobiana.

8.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

8.6.1. Espectroscopía Ultravioleta-Visible:

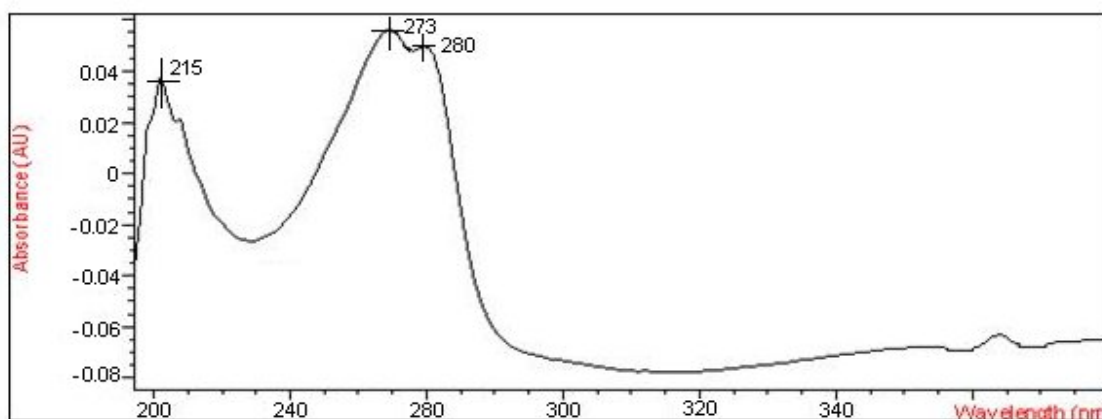
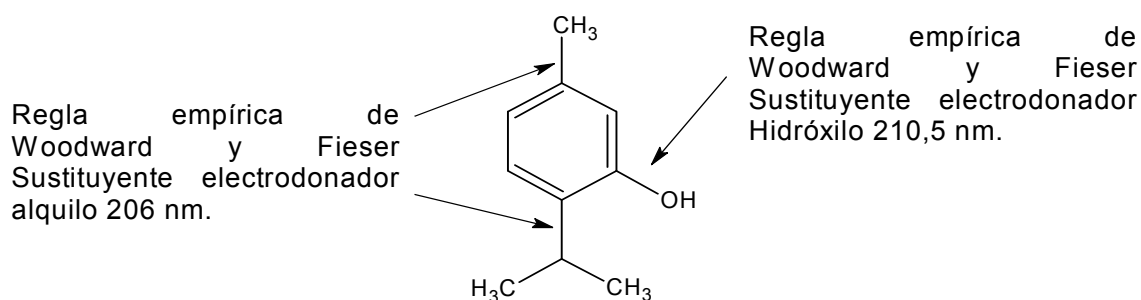


Figura 8. Espectro UV del aceite esencial de *Lippia origanoides*

Los valores de las longitudes de onda de los tres picos que se obtuvieron en el espectro UV del aceite esencial y sus respectivas absorbancias, se encuentran en la tabla 16.

Tabla 16. Longitudes de onda máximas obtenidas del espectro UV del aceite esencial de *Lippia origanoides*.

Pico N°	λ (nm)	Absorbancia
1	215	0.04
2	273	0.055
3	280	0.05



El anillo bencénico presenta una absorción en la región ultravioleta de 203,5 nm correspondiente a una transición prohibida del estado del orbital π_1 a $^*\pi_4$ y $^*\pi_5$. Un sustituyente hidroxilo aumenta la energía de transición, debido a la introducción de electrones al anillo por efecto inductivo, por ende, se presenta una nueva longitud de onda a 210,5 nm. Como la molécula del timol presenta un anillo bencénico trisustituido, y cada sustituyente es un electrodonador, hace que, experimentalmente, la longitud de onda en la región ultravioleta aumente a 215 nm. La banda que aparece en 280 es característica del anillo bencénico.

8.6.2. Espectroscopía Infrarroja:

El espectro IR mostrado en la figura 10. Fue el obtenido para extracciones con DAV y con MWHD. Con todos los tratamientos fue idéntico.

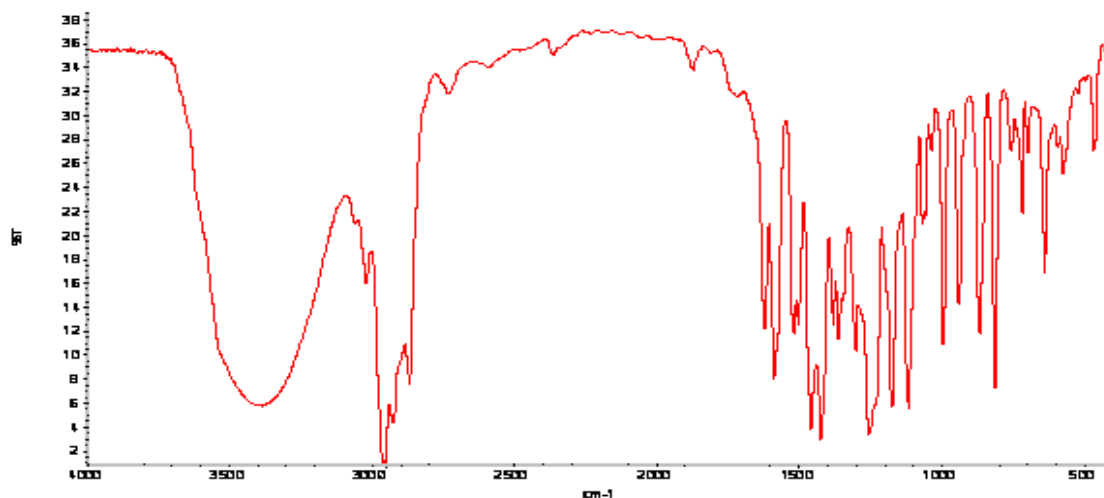


Figura 9. Espectro I.R. del aceite esencial de *Lippia origanoides*

Las frecuencias en cm^{-1} , correspondientes al análisis del espectro infrarrojo del aceite esencial de *L. origanoides* son las siguientes:

IR cm^{-1} (3387, 3015, 2949, 2913, 2872, 2737, 1875, 1797, 1621, 1589, 1519, 1496, 1413, 1392, 1360, 1298, 1245, 1164, 1106, 1061, 935, 874, 808, 759, 645, 571, 461)

La presencia de una señal amplia de intensidad media a 3387 cm^{-1} nos muestra una banda característica de los alcoholes, que corresponde a una tensión asimétrica debida al enlace O-H.

Los enlaces C-H de grupos metil y metileno muestran estiramientos simétricos y asimétricos en la región comprendida entre $3000\text{-}2900 \text{ cm}^{-1}$, en este espectro aparecen dos bandas bien definidas e intensas, a 2949 y 2913 cm^{-1} respectivamente. La presencia de anillos aromáticos se confirma por una banda a 1589 que indica una vibración de tensión C=C del anillo.

Para anillos aromáticos trisustituidos, las vibraciones de deformación se muestran fuera del plano a 874 y 808 cm^{-1} .

Entre $1475\text{-}1300$ se presentan las vibraciones de deformación C-H, de las cuales se encuentran dos picos de intensidad media, a 1496 y 1413 cm^{-1} .

Las deformaciones fuera del plano de C-H por los enlaces C=C-H del anillo aromático se encuentran en la región comprendida entre 100 y 650 cm^{-1} .

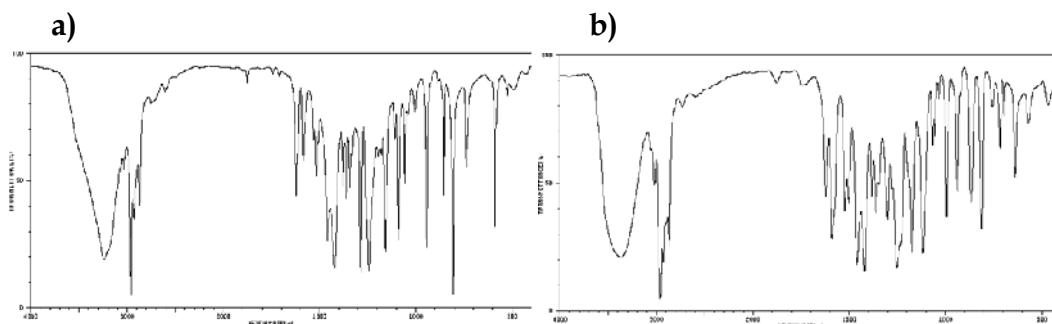


Figura 10. Comparación con los espectros I.R de los compuestos mayoritarios del aceite esencial a) IR del carvacrol, b) IR del timol (Fuente SBDS)

Al hacer una comparación de los espectros IR encontrados en la literatura de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia origanoides*, Timol y Carvacrol respectivamente, con el espectro IR del aceite esencial que se extrajo de la planta cultivada en el Quindío, se puede observar que las diferencias en las bandas obtenidas son mínimas, las absorciones de los grupos funcionales son similares.

8.6.3. Cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (CG-MS):

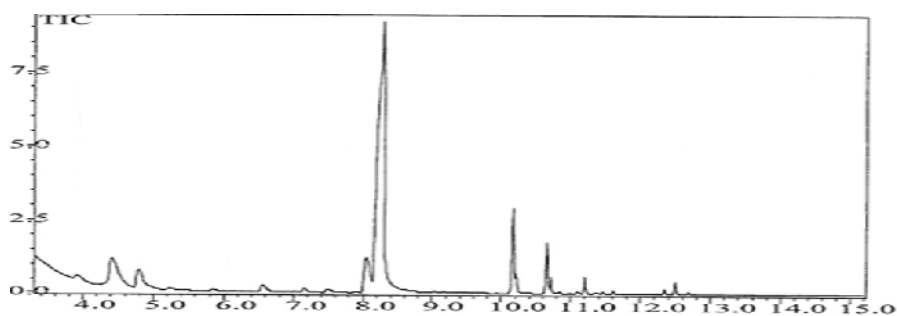


Figura 11. Cromatograma del aceite esencial obtenido por DAV con hojas secas

Los compuestos de los aceites esenciales extraídos fueron identificados por la comparación de los modelos de fragmentación de sus espectros de masa con aquellos de compuestos similares de una base de datos. Para cada compuesto del cromatograma, el porcentaje de área de pico relativa a las áreas de los picos totales de todos los compuestos fue determinada y reportada como cantidad relativa de ese compuesto.

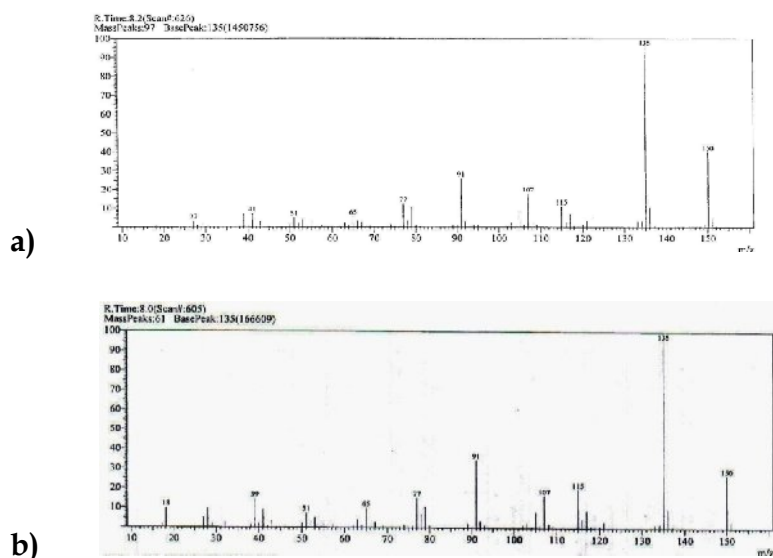


Figura 12. Espectros de masas de los compuestos mayoritarios del aceite esencial con hojas secas y con hojas frescas, a) Timol; b) Carvacrol

Tabla 17. Compuestos identificados en el aceite esencial de *Lippia organoides* extraído por D.A.V. con hojas secas, empleando CG-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico base	Área - % abundancia
Carvacrol	8,033	135	9,56
Timol	8,208	135	83,23
Trans-cariofileno	10,158	41	2,89
β -selineno	10,650	93	3,50
Oxido de cariofileno	12,342	41	0,82

Tabla 18. Compuestos identificados en el aceite esencial de *Lippia organoides* extraído por D.A.V. con hojas frescas picadas, empleando CG-MS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Pico base	Área - % abundancia
carvacrol	8,067	135	7,3812
Timol	8,275	135	89,982
trans-cariofileno	10,183	41	2,6369

Se encontró que el aceite esencial de *Lippia origanoides* extraído por D.A.V. es rico en monoterpenos fenólicos, pues con hojas frescas y hojas secas se presentaron cantidades considerablemente altas de Timol, seguido de Carvacrol, que es un isómero de éste. Los porcentajes de abundancia con respecto al tratamiento de las hojas (frescas y secas) de los tres compuestos que se encuentran en común fueron similares. Se evidenció que el porcentaje de abundancia de Timol en el aceite esencial (89.982) para la planta cultivada en el departamento del Quindío fue mayor al reportado por la literatura (53.6%, Ruíz, 2007).

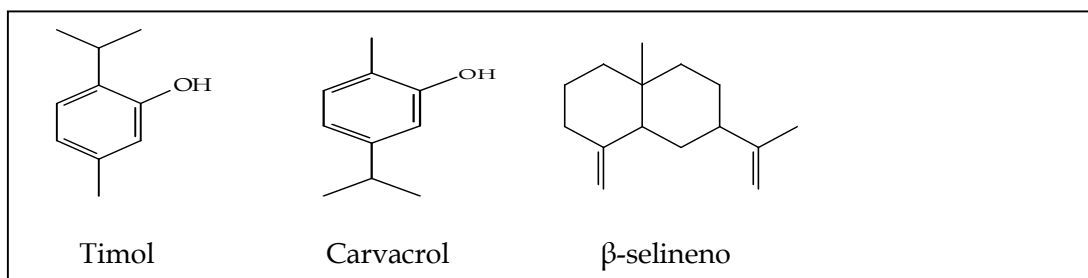
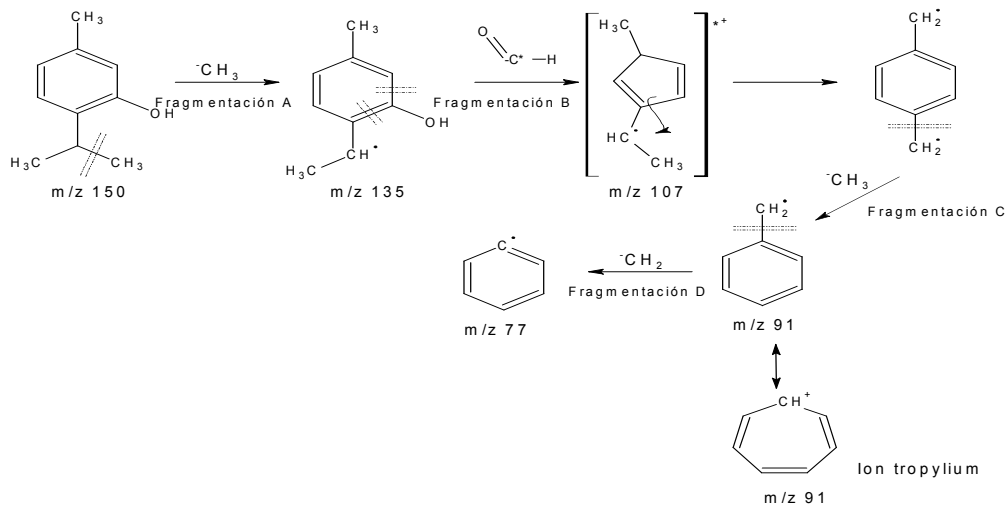


Figura 13. Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia origanoides*.

8.6.3.1. Posibles rutas de fragmentación del timol

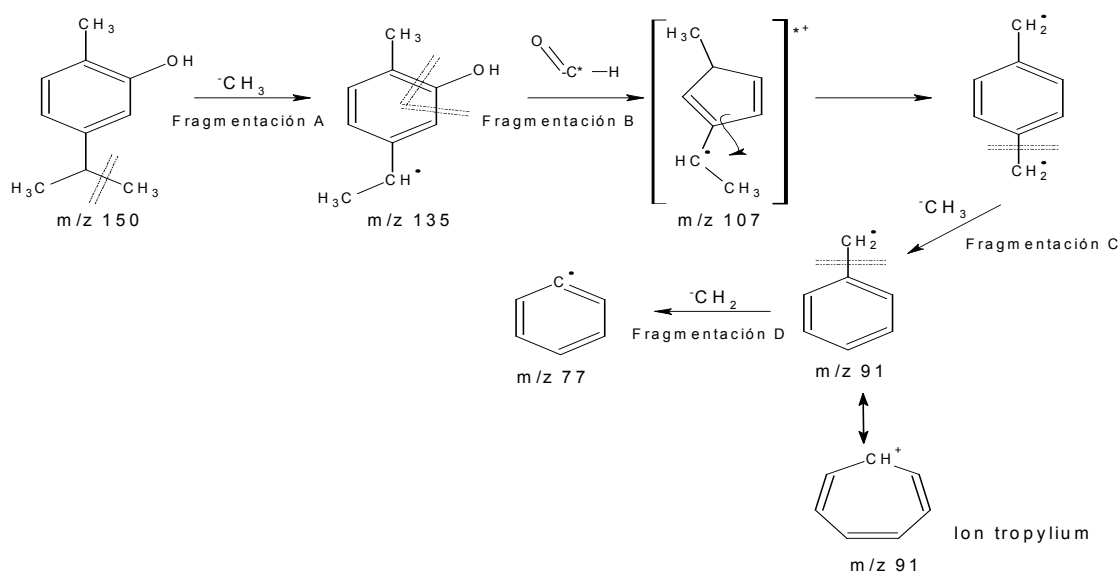


Esquema 1. Posibles rutas de fragmentación del Timol

El espectro de masas del timol, compuesto mayoritario en ambas extracciones, presenta un Ion molecular (masa / carga) de 150, y un pico base de 135.

Se plantea cuatro posibles rutas de fragmentación denominadas A, B, C, D. La ruta de fragmentación **A**, incluye la pérdida de 15 unidades de m/z , tratándose probablemente de un detrimento del grupo metilo ubicado en el grupo isopropilo. La ruta de fragmentación **B**, representa la perdida de 43 unidades de m/z , tratándose probablemente del detrimento del fenol por la pérdida del ion formilo, característico a la fragmentación del COH del benceno, ocurriendo después un reordenamiento en la estructura, continuando con la fragmentación de ella con otra ruta llamada **C**, la cual representa la pérdida de 59 unidades de m/z , tratándose probablemente del detrimento del radical metilo, generando un ion tropylium. La fragmentación **D**, incluye la pérdida de 73 unidades de m/z , tratándose probablemente del detrimento de un metilo, resultando un compuesto cargado positivamente.

8.6.3.2. Posibles rutas de fragmentación del carvacrol



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del Carvacrol

El espectro de masas del Carvacrol, uno de los compuestos mayoritarios en ambas extracciones, presenta un Ion molecular (masa / carga) de 150, y un pico base de 135. Al ser isómero del Timol, las posibles rutas de fragmentación son similares.

Con base en el análisis de los espectros de Infrarrojo, Ultravioleta, y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se pudo encontrar que los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia organoides* son Timol y

Carvacrol. Con esta información se puede afirmar que en el Quindío, la especie de *Lippia origanoides* cultivada corresponde al quimiotipo de Timol.

8.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS POLAR Y APOLAR

Los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos con los extractos (tabla 18.) se midieron en milímetros. Se compararon variaciones en la actividad antimicrobiana con respecto a la polaridad del extracto y la hora de recolección de la planta.

Tabla 19. Diámetros de los halos de inhibición de los extractos polar y apolar por el método de difusión en disco.

Microorganismos	Diámetros de los halos de inhibición (mm)					
	1	2	3	4	EP	ET
<i>Candida albicans</i>	N	12	N	12	N	N
<i>Enterococcus gallinarum</i>	7	14	7	15	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	N	36	N	16	N	N
<i>Aeromonas hidrófila</i>	N	14	N	12	N	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	N	16	N	16	N	N
<i>Escherichia coli</i>	N	30	N	21	N	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	12	N	15	N	N
<i>Proteus mirabilis</i>	N	11	N	15	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N	20	7	16	N	N

N: Negativo, 1: extracto Etanólico de las 6:00 a.m., 2: extracto Etéreo de las 6:00 a.m., 3: extracto Etanólico de las 4:00 p.m., 4: extracto Etéreo de las 4:00 p.m., EP: Éter de Petróleo, ET: Etanol

Se observó que la actividad de los extractos etanólicos de las 6:00 a.m. y las 4:00 p.m. fue escasa, ya que solamente *Enterococcus gallinarum* y *Pseudomonas aeruginosa* mostraron susceptibilidad, aunque con diámetros muy pequeños, comparados con los obtenidos con los extractos etéreos de ambas jornadas, los cuales resultaron efectivos contra todos los microorganismos evaluados. En los extractos etéreos, los diámetros de los halos de inhibición fueron similares para ambas jornadas de corte de la planta, a excepción de *Staphylococcus aureus*, que en el extracto etéreo de las 6:00 a.m. el diámetro fue superior al de las 4:00 p.m. en el doble de milímetros.

Los solventes respectivos de cada extracto se utilizaron como control negativo, ya que no mostraron actividad antimicrobiana, pues alrededor de los discos impregnados con estos el crecimiento fue normal.

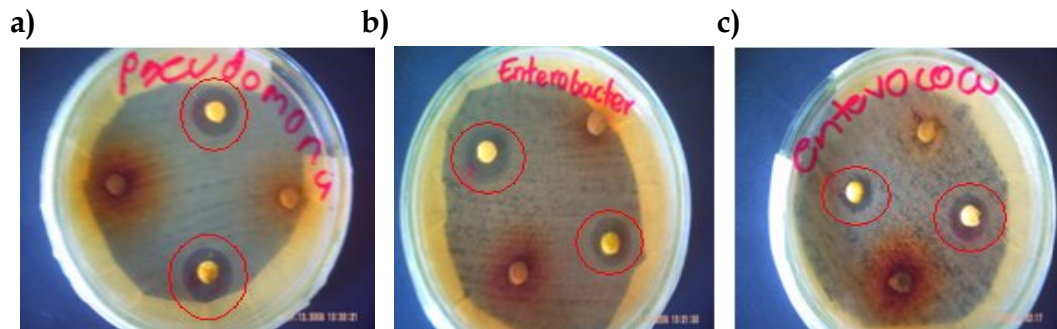


Figura 14. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y etéreo empleando el método de Kirby-Bauer modificado. Los halos de inhibición de los extractos 2 y 4 están señalados con círculos rojos; a) actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, halos de inhibición de 20 y 16 mm respectivamente); b) actividad contra *Enterobacter cloacae*, los halos tuvieron el mismo diámetro (16mm); c) actividad contra *Enterococcus gallinarum*, 15 y 14 mm respectivamente.

8.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE LA PERCOLACIÓN

Tabla 20. Diámetros en milímetros de los halos de inhibición de los extractos obtenidos por percolación utilizando el método de difusión en disco.

Microorganismos	Diámetros de los halos de inhibición (mm)					
	EXTRACTO VEGETAL DE PERCOLACIÓN			SOLVENTE (CONTROL NEGATIVO)		
	ED	EH	EE	DI	HE	ET
<i>Candida albicans</i>	--	--	N	N	N	N
<i>Enterococcus gallinarum</i>	--	--	N	N	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	11	N	N	N	N
<i>Aeromona hidrófila</i>	14	9	N	N	N	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	21	7	N	N	N	N
<i>Escherichia coli</i>	21	15	8	N	N	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	11	12	N	N	N
<i>Proteus mirabilis</i>	22	19	10	N	N	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	12	N	N	N	N

ED: Extracto diclorometano, EH: Extracto hexano, EE: Extracto etanólico, DI: Diclorometano, HE: Hexano, ET: Etanol, N: Negativo.

Los diámetros de los halos de inhibición de *Candida albicans* y *Enterococcus gallinarum* con los extractos de diclorometano y hexano fueron muy grandes, lo cual imposibilitó la medición de sus diámetros.

Al igual que en los extractos polar y apolar, la actividad del extracto de etanol no fue muy buena, pues solo inhibió el crecimiento de tres microorganismos. Con el extracto de diclorometano la inhibición fue mejor comparada con el extracto de hexano. Esto indica que los metabolitos responsables de esta actividad tienen una polaridad intermedia. En este extracto se puede evidenciar, además, una mayor actividad en las bacteria Gram-positivas debido, en gran parte, a la elevada resistencia a los antimicrobianos que poseen las Gram-negativas.

Por el método de percolación los extractos mostraron una actividad ligeramente mayor que con aquellos obtenidos por el método de Soxhlet, indicando que, aunque el sometimiento del material vegetal a la acción de la temperatura no influye en la composición de metabolitos secundarios (al menos cualitativamente), puede disminuir en cierta forma su actividad antimicrobiana.

8.9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Inicialmente se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial haciendo 6 perforaciones en cada caja de petri de 3 mm cada una, depositando en cada perforación 10 μ L del aceite esencial sin emplear disolvente de la siguiente manera. Aceites obtenidos por el método de MWHHD con el tiempo óptimo de extracción de 60 minutos:

1. hoja fresca picada, 6:00 a.m.
2. hoja seca, 6:00 a.m.
3. hoja fresca picada, 4:00 p.m.
4. hoja seca, 4:00 p.m.

Aceites obtenidos por el método de arrastre por vapor con el tiempo óptimo de extracción de 90 minutos:

- A. hoja fresca picada, 6:00 a.m.
- B. hoja seca, 6:00 a.m.
- C. hoja fresca picada, 4:00 p.m.
- D. hoja seca, 4:00 p.m.



Figura 15. Perforaciones sobre el agar Mueller Hinton. Se puede observar la distribución del aceite en la caja de petri.

Sin embargo, el aceite no logró difundirse en el medio como se esperaba, pues se quedó depositado en las perforaciones respectivas y los microorganismos crecieron alrededor de estos.

Posteriormente se repitieron estos mismos análisis utilizando como disolventes etanol al 98 % y tween 80 (0.5 % en agua) y depositando en una de las perforaciones el respectivo solvente como control negativo.



Figura 16. Actividad antimicrobiana del aceite esencial, utilizando Tween 80 como disolvente. Se observa la formación de una emulsión sobre el agar, dificultando la lectura de resultados.

Como se pudo observar figura 16., la mezcla del tween 80 con el aceite formó una especie de emulsión dificultando la visualización de la existencia de halos de inhibición. Por esta razón se continuó trabajando con etanol al 98 %, con el cual había una buena difusión sobre el medio y no presentó actividad inhibitoria alguna contra los microorganismos estudiados, pues alrededor de la perforación que contenía el etanol hubo crecimiento normal, mientras que en las perforaciones de

los aceites se podían identificar los halos. Sin embargo, debido a que todos los aceites esenciales evaluados presentaban actividad, se hizo imposible la medición de los diámetros, pues se presentó un efecto de sinergismo (el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más antimicrobianos en los microorganismos el cual es superior a la suma del efecto individual de cada antimicrobiano), por lo cual, los posteriores ensayos se hicieron realizando una perforación por caja de petri, para así facilitar la lectura de los resultados.

Haciendo esta modificación se determinó que para cada una de las variaciones en las extracciones la actividad antimicrobiana era la misma, por lo tanto se continuaron los análisis empleando el aceite esencial que se obtuvo con mayor rendimiento de acuerdo a los tratamientos antes mencionados.

Utilizando también este método de perforaciones en el agar se determinó la concentración mínima inhibitoria, utilizando diferentes concentraciones en porcentaje (v/v) tomando el aceite esencial puro (100 %) y utilizando etanol como disolvente. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición y estos fueron expresados en mm.

Tabla 21. Zonas de inhibición del crecimiento de los microorganismos en mm con el aceite esencial de *Lippia origanoides*

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)							
	70%	50%	40%	30%	20%	10%	5%	1%
<i>Candida albicans</i>	65	55	35	35	31	28	25	20
<i>Enterococcus gallinarum</i>	34	27	25	20	18	N	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	37	32	25	20	14	N	N
<i>Aeromona hidrófila</i>	33	28	23	15	10	N	N	N
<i>Enterobacter cloacae</i>	32	29	24	23	11	N	N	N
<i>Escherichia coli</i>	33	31	28	28	25	N	N	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Proteus mirabilis</i>	31	26	18	17	N	N	N	N
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	30	26	26	24	10	N	N	N

N: Negativo

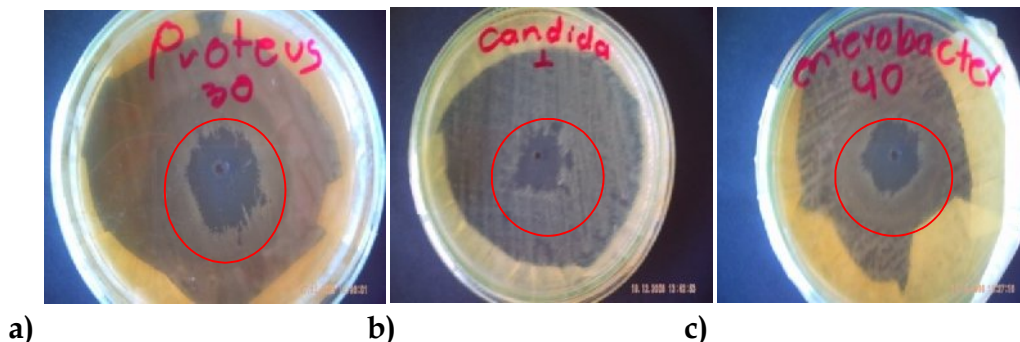


Figura 17. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* con etanol al 98 % como disolvente. Se pueden observar los halos de inhibición alrededor de cada perforación respectivamente a) *Proteus mirabilis*, aceite al 30%; b) *Candida albicans*, aceite al 1%; c) *Enterobacter cloacae*, aceite al 40%.

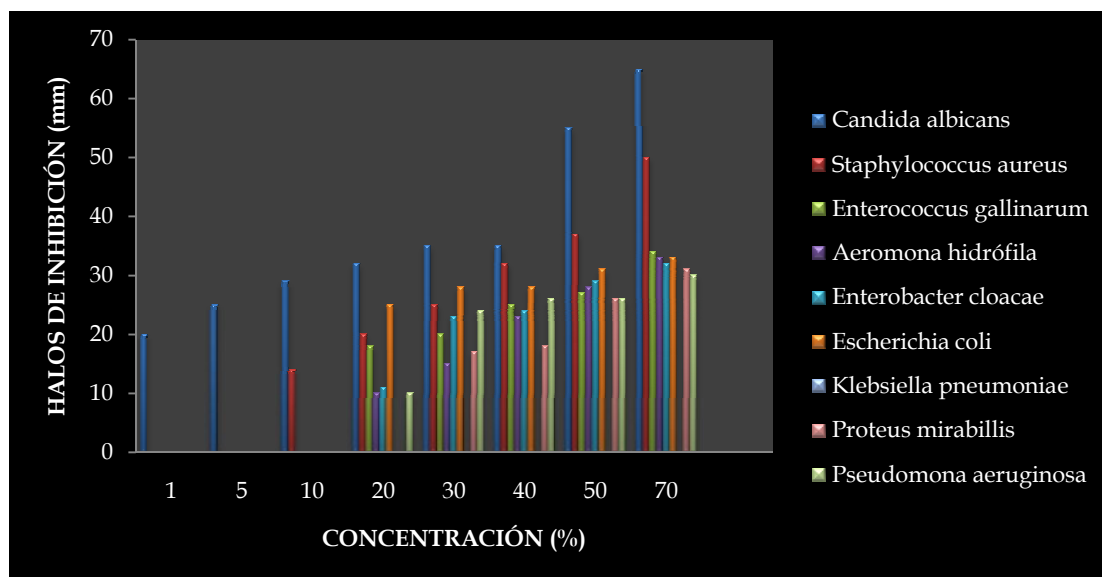


Figura 18. Diámetro de los halos de inhibición de todos los microorganismos evaluados con respecto a la concentración de aceite esencial.

La *Klebsiella pneumoniae* se mostró resistente frente al aceite esencial, debido muy seguramente a su alta capacidad de producir β -lactamasas que inactivan fuertemente al antimicrobiano que la ataca. La *Candida albicans* fue la que resultó tener mayor actividad antimicrobiana, pues aun en concentraciones del 1 % (p/p) de aceite esencial, los halos de inhibición tuvieron diámetros de tamaño considerable. De igual manera, como se esperaba, la acción inhibitoria de las

bacterias Gram-positivas fue mayor que la de las Gram-negativas, lo que se explica por la diferencia en la composición de la membrana de estos microorganismos.

La actividad biológica en los aceites esenciales no se puede atribuir a un compuesto en particular. La actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia terpenoides.

La naturaleza antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K., está aparentemente relacionada con sus componentes fenólicos, timol y carvacrol. Especialmente, la gran cantidad de timol en el aceite (83.23 %), puede ser responsable de la alta actividad presentada. Con respecto a los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales se puede afirmar que el efecto de inhibición es mayor en las bacterias Gram-positivas que en las Gram-negativas. Esto puede deberse a que la capa externa de la membrana de las Gram-negativas está compuesta principalmente de moléculas de lipopolisacáridos y forma una barrera de permeabilidad hidrofílica que le provee protección contra los efectos de antimicrobianos altamente hidrofóbicos (Trombetta *et al*, 2005), en este caso, los extractos que resultaron positivos fueron los etéreos, que son altamente insolubles en agua, al igual que los aceites.

Como reportó Murphy (1999), los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, hongos y protozoos. Sin embargo, el mecanismo de acción de los terpenos no está completamente comprendido, pero se especula que involucra el rompimiento de la membrana por los compuestos lipofílicos. Maguna *et al* (2006) menciona en su publicación que, uno de los principales mecanismos de acción de los terpenoides consiste en la disrupción de la membrana mediante 3 posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos 3 efectos produce la muerte en la célula bacteriana.

En otros estudios referentes al timol se ha demostrado que los terpenoides tienen la capacidad de interactuar con las membranas fosfolipídicas, la cual puede ser explicada por un efecto atribuible a la introducción de moléculas lipofílicas que actúan como impurezas en la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, la capacidad de un antimicrobiano para afectar la permeabilidad de la membrana es influenciada no solo por la carga neta de la superficie de la membrana sino también de su composición lipídica (Trombetta *et al*, 2005).

Se evaluó la capacidad antimicrobiana del aceite esencial contra una cepa de *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

Tabla 22. Diámetros de los halos de inhibición de aceite esencial sobre *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

Microorganismo	Halos de inhibición (mm)			
	70%	50%	30%	20%
<i>Pseudomona aeruginosa</i> multirresistente	10	9	9	7



Figura 19. Halo de inhibición de aceite esencial al 20% contra *Pseudomona aeruginosa* multirresistente

8.10. SEPARACIÓN DE UN COMPUESTO DEL EXTRACTO ETÉREO

Teniendo en cuenta que el extracto etéreo fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana con respecto al etanólico, se realizaron procedimientos cromatográficos para su separación, corroborando su identidad con pruebas fitoquímicas preliminares y espectroscopía UV.

8.10.1. Cromatografía en capa fina:

La cromatografía en capa fina se realizó con el extracto etéreo de las 6:00 a.m. buscando el eluyente que lograra separar definitivamente cada una de las fracciones del extracto. Se utilizaron placas cromatográficas (2cm x 10cm) con sílica gel. Al realizar una CCD utilizando hexano como fase móvil, se observó que parte de los compuestos ascendían por la placa, pero quedó una mancha muy notoria en la base de la placa; esto sugirió utilizar una fase móvil incrementando la polaridad.



Figura 20. Cromatograma del extracto etéreo de las 6:00 a.m. utilizando hexano como eluyente

Tabla 23. Valor de Rf para la fracción separada por CCD con hexano como eluyente.

N°	Rf
1	0.923

Después de hacer variaciones con respecto a la polaridad de los solventes se encontró que la mezcla hexano - acetato de etilo (4:1) generaba buenos resultados, debido a que se observaron varios puntos bien definidos y separados, correspondientes a los diferentes compuestos de dicho extracto.



Figura 21. Cromatograma del extracto etéreo de las 6:00 a.m. utilizando una mezcla hexano - acetato de etilo (4:1) como eluyente

Tabla 24. Valores de Rf de las fracciones separadas por CCD con hexano - acetato de etilo (4:1) como eluyente

N°	Rf
1	0.128
2	0.333
3	0.461
4	0.615
5	0.846
6	0.974

8.10.2. Cromatografía en columna:

Con base en los resultados de la cromatografía en capa fina se corrió la cromatografía en columna utilizando como fase móvil, hexano, y verificando la separación de los componentes por cromatografía en capa fina. Se obtuvieron 38 fracciones, de la 1 a la 30 (A), y de la 31 a la 38 (B). A esta última se hizo una extracción con metanol, resultando dos fracciones, B1 (Hexano) y B2 (Metanol), resultando de interés la fracción B1

Tabla 25. Análisis fitoquímico de las fracciones separadas por métodos cromatográficos

METABOLITO	PRUEBA	FRACCIÓN B	COLOR	FRACCIÓN B1	COLOR
ESTEROLES	Lieberman-Burchard	+++	Azul-verdoso	+++	Azul-verdoso
CARDIOTÓNICOS	Baljet	+++	Rojo ladrillo	+++	Rojo ladrillo
	Kedde	+++	Azul	+++	Azul
	Legal	+++	Café	+++	Café
	Antrona	+++	Verde-azul	+++	Azul
SAPONINAS	Rosenthaler	+	Anillo violeta intenso	-	No cambió
	Hemólisis	-	No cambió	-	No cambió
DESOXIAZÚCARES	Keller-Killiani	+++	Anillo azul	+++	Anillo azul-verdoso
CAROTENOIDES	Karr-Price	+++	Azul oscuro intenso	-	No cambió

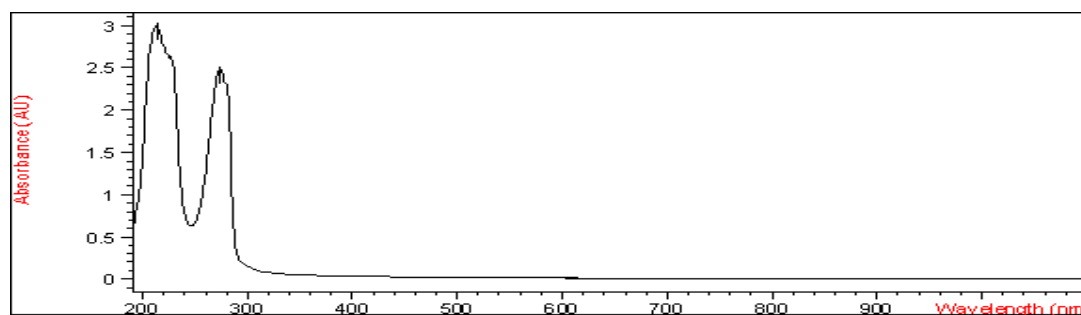


Figura 22. Espectro UV de la fracción B1, obtenida por cromatografía

Tabla 26. Longitudes de onda máximas obtenidas del espectro UV de la fracción B1

λ	Absorbancia
214	3.0
274	2.5

De acuerdo con las pruebas fitoquímicas y con el espectro UV obtenido podemos sugerir que el compuesto separado es un glicósido cardiotónico.

El grupo cromóforo de la lactona insaturada presenta una absorción a 202nm, cuya longitud de onda se ve incrementada en 12nm por la sustitución en C- β , que corresponde al sistema esteroidal, quedando finalmente con una absorción de 214nm. La absorción de 274nm corresponde al anillo esteroidal.

8.10.3. Actividad antimicrobiana de la fracción B1

Se le hicieron ensayos de actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco contra los nueve microorganismos antes mencionados y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Tamaño de los halos de inhibición de la fracción B1 por el método de difusión en disco

Microorganismo	Halo de inhibición (mm)
<i>Proteus mirabilis</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9



Figura 23. Halo de inhibición de la fracción B1 con *Proteus mirabilis*

La actividad presentada por este compuesto no fue muy buena, pues solo se presentó contra tres microorganismos y los halos fueron muy pequeños comparados con los diámetros obtenidos con el extracto etéreo inicial, lo cual sugiere que, aunque el compuesto separado posee actividad antimicrobiana, esta se ve realzada cuando se encuentra combinada con otros metabolitos.

8.11. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE CITOTOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides*

Las células, al iniciar el ensayo de citotoxicidad se encontraban formando una monocapa como se muestra a continuación

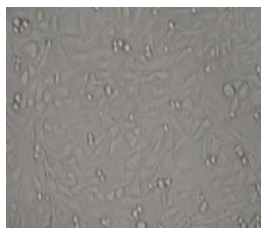


Figura 24. Células formando monocapa. Se puede apreciar la capa de células bien definidas.

Al observar los resultados de toxicidad después de 12 horas de incubación se encontró que había cambios en la morfología de las células

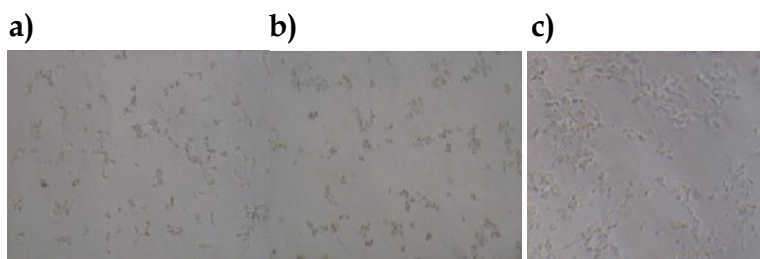


Figura 25. Daños ocurridos en las células por el aceite esencial de *Lippia origanoides*. a) toxicidad de 10 μ L de aceite esencial adicionados a las células, las células cambiaron, algunas han muerto; b) toxicidad de 5 μ L de aceite esencial adicionados a las células, se ven pocas células, sus formas cambiaron; c) al adicionar 1 y 0.5 μ L la toxicidad es menor, pero se observan células formando cúmulos.



Figura 26. Efecto citotóxico del solvente al 0.5 % en las células

Se observó que el solvente en concentraciones del 0.5 % no tuvo efecto perjudicial sobre las células, lo cual indica que el daño producido sobre estas era causado por el aceite esencial

8.12. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) DE LOS ACEITES Y EXTRACTOS POLARES Y APOLARES

8.12.1. Concentración letal media (CL₅₀) del aceite esencial:

Inicialmente se utilizaron concentraciones de 1000 a 5 ppm, realizando las lecturas a las 24, 48 y 72 horas; sin embargo, a partir de 500 ppm la mortalidad fue instantánea, y entre 250 y 10 ppm los nauphilus murieron a las 24 horas. Por ello, se determinó que debía cambiarse tanto el intervalo de tiempo de lectura como de las concentraciones de aceite esencial. Así, el análisis se hizo de la siguiente forma:

Tabla 28. Lectura de larvas muertas en el aceite esencial

CONCENTRACIÓN ppm	MUESTREO DE 10 ARTEMIAS POR TUBO DE ENSAYO LECTURA DE LARVAS MUERTAS, ACEITE ESENCIAL											
	6 HORAS				12 HORAS				24 HORAS			
EXPERIMENTOS	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X
37,5	9	8	8	8,33333	9	9	10	9,3333	10	10	10	10
17,5	4	5	5	4,66667	7	7	6	6,6667	9	9	9	9
7,5	3	3	3	3	5	5	5	5	6	7	6	6,3333
3,75	3	2	2	2,33333	4	5	4	4,3333	4	5	5	4,6667
1,75	2	2	2	2	3	4	4	3,6667	3	4	4	3,6667
1,25	2	1	1	1,33333	4	3	3	3,3333	4	3	3	3,3333
0,75	1	1	1	1	3	2	3	2,6667	3	2	3	2,6667
0,5	1	0	1	0,66667	3	2	2	2,3333	3	2	2	2,3333
0,25	0	0	1	0,33333	2	2	2	2	2	2	2	2
BLANCO ETANOL	0	0	1	9,66667	0	0	1	9,66667	0	1	1	9,6667

Tabla 29. Análisis del probit aceite esencial 6 horas

Análisis de Probit.			
Aceite esencial Tiempo de análisis 6 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-1,17456	0,197082	
Concentración	0,0633445	0,0143428	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	24,8701	1	0,0000
Residuo	2,27155	7	0,9433
CL50	18,5423		

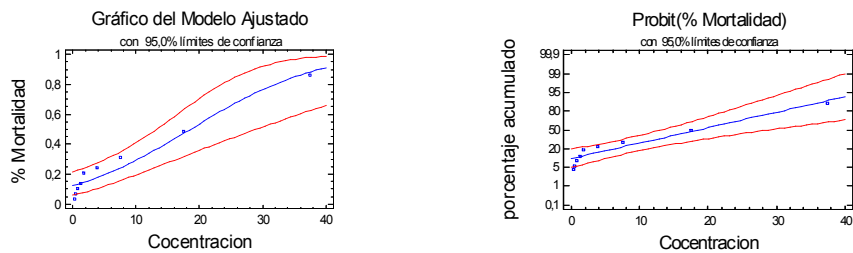


Figura 27. Aceite esencial, tiempo de análisis 6 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 6 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -1,17456 + 0,0633445 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 91,6307 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a 18,5423.

Tabla 30. Análisis del probit aceite esencial 12 horas

Análisis de Probit.			
Aceite esencial Tiempo de análisis 12 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-0,564101	0,171713	
Concentración	0,0649549	0,0179185	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	20,6635	1	0,0000
Residuo	1,09393	7	0,9932
CL50	8,6845		

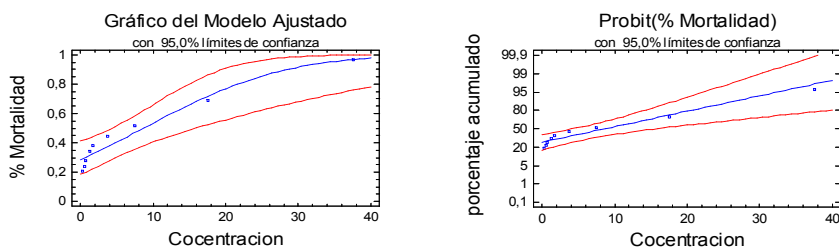


Figura 28. Aceite esencial, tiempo de análisis 12 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 12 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -0,564101 + 0,0649549 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 94,9721 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a 8,6845.

Tabla 31. Análisis de Probit aceite esencial 24 horas

Análisis de Probit.			
Aceite esencial Tiempo de análisis 24horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-0,648079	0,190943	
Concentración	0,130587	0,0369674	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	18,203	1	0,0000
Residuo	0,590631	6	0,9966
CL50	4,9628		

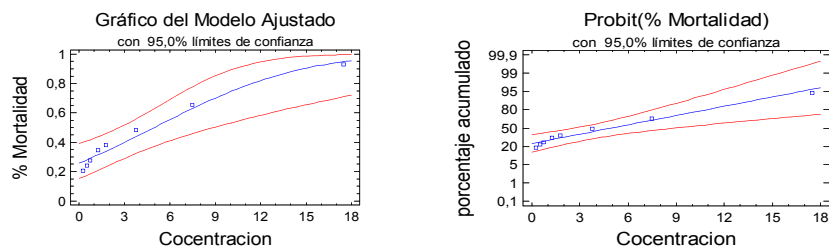


Figura 29. Aceite esencial, tiempo de análisis 24 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 24 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -0,696994 + 0,155692 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 95 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 94,0286 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a 4,9628

8.12.2. Dosis letal media (DL₅₀) del extracto etanólico:

Tabla 32. Lectura de larvas muertas extracto etanólico.

CONCENTRACIÓN ppm	MUESTREO DE 10 ARTEMIAS POR TUBO DE ENSAYO LECTURA DE LARVAS MUERTAS, EXTRACTO ETANÓLICO											
	24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS			
EXPERIMENTOS	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X
1000	7	7	8	7,333	10	9	10	9,667	10	10	10	10
750	6	6	5	5,667	7	7	8	7,667	8	9	8	8,333
500	5	3	3	3,667	5	5	5	5	6	6	6	6
250	2	2	3	2,333	3	3	3	3	4	4	3	3,667
100	1	1	1	1	2	2	1	1,667	3	2	2	2,333
50	1	1	0	0,667	1	2	1	1,333	2	2	2	2
25	1	1	0	0,667	1	1	1	1	2	2	1	1,667
10	1	0	0	0,333	1	1	0	0,667	3	2	2	2,333
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,667
BLANCO AGUA	0	0	0	1	0	0	1	9,667	0	1	1	9,667

Tabla 33. Análisis de probit extracto etanólico 24 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etanólico Tiempo de análisis 24 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-1,59364	0,257264	
Concentración	0,00241544	0,000474845	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	30,531	1	0,0000
Residuo	1,86417	7	0,9670
CL50	659,771.		

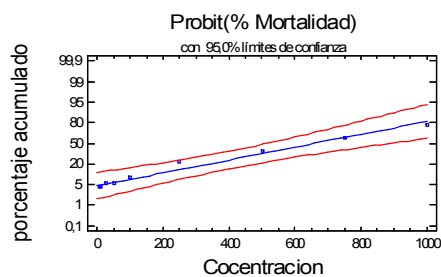
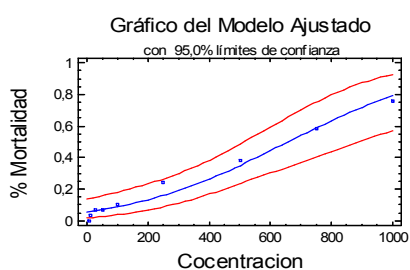


Figura 30. Extracto etanólico, tiempo análisis 24 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 24 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -1,59364 + 0,00241544 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 94,2455 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a 659,771.

Tabla 34. Análisis de probit extracto etanólico 48 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etanólico Tiempo de análisis 48 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-1,44227	0,239824	
Concentración	0,00318005	0,000554008	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	46,0423	1	0,0000
Residuo	3,2821	7	0,8577
CL50	453,537		

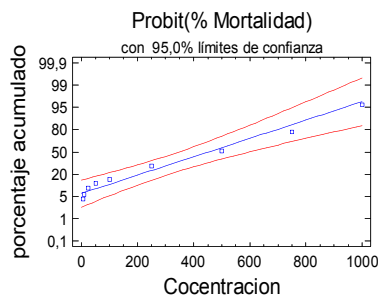
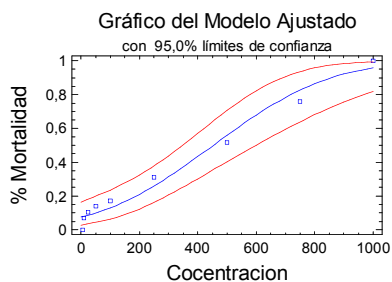


Figura 31. Extracto etanólico, tiempo de analisis 48 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 48 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -1,44227 + 0,00318005 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza.

Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 93,3459 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a **453,537**.

Tabla 35. Análisis de probit extracto etanólico 72 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etanólico Tiempo de análisis 72 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-1,00542	0,210843	
Concentración	0,00274041	0,000639517	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	21,2154	1	0,0000
Residuo	1,20174	6	0,9768
CL50	366,885		

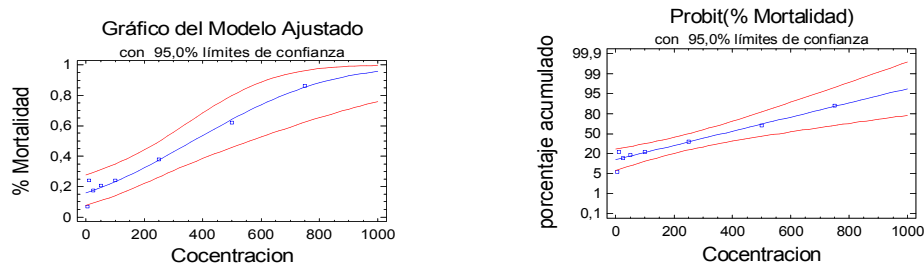


Figura 32. Extracto etanólico, tiempo de análisis 72 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 72 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -1,00542 + 0,00274041 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 94,6392 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a **366,885**.

8.12.3. Dosis letal media (DL₅₀) del extracto etéreo:

Inicialmente se utilizaron concentraciones de 1000 a 5 ppm, realizando las lecturas a las 24, 48 y 72 horas; sin embargo, a partir de 750 ppm la mortalidad fue

instantánea en 500 ppm los nauplios murieron a las 24 horas. Por ello, se determinó que debía cambiarse tanto el intervalo de tiempo de lectura como de las concentraciones de aceite esencial. Así, el análisis se hizo de la siguiente forma:

Tabla 36. Lectura de larvas muertas extracto etéreo

CONCENTRACIÓN ppm	MUESTREO DE 10 ARTEMIAS POR TUBO DE ENSAYO LECTURA DE LARVAS MUERTAS, EXTRACTO ETÉREO											
	6 HORAS				12 HORAS				24 HORAS			
EXPERIMENTOS	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X
250	8	8	8	8	9	10	10	9,667	10	10	10	10
175.	6	6	6	6	8	8	7	7,667	8	9	8	8,333
125	5	5	4	4,667	7	6	6	6,333	7	7	7	7
87,5	4	3	4	3,667	6	5	5	5,333	6	6	5	5,667
48,75	3	3	2	2,667	4	4	4	4	5	5	4	4,667
26,875	2	2	3	2,333	4	3	3	3,333	4	5	4	4,333
14,687	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
7,844	2	2	1	1,667	3	2	3	2,667	4	3	4	3,667
4,1719	1	0	1	0,667	2	1	2	1,667	2	2	2	2
BLANCO ETANOL	0	0	1	9,667	0	0	1	9,667	0	1	1	9,667

Tabla 37. Análisis de probit extracto etéreo 6 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etéreo Tiempo de análisis 6 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-1,04231	0,218313	
Concentración	0,00797553	0,00187738	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	20,2907	1	0,0000
Residuo	0,894556	7	0,9964
CL50	130,689		

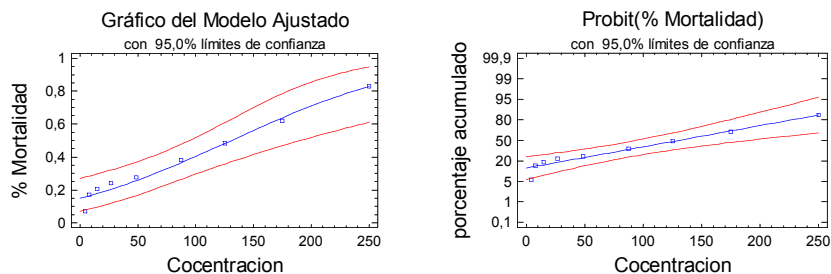


Figura 33. Extracto etéreo, tiempo de análisis 6 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 6 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -1,04231 + 0,00797553 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 95,7774 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a 130,689.

Tabla 38. Análisis de probit extracto etéreo 12 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etéreo Tiempo de análisis 12 horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-0,755901	0,209112	
Concentración	0,0101296	0,00223335	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	26,6658	1	0,0000
Residuo	1,45431	7	0,9838
CL50	74,6227		

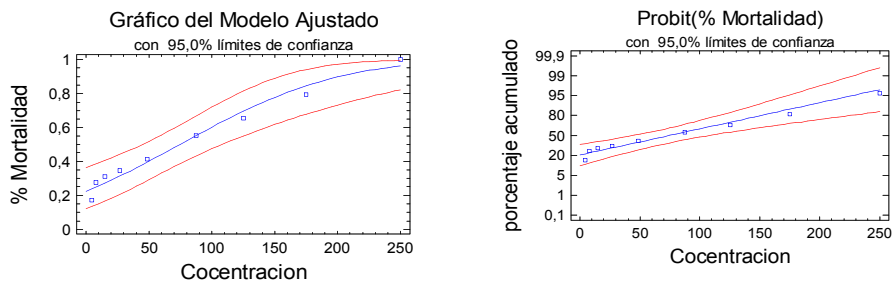


Figura 34. Extracto etéreo, tiempo de análisis 12 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 12 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -0,755901 + 0,0101296 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza.

Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 94,8282 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a **74,6227**.

Tabla 39. Análisis de probit extracto etéreo 24 horas

Análisis de Probit.			
Extracto Etéreo Tiempo de análisis 24horas.			
Modelo de regresión estimado (Máxima probabilidad)			
	Estimación	Estándar de error	
Constante	-0,488663	0,211143	
Concentración	0,00886242	0,00270432	
Análisis de desviación.			
	Desviación	G. L.	p- valor
Modelo	11,8147	1	0,0006
Residuo	1,02549	6	0,9846
CL50	55,1388		

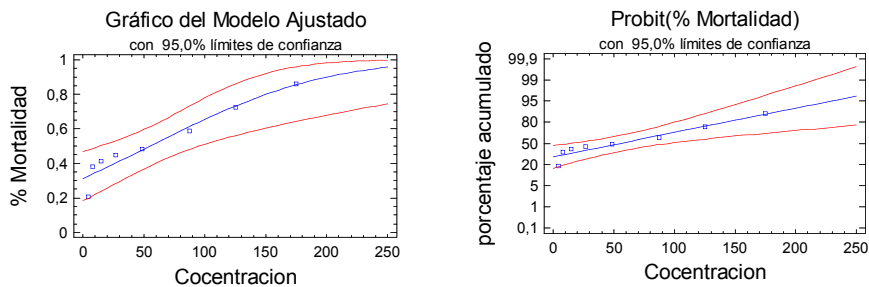


Figura 35. Extracto etéreo, tiempo de análisis 24 horas

La lectura del análisis en un tiempo de 24 horas, permite deducir un modelo de regresión Probit con relación entre % Mortalidad y la variable independiente. La ecuación ajustada al modelo es:

$$\% \text{ Mortalidad} = -0,488663 + 0,00886242 * \text{Concentración}$$

Dado que el p-valor para el modelo es inferior a 0.01, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables al 99 % de nivel de confianza. Además, el p-valor para los residuos es mayor o igual a 0.10, indicando que el modelo tiene un 90 % de confianza.

En igual forma, la desviación del % Mortalidad es igual a 92,0134 %. Este valor es similar al R-cuadrado. El valor percentil 50 (CL50) es igual a **55,1388**.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Se extrajo el aceite esencial de *Lippia origanoides* por dos métodos diferentes, Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHD) y Destilación por Arrastre con Vapor (DAV).
- ✓ La humedad de las hojas de *Lippia origanoides* fueron de 58.3341 y 66.2264 para las 6:00 a.m. y las 4:00 p.m. respectivamente, por lo cual, el mejor horario de corte es el de las 6:00 a.m. por su bajo contenido de agua.
- ✓ El quimiotipo de *Lippia origanoides* H.B.K. cultivado en el departamento del Quindío corresponde al del Timol como componente mayoritario, pues se encontró que el aceite esencial extraído contiene un 83.23 % de este.
- ✓ Se evidenció que el porcentaje de abundancia de Timol en el aceite esencial (89.982 %) para la planta cultivada en el departamento del Quindío fue mayor al reportado por la literatura (53.6 %).
- ✓ Para las extracciones de aceites esenciales de *L. origanoides*, al utilizar material vegetal en estado seco, los porcentajes de rendimiento se hacen dos veces mayores que al utilizarlo en estado fresco.
- ✓ La extracción de aceite esencial tiene un mayor rendimiento cuando se emplean hojas recolectadas en las horas de la mañana (6:00 a.m.).
- ✓ El método de extracción de aceites esenciales por MWHD ofrece grandes ventajas con respecto al método de destilación por arrastre con vapor convencional, puesto que el tiempo de extracción es menor, y con la misma

cantidad de material vegetal de partida se obtiene mayor cantidad de aceite esencial, lo cual a su vez hace que se reduzcan los costos de producción.

- ✓ Los extractos obtenidos de las hojas de la planta, en su fracción polar contiene flavonoides, quinonas, taninos, glicósidos cardiotónicos y alcaloides, y en su fracción apolar, esteroides, carotenoides y glicósidos cardiotónicos, sin que se presenten variaciones en la presencia de los metabolitos por la recolección del material vegetal en dos jornadas diferentes, a las 6:00a.m y a las 4:00p.m.
- ✓ El aceite esencial de *L. origanoides* presentó actividad contra *S. aureus*, *C. albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aeromona hidrófila*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterobacter cloacae*, pero no contra *Klebsiella pneumoniae*.
- ✓ Los extractos apolares obtenidos por el método de Soxhlet y los apolares y medianamente polares obtenidos por percolación poseen actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *C. albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Aeromona hidrófila*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.
- ✓ La actividad antimicrobiana, tanto de los extractos, como del aceite esencial es mayor en levaduras y bacterias Gram-positivas que en las bacterias Gram-negativas.
- ✓ Se logró aislar uno de los metabolitos presentes en el extracto etéreo, responsable de parte de la actividad antimicrobiana de este.
- ✓ Se encontró que la actividad antimicrobiana del extracto etéreo no se puede atribuir a un solo compuesto, sino a la acción de varios metabolitos junto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, A.M., Castañeda, M.L., Blanco, K., Cárdenas, C.Y., Reyes, J.A., Kouznetsov, V., Stashenko, E. Composición y Actividad Antioxidante de Especies Aromáticas y Medicinales con Alto Contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia et Technic.* 2007; XIII(33): 125-128.
2. Albesiano, S., Rangel-CH, J.O., Cadena, A. La Vegetación del Cañón del Río Chicamocha (Santander, Colombia). *Caldasia*,. 2003; 25: 73-99.
3. Albornóz, A. Medicina Tradicional Herbaria. Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Caracas. 1995.
4. Andrade, V. y Silva, J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* Productora de la β -lactamasa SHV-5, en Unidad de Cuidados Intensivos. *Grupo de Resistencia Bacteriana.* 2004; 46: 524-528.
5. Atif, M., Shahid, M., Ismail, T., y Hassan, M. Isolation and Purification of Membrane-Bound Cytochrome c from *Proteus mirabilis*. *African Journal of Biotechnology.* 2007; 6(9): 1132-1135.
6. Base de datos de aceites esenciales, <http://www.oleoessencial.com.br/>, página web consultada el 12 de abril de 2008.
7. Bases de datos de Plantas, <http://www.geocities.com/anvitel/links.htm#rec>
8. Bilbao R., M del R. Análisis Fitoquímico Preliminar. Armenia, Quindío: Universidad del Quindío. 1997.
9. Braga, M., Ehlert, P., Ming, L., Meireles, A. "Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition". *Journal of Supercritical Fluids.* 2005; (35): 749-156.
10. Castañeda, M.L., Muñoz, A., Martínez, J.R., Stashenko, E.E. Estudio de la Composición Química y la Actividad Biológica de los Aceites Esenciales de

Diez Plantas Aromáticas Colombianas. *Scientia et Technica*. 2007; XIII(33): 165-166.

11. Celis, C.N., Escobar, P., Isaza, J.H., Stashenko, E., Martínez, J.R. Estudio Comparativo de la Actividad Biológica de los Aceites Esenciales Extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, Especies de la Familia *Verbenaceae*. *Scientia et Technica*. 2007; XIII(33): 103-105.
12. Damian, P. & K. Aromaterapia: El Olor y la Psique. Inner Traditions. 2004/Bear & Company.
13. Dinan, L., Harmatha, J. y Lafont, R. Chromatographic Procedures for the Isolation of Plant Steroids. *Journal of Chromatography A*. 2001; (935): 105-123.
14. Domínguez, X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica. AID. México. 1978.
15. Gatica, C. y Gesche, E. "Método de las 5 Placas" para la Detección de Residuos de Antibacterianos en Leche. *Revista Científica*. Vol. XVII, N°3, 231-238. *Revista Científica*. 2007; XVII(3): 231-238.
16. Golmakani, M. y Rezaei, K. Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation with the Traditional Hydrodistillation Method in the Extraction of Essential Oils from *Thymus vulgaris* L. *Journal of Food Chemistry*. 2007; 12(84).
17. González, C.A., Viturro, C.I., Molina, A.C. Actividad Antimicrobiana Frente a Bacterias Gram-Negativas de Volátiles de Especies Aromáticas Adaptadas en Jujuy. Facultad de Ingeniería. UNJu. Gorriti 237. (4600) Jujuy. Argentina. 2005.
18. Golmakani, M-T., Rezei, K. Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation with the Traditional Hydrodistillation Method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Journal of Food Chemistry*. 2007; 12(84): 1-24.
19. González, R.T. La Transición Desde lo Etnobotánico Hacia Usos Comerciales de Plantas Colombianas. Fundacofan. 2001.

20. Guerrero, M., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M., Arteaga, L. y San Román, L. Assessment of the Antihypertensive and Vasodilator Effects of Ethanolic Extracts of Some Colombian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; (80): 37-42.
21. <http://www.unne.edu.ar>, página *web* consultada el 10 de abril de 2008.
22. Hussain, S.M., Gordon, L.P., Wende, R.D. y Williams, R.P. Meningitis Due to *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1976; 3(2): 102-104.
23. Laboratorio clínico, <http://www.labreferencia.com/content.aspx?id=965>
24. López, P.S. Verbenaceae. Flora de Venezuela. Consejo de Publicaciones. ULA-Mérida. 1997.
25. Maguna, F.P., Romero, A.M., Garro, O.A., Okulik, N.B. Actividad Antimicrobiana de un Grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. 2006; E(57).
26. Martínez, A. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 2003.
27. Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A. y Nava, R. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Mandarina. *Revista de Facultad de Ciencias Agrónomas*. 2003; (20): 502-512.
28. Méndez, R., Serrano, J., Chataing, B., Jiménez, D., Mora, D., Rojas, L., Usubillaga, A. & O'Callaghan, J. Estudio Comparativo de la Actividad Biológica del Aceite Esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March y el Aceite Esencial *Lippia origanoides* H.B.K. Sobre Tres Especies de *Nocardia* sp. *Instituto de Investigación, Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes*. 2007; 2(6): 49-52.
29. Microbiología e inmunología on-line, <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter6.htm>
30. Miller, J.N., Miller, J.C. Estadística Para Química Analítica. 1998.

31. Minami, K., "Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal-II: manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas". Piracicaba: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Produção Vegetal. 1999.
32. Nabón, A., Staphylococcus aureus Resistente a Betalactámicos en Infecciones Detectadas en la Comunidad. *Revista de Salud Militar*. 2006; 28(1): 26-33.
33. Nunes, A. "Artigo publicado no Informativo CRQ-V. 2007; XI,(105)."
34. Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. & Leitão, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Journal of food chemistry*. 2007; (101): 236-240.
35. Ortuño, M. F. Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. Aiyana ediciones. 2006.
36. Padilla, L. Manual de Laboratorio de Microbiología. Armenia, Quindío: Universidad del Quindío. 2006.
37. Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, D., y Villar A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; (76): 201-214.
38. Pesewu, G.A., Cutler, R.R. y Humber, D.P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; (116): 102-111.
39. Pino, V., Pando, J.M., Trinidad, G., Pardo, G. y Blasco, A. Otitis Externa Aguda por *Enterobacter cloacae*. 2003; 30(4): 226-228.
40. Plantas medicinais, <http://ci-67.ciagri.usp.br/pm/>, página web consultada el 23 de marzo de 2008.
41. Proença da Cunha, A., Alves R, J. y Rodrigues R, A. Capítulo do livro "Plantas Aromáticas em Portugal - Caracterização e Utilizações" Ed. Fundação Calouste Gulbenkian - Lisboa. 2007.
42. Ricciardi, G. y A. Efecto de las Variaciones Estacionales sobre la Composición Química del Aceite Esencial de Plantas de "*Salvia morada*" de

Sáenz Peña (Chaco). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. *Exactas*. 2001. Consultado abril 1 de 2008, en www.unne.edu.ar

43. Ramanadhan, B. Microwave Extraction of Essential Oils (From Black Pepper and Coriander) at 2.46 GHz. *Tesis para obtener el título de Master de Ciencia*. 2005.
44. Rivero, M.A., Padola, N.L., Etcheverria, A.I. y Parma, A.E. *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *Journal of Medicina*. 2004; 64: 352-356.
45. Rojas, R. Preservación de la Guadua. *Universidad San Buenaventura-Cali*. 2003.
46. Roldán, J., Ruiz, J. y Luque de Castro, M. Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Journal of Talanta*. 2008; XXX.
47. Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J., Stashenko, E. Estudio Comparativo por GC-MS de Metabolitos Secundarios Volátiles de dos Quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. Obtenidos por Diferentes Técnicas de Extracción. *Scientia et Technica*. 2007; XIII(33): 325-328.
48. Sánchez, F.J. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2006.
49. Santos, F.J., Lopes, J.A., Cito, A.M., de Oliveira, E.H. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*. 2004.
50. Sarker, S., Nahar, L. y Kumarasamy, Y. Microtitre Plate-based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and its Application in the *in vitro* Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Journal of Methods*. 2007; (42): 321-324.
51. Esnard, S.C., Moya, A., Cedré, B., Valmaseda, T., Pino, Y. y Sierra, G., *Pseudomonas aeruginosa*. Vacunas: Un Reto a la Investigación. *Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros*. 2004; 13(1): 1-13.

52. Stashenko, E., Jaramillo, B. y Martínez, J. Comparación de la Composición Química y de la Actividad Antioxidante *in vitro* de los Metabolitos Secundarios Volátiles de Plantas de la Familia Verbenaceae. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*. 2003; 27(105): 579-597.
53. Trombetta, D., Castelli, F., Sarprieto, M.G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. y Bisignano, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(6): 2474-2478.
54. Zuluaga, F., Obando, B., y Yates, B. Análisis Orgánico Clásico y Espectral. Santiago de Cali. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. 2000.