

Urkund Analysis Result

Analysed Document: minthostachys mollis tesis.docx (D16289432)
Submitted: 2015-11-19 21:44:00
Submitted By: mcampo@utmachala.edu.ec
Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA "Calidad, Pertinencia y Calidez" UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ESTUDIO FITOQUÍMICO

PRELIMINAR DEL

FOLLAJE DE *Minthostachys mollis* Griseb CULTIVADA EN QUITO

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO

A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES: Ambuludí Fárez Daysi Lorena 0705814663 Cepeda Roblez Nelly Cecilia 2100354378

TUTOR: Lic. Mercedes Campo Fernández, PhD. COTUTOR: Bioq. Farm. Diana Sanmartín Galván

MACHALA-OCTUBRE 2015

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA "Calidad, Pertinencia y Calidez" UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ESTUDIO FITOQUÍMICO

PRELIMINAR DEL

FOLLAJE DE *Minthostachys mollis* Griseb CULTIVADA EN QUITO

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES: Ambuludí Fárez Daysi Lorena 0705814663 Cepeda Roblez Nelly Cecilia 2100354378

TUTOR: Lic. Mercedes Campo Fernández, PhD. COTUTOR: Bioq. Farm. Diana Sanmartín Galván

MACHALA-OCTUBRE 2015 ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL FOLLAJE DE

Minthostachys mollis Griseb CULTIVADA EN QUITO AUTORES Daysi Lorena Ambuludí Fárez C.I.: 0705814663 daisyambuludi@gmail.com Daysi Lorena Ambuludí Fárez C.I.: 0705814663

daisyambuludi@gmail.com Nelly Cecilia Cepeda Roblez C.I.: 2100354378 nellycep@hotmail.com

Nelly Cecilia Cepeda Roblez C.I.: 2100354378 nellycep@hotmail.com TUTOR Lic. Mercedes

Campo Fernández, PhD C.I.: 0959164625 mcampo@utmachala.edu.ec Lic. Mercedes Campo

Fernández, PhD C.I.: 0959164625 mcampo@utmachala.edu.ec COTUTOR Bioq. Farm. Diana

Sanmartín Galván C.I.: 0705201200 dsanmartin_est@utmachala.edu.ec Bioq. Farm. Diana

Sanmartín Galván C.I.: 0705201200 dsanmartin_est@utmachala.edu.ec MACHALA- OCTUBRE

2015

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios, quien supo guiarnos y llenarnos de fortaleza a lo largo de nuestra carrera, en los momentos difíciles que se presentaban, y no desmayar para poder cumplir nuestro objetivo tan anhelado como es culminar nuestros estudios universitarios. A nuestras familias, quienes estuvieron brindándonos su apoyo incondicional y comprensión, durante todos estos años, quienes nos hicieron una personas fuerte, luchadora, ante los obstáculos de la vida y salir adelante para cumplir nuestras metas idealizadas.

A nuestra tutora y cotutora, quienes supieron guiarnos de la manera correcta en este trabajo, por sus conocimientos impartidos, para finalmente obtener un trabajo de calidad gracias al apoyo que nos supieron brindar.

Daysi & Nelly

AGRADECIMIENTO Agradecemos a Dios por ser nuestro soporte y fortaleza para salir airosos de las situaciones que se nos presentaron, guiando de manera correcta nuestros caminos para cumplir nuestra meta anhelada. A nuestros padres por darnos todo su apoyo, y palabras de aliento cuando más lo necesitábamos, formándonos como personas de bien para el diario vivir. A nuestros familiares y amigos que con su comprensión, paciencia y ánimo han hecho posible esta meta alcanzada. Un especial agradecimiento a nuestra tutora que gracias a sus saberes y conocimientos, que nos supo impartir fueron aplicados en nuestro trabajo de investigación. Nuestro más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda formaron parte del presente trabajo. Daysi & Nelly ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL FOLLAJE DE *Minthostachys mollis* Griseb CULTIVADA EN QUITO AUTORES: Daysi Ambuludí Fárez; Nelly Cepeda Roblez TUTORES: Lic. Mercedes Campo Fernández, PhD; Bioq. Farm. Diana Sanmartín Galván RESUMEN El trabajo experimental con la especie vegetal *Minthostachys mollis* Griseb, cosechada en la ciudad de Quito, fue desarrollada con dos materias primas: follaje; hojas y flores. Luego de realizar un tamizaje fitoquímico en extractos de diferente polaridad, se sugirió la presencia de aceites y grasas, triterpenos – esteroides, compuestos fenólicos, azúcares reductores, saponinas, aminoácidos y flavonoides. Se obtuvo el aceite esencial por el método de hidrodestilación con un rendimiento de 0,41 % para hojas y flores y de 0,21 % para el follaje. El análisis por CCD de ambos aceites sugirió la existencia de metabolitos con grupos cromóforos conjugados y compuestos fenólicos. El estudio por CG-EM permitió la identificación de metabolitos, fundamentalmente, del tipo hidrocarburos monoterpénicos, resultando los componentes mayoritarios en hojas y flores el neomentol (32,34%), pulegona (28, 42%) y mentona (19,32%); mientras que en el follaje predominan el geraniol (24,93%) y el citronelol (14, 84%). Paralelamente se elaboraron, por maceración, extractos etanólicos de ambas materias primas, los que se estandarizaron mediante algunos parámetros físico-químicos como pH; índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales y CCD. Este último estudio sugirió la presencia de compuestos con grupos cromóforos conjugados y estructuras fenólicas. La caracterización mediante CG-EM de los extractos despigmentados demostró la presencia de azúcares, aminoácidos (valina, alanina, leucina, isoleucina, serina, treonina, prolina, fenilalanina), compuestos fenólicos (ácido caféico, isómeros del ácido caféico, lactato de catequilo) y un triterpeno, siendo este último el compuesto mayoritario. Al analizar dichos extractos por espectrometría de masas por infusión directa se logró identificar la presencia de rutina. Se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu demostrándose la existencia de compuestos fenólicos o de metabolitos con capacidad reductora en general. La actividad antimicrobiana

tanto de los aceites y de los extractos frente a *Staphylococcus aureus*, presentó un halo de inhibición mayor a 21mm, lo cual fundamenta

la presencia de sensibilidad.

Palabras claves: *Minthostachys mollis*, aceites esenciales, hidrodestilación, CG-EM, *Staphylococcus aureus*

PRELIMINARY STUDY OF FOLIAGE PHYTOCHEMICAL *Minthostachys mollis* Griseb GROWN IN THE CITY OF QUITO AUTHORS: Daysi Ambuludí Fárez; Nelly Cepeda Roblez TUTORS: Lic. Mercedes Campo Fernández, PhD; Bioq. Farm. Diana Sanmartín Galván SUMMARY Experimental work with the plant species "*Minthostachys Griseb mollis*", they were harvested in Quito and developed with two raw materials: foliage; leaves and flowers. Steroids, phenolics, reducing sugars, saponins, flavonoids and amino acids - After performing a phytochemical screening extracts of different polarity, the presence of oils and triterpenes fats. The essential oil was obtained by the method of hydrodistillation with a yield of 0.41% for leaves and flowers and foliage to 0.21%. TLC analysis of both oils suggested the existence of conjugated metabolites chromophore groups and phenolic compounds. The study by GC-MS allowed the identification of metabolites, mainly the type monoterpene hydrocarbons, resulting the major components in the leaves and flowers neomenthol

(32.34%), pulegone (28, 42%) and menthone (19.32%); while the foliage geraniol (24.93%) and citronellol (14, 84%) predominate. These components were developed, by maceration, ethanol extracts of both commodities, which were standardized by some physico-chemical parameters such as pH; refractive index, specific gravity, total solids and CCD. The latter study suggested the presence of compounds with conjugated chromophore groups and phenolic structures.

Characterization by GC-MS of depigmented extracts showed the presence of sugars, amino acids (valine, alanine, leucine, isoleucine, serine, threonine, proline, phenylalanine), phenolic compounds (caffeic acid, caffeic acid isomers, lactate catequilo) and a triterpene, this last component is the major component. When the analysis was made for the extracts by mass spectrometry by direct infusion was identified the presence of routine. The Folin-Ciocalteu assay was performed demonstrating the existence of phenolic compounds or metabolites with reducing ability in general.

The antimicrobial activity of both oils and extracts against *Staphylococcus aureus* , presented a halo of inhibition greater than 21mm , which substantiates the presence of sensitivity. .

Keywords: *Minthostachys mollis*, essential oil, hydrodistillation, CG-EM, *Staphylococcus aureus*

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| FROTIPICIO..... | I |
| Dedicatoria..... | II |
| Agradecimiento..... | III |
| Resumen..... | IV |
| Abstract..... | V |
| INTRODUCCIÓN 1 CAPÍTULO I 3 1. PLANTAS AROMÁTICAS 3 2. <i>Minthostachys mollis</i> Griseb 3 | |
| 2.1 Género <i>Minthostachys</i> 3 2.2. Descripción botánica de la especie <i>Minthostachys mollis</i> Griseb 4 | |
| 2.3. Composición química 4 2.4. Aplicaciones terapéuticas 6 3. ACEITES ESENCIALES 7 3.1. | |
| Características de los aceites esenciales 7 3.2. Métodos de obtención de aceites esenciales 7 3.3. | |
| Componentes de los aceites esenciales 8 3.4. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría | |
| de masas como método de análisis 8 3.5 Aplicaciones de los aceites esenciales 9 3.6. Método de | |
| Folin-Ciocalteu 9 4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 10 4.1. Difusión en agar 10 CAPÍTULO II 11 1. | |
| SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL 11 2. TRATAMIENTO POSCOSECHA DEL MATERIAL | |
| VEGETAL 11 3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO 11 4.1. Determinación del rendimiento 13 5. | |
| ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS 13 5.1. Determinación de los parámetros de calidad del | |
| extracto 13 5.5. Contenido de sólidos totales 14 6. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 15 6.1. | |
| Cromatografía en capa delgada (CCD) 15 6.2 Análisis del aceite esencial por cromatografía | |
| gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 16 6.3. Análisis de los extractos etanólicos | |
| por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 16 6.4. Espectrometría | |
| de masas por infusión directa 17 7. MÉTODO DE FOLIN- CIOCALTEU 18 7.1 Preparación de los | |
| reactivos 18 7.2 Curva de calibración 18 7.3 Procedimiento 18 8. ESTUDIO ANTIBACTERIANO 18 | |
| 8.1 Revivificación de bacterias 18 8.3 Inoculación en placa 19 8.4 Aplicación de actividad | |
| antimicrobiana 19 8.5 Lectura del ensayo de actividad antimicrobiana 19 CAPÍTULO III 20 1. | |
| TRATAMIENTO POSCOSECHA DEL MATERIAL VEGETAL 20 2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO 20 3. | |
| OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL 22 4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS | |
| EXTRACTOS ALCOHÓLICOS 23 5.2 Análisis del aceite esencial por cromatografía gaseosa | |
| acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 28 5.3 Análisis de los extractos etanólicos por | |
| cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) 33 7. DETERMINACIÓN | |
| FENOLES TOTALES POR FOLIN-CIOCALTEU 41 8. DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA | |
| ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS 42 | |
| CONCLUSIONES RECOMENDACIONES BIBLIOGRAFÍA..... | |
| ANEXOS..... | |
| ÍNDICE DE FIGURAS Figura | |

Título Pág.

Figura 1. Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico 12
 Figura 2 Esquema de las reacciones realizadas en el extracto etéreo 12
 Figura 3 Esquema de las reacciones realizadas en el extracto etanólico 12
 Figura 4 Esquema de las reacciones realizadas en el extracto acuoso 13
 Figura 5

Equipo de hidrodestilación empleado para la extracción del aceite esencial de *Minthostachys mollis* 23
 Figura 6 Perfil cromatográfico en placa delgada de los aceites esenciales (h y f: hojas y flores; Foll: Follaje) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM hexano: acetato de etilo (7:3).

25
 Figura 7 Perfil cromatográfico en placa delgada de los aceites esenciales (h y f: hojas y flores; Foll: Follaje) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM cloroformo: metanol (9:1). 26
 Figura 8 Perfil cromatográfico en placa delgada de los extracto etanólico (h y f: hojas y flores; foll: follaje; foll sin clor: follaje sin clorofila) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM hexano: acetato de etilo (7:3). 27
 Figura 9 Perfil cromatográfico en placa delgada de los extractos etanólicos (h y f: hojas y flores; foll: follaje; foll sin clor: follaje sin clorofila) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM cloroformo: metanol (9:1). 28
 Figura 10 Cromatogramas gaseoso de los aceites esenciales de *M. mollis*. A: Aceite esencial de las hojas y flores; B: aceite esencial del follaje. 29
 Figura 11 Algunas de las estructuras químicas identificadas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo), según el análisis por CG-EM. 31
 Figura 12 Cromatogramas gaseosos de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. A: extracto despigmentado de las hojas y flores; B: extracto despigmentado del follaje. 33-34
 Figura 13 Aminoácidos identificados en los extractos etanólicos de *M. mollis*. 36
 Figura 14 Compuestos fenólicos identificados en los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. 37
 Figura 15 Espectro de masas por electronebulización en modo negativo del extracto etanólico 38
 Figura 16 Espectro de masas EM2 en modo negativo del extracto etanólico. 38
 Figura 17 Iones fragmentos (EM2) correspondiente a la rutina. Imagen tomada y modificada (73). 39
 Figura 18 Espectro de masas EM3 en modo negativo del extracto etanólico. 39
 Figura 19 Espectro de masas EM4 en modo negativo del extracto etanólico 40

Figura 20

Fragmentación sugerida para el residuo de quercetina [M-H]⁻, m/z 301. 40

Figura 21 Curva de calibración obtenida en el estudio de la capacidad antioxidante por el método de Folin Ciocalteu. 41

Figura 22 Halos de inhibición de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* tanto de hojas y flores (grupo A); follaje (grupo B) frente a *S. aureus*. 42
 Figura 23 Halos de inhibición de extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* tanto de hojas y flores (GRUPO C); follaje (GRUPO D) frente a *S. aureus*. 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Título Página
 Cuadro 1 Descripción taxonómica e imagen de la especie *Minthostachys mollis* Griseb 3
 Cuadro 2 Compuestos químicos identificados en el aceite esencial de la especie *Minthostachys mollis* Griseb. 5
 Cuadro 3 Descripción de la aplicación de las muestras en las placas Petris. 19
 Cuadro 4 Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos etéreos 21
 Cuadro 5 Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos etanólicos 21
 Cuadro 6 Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos acuosos. 22
 Cuadro 7 Características físico-químicas de los extractos etanólicos obtenidos. 24
 Cuadro 8 Composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo), según el análisis por CG-EM. 30
 Cuadro 9 Composición química del aceite esencial de la *Minthostachys mollis* Griseb referida en otras investigaciones. 32
 Cuadro 10 Composición química de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (tipo), según el análisis por CG-EM. 34-35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo Título Anexo 1 Lista de especies y subespecies aceptados en *Minthostachys* en la reciente revisión taxonómica (5), con la sinonimia y su distribución. Anexo 2 Certificado de la identificación de la especie vegetal a estudio, por el Herbario de la Universidad Central de Quito Anexo 3 Despigmentación del extracto por micro columna, previo al análisis por espectrometría de masas por infusión directa Anexo 4 Análisis de regresión lineal para la curva de calibración del método Folin Ciocalteu Anexo 5 Resultados de los halos de inhibición de los aceites de hojas y flores; follaje y los controles positivo y negativo. Anexo 6 Resultados de los halos de inhibición de los extractos de hojas y flores; follaje y los controles positivo y negativo.

INTRODUCCIÓN XE "INTRODUCCIÓN" La fitoterapia se ha empleado desde hace mucho tiempo, las plantas medicinales se comportan como verdaderos medicamentos, debido a las sustancias químicas que las componen pueden tener actividad biológica en humanos (1).

Desde la antigüedad el hombre ha estado en contacto directo con la naturaleza utilizando las plantas medicinales como principal alternativa para las diversas enfermedades, considerando que dentro de sus metabolitos secundarios contienen una gama de principios activos que ejercen una acción terapéutica en diferentes patologías, esto le ha permitido acumular un rico acervo de conocimientos de las especies que son utilizadas. Así mismo, en aquellos contextos culturales, donde la población de escasos recursos económicos, tiene dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, también se recurre a la medicina tradicional (2,3,4,5,6,7,8).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas para sus necesidades de atención primaria de salud (9,10).

Existe gran variedad de plantas que no han sido investigadas de manera científica pero han sido utilizadas por la población de manera ancestral, mediante decocción, infusión, maceración, etc, para tratar diversas enfermedades. Con el objetivo de validar estas preparaciones empíricas, se realizan investigaciones científicas de las plantas, para determinar e identificar la composición química que presentan las diferentes especies vegetales. Igualmente los análisis fitoquímicos, por muchos años también han demostrado ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes (11).

Minthostachys mollis Griseb es una especie nativa de los páramos del Ecuador, y de igual manera se puede encontrar en los mercados donde se expenden las plantas medicinales. Es un arbusto aromático, que crece silvestre en América Latina y caracteriza por su composición en aceite esencial. Las hojas, se preparan como infusión y se utilizan tradicionalmente como digestivo, carminativo y antiespasmódico. Las decocciones de las hojas se emplean contra dolores musculares y para el reumatismo. Además, las hojas y ramas son ampliamente utilizadas como condimento (12).

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb se caracteriza por un alto porcentaje de monoterpenos oxigenados. En la especie vegetal cosechada en la ciudad de Loja, se identificaron como metabolitos mayoritarios del aceite esencial: mentona (16%), carvacrilo de etilo (10%), pulegona (10%) y carvacrol (9%) (13). Todos ellos han sido previamente reportados como componentes característicos de diferente quimiotipos de *M. mollis* de Argentina (14).

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica ya que tienen actividad terapéutica (15).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de múltiples componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (15).

En el Ecuador existen aún muchas especies de uso medicinal tradicional que carecen de investigación, por lo que las tendencias actuales promueven estudios fitoquímicos de las mismas para validar su calidad, seguridad y eficacia. Tomando en consideración que no existen estudios químicos de la especie *M. mollis* procedente de Quito, el presente trabajo se planteó como:

Problema científico La necesidad de realizar un estudio farmacognóstico preliminar del follaje de la especie *Minthostachys mollis* Griseb cultivada Provincia de Pichincha.

Hipótesis

Existen diferencias en la composición química y posible actividad biológica de los aceites esenciales y extractos etanólicos del follaje de la especie *Minthostachys mollis* Griseb que se cultiva en la ciudad de Quito,

con lo referido en la literatura consultada para dicha especie, procedente de otras regiones geográficas.

Objetivo general:

Realizar un estudio fitoquímico preliminar del follaje de la especie *Minthostachys mollis* Griseb cultivada en Quito. **Objetivos específicos:**

1. Realizar la recolección y procesamiento de la droga vegetal (hojas y flores; follaje).
2. Realizar la evaluación química preliminar mediante tamizaje fitoquímico.
3. Extraer por hidrodestilación el aceite esencial de las hojas y flores; así como del follaje fresco de *Minthostachys mollis* Griseb.
4. Elaborar extractos etanólicos por maceración de las drogas crudas.
5. Analizar la composición química por cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), espectrometría UV y espectrometría de masas por infusión directa de los aceites esenciales y de los extractos obtenidos.
6. Valorar la actividad antimicrobiana in-vitro del aceite y extracto, frente a la cepa *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. PLANTAS AROMÁTICAS

Son aquellas plantas cuyos metabolitos están constituidos, total o parcialmente, por esencias; estas representan alrededor de un 0.66% del total de las

plantas medicinales (16).

Pueden generar por algún proceso físico-químico un producto aromático, entendiéndose por productos aromáticos aquellos

que tienen un olor o un sabor determinado, sin evaluar su calidad comercial o estética (17).

Es importante destacar dentro de esta vegetación, la presencia de numerosas plantas aromáticas, endémicas o introducidas, que se han adaptado a nuestra geografía y clima. Algunas de ellas se utilizan como fuente de aceites esenciales, pero, sin embargo, existen otras aún no explotadas,

cuyos extractos o aceites podrían sustituir importaciones o generar nuevos renglones exportables (18).

Dentro de esta flora existen, aproximadamente, 60 familias botánicas que agrupan a plantas aromáticas, siendo las más aplicadas para fines terapéuticos y experimentales las siguientes:

Compuestas, Labiadas, Umbelíferas, Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas (18).

2.

Minthostachys mollis Griseb

La descripción taxonómica y la imagen del follaje de la especie, se muestra en la Cuadro 1. Cuadro 1. Descripción taxonómica e imagen de la especie *Minthostachys mollis* Griseb (19).

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Lamiales Bromhead
- Familia: Lamiaceae
- Género: *Minthostachys*
- Especies: *Minthostachys mollis*
- Nombre: *Minthostachys mollis* (Kuth) Griseb.

La especie pertenece a la familia de las Lamiaceae. En esta familia se encuentra alrededor de 200 géneros con algo más de 3000 especies ampliamente distribuidas en regiones cálidas y templadas de ambos hemisferios, por lo general en lugares abiertos, raras en la región ártica y en las altas montañas (20). 2.1 Género *Minthostachys*

Las plantas del género *Minthostachys* se caracterizan por ser arbustos aromáticos propios de los páramos andinos de América del Sur. Este género resulta algo complicado desde el punto de vista taxonómico, mostrando una alta variabilidad morfológica. El tratamiento taxonómico más comprensible reconoce la presencia de 12 especies (21). (Anexo 1) Tomando como base los estudios realizados por Epling trabajos de campo y de alrededor de 1000 ejemplares de herbarios; se reconocen en la actualidad 17 especies en este género, siendo la *Minthostachys mollis* (22). El género se caracteriza por producción de aceites esenciales de interés farmacéutico y comercial (22).

2.2. Descripción botánica de la especie *Minthostachys mollis* Griseb

En Ecuador se le conoce como "tipo", "tipillo", "poleo", o "muña" y se puede encontrar en los páramos andinos de la región sierra (23,24). *Minthostachys mollis* es un arbusto aromático, de crecimiento silvestre en América Latina, siendo nativo del norte de los Andes, con un amplio rango de altitudes en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (13).

Es una planta subarborescente, perenne, aromática, de hasta 2 m de altura. Presenta hojas opuestas, con pecíolos de 0,5-1 cm de largo y láminas de 1-5 por 1-3 cm, ovaladas, agudas, con bordes enteros o irregularmente aserrados en la mitad superior. Flores blancas numerosas por verticilastro,

pediceladas, dispuestas en cimas pedunculadas axilares, con brácteas foliosas.(25)Cáliz levemente cigomorfo con 5 dientes agudos, cara externa vellosa con numerosas glándulas esféricas y cara interna con carpostegio. Corola blanco-amarillenta, de 3-3,5 mm de largo, levemente cigomorfa, pubescente en la cara interior y en el dorso de los labios. Androceo incluso y gineceo con estilo exerto y dos ramas estigmáticas desiguales, la inferior mayor que la superior. Fruto formado por 4 clusas elipsoides, pardas, finamente reticuladas. Especie típica del norte y centro de Argentina, frecuente en zonas protegidas como quebradas y valles de las sierras de Córdoba (26,27).

2.3. Composición química

La especie *Minthostachys mollis* de acuerdo a varios estudios realizados en los aceites esenciales de diferentes partes de la planta, presenta la siguiente composición (Cuadro 2)

Cuadro 2: Compuestos químicos identificados en el aceite esencial de la especie *Minthostachys mollis* Griseb. Partes de la planta

(Origen geográfico) Composición química Referencia bibliográficas Follaje (Argentina) (-) limoneno (-) mentona cariofileno D-mentona isomentona pulegona β -pineno (28,29) Follaje (Colombia-Cartagena) pulegona mentona trans- β cariofileno biciclogermacreno germacreno (30) Follaje (Venezuela) limoneno linalol trans-mentona cis-mentona trans-isopulegona pulegona piperitona piperitenona β -cariofileno α -humuleno D-germacreno biciclogermacreno óxido de cariofileno (31) Hojas (Perú, Lima) pulegona mentona limoneno mirceno mentol (32) Hojas (Ecuador, Zaruma) (E)-hidrato sabineno (E)-ocimeno (Z)-2 hexanol (Z)-3-hexanol (Z)-ocimeno 1,8- cineol 3-careno 3-octanol 3-octanona 4-terpenol acetato de bornilo acetato de carvacrylo acetato de geranilo acetato de timol alo-aromadendreno biciclogermacreno borneol canfeno carvacrol eugenol farnesol isocariofileno isomentona isopulegona menthona mirceno neomentol neral nerol oxido de cariofileno oxido de isocariofileno p-cimeno piperitona pulegona sabineno spatulenol terpinoleno timol α -cadinol α -copaeno α -curcumeno α -felandreno α -humuleno α -pineno α -terpeneno α -tujeno β -buorboneno β -cariofileno β -pineno γ -muuroleno (13)

Cuadro 2 cont.: Compuestos químicos identificados en el aceite esencial de la especie *Minthostachys mollis* Griseb. Partes de la planta

(Origen geográfico) Composición química Referencia bibliográficas

isovalerianal limoneno linalol γ -terpineno δ -cardineno Follaje (EE-UU Indiana) α -pineno Sarbinene Limoneno (E)- β ocimeno Acetato de isomentilo Neomentol Mentol Pulegona Piperitona β – pineno Mirceno (Z)- β –ocimene Mentona Acetato neomentilo Acetato de mentilo β -cariofileno Isomentol α -humuleno (33) Como se puede apreciar la composición química referida para el aceite esencial de la especie es de monoterpenos y sesquiterpenos, tanto oxigenados como del tipo hidrocarburos (13).

2.4. Aplicaciones terapéuticas

2.4.1. Uso tradicional La especie *Minthostachys mollis* ha sido empleada como un antihelmíntico, digestivo, afrodisíaco, antidiarreica, así como en el tratamiento de infecciones respiratorias, urinarias (34) y como inductor de la menstruación (22). Además se utilizan como condimento en las comidas y el té medicinal se emplea; para resfriados, dolor de estómago, y como pectoral. Las hojas se fuman para aliviar el asma y para el dolor de cabeza (35). En los páramos de Venezuela se lo utiliza para tratar enfermedades infantiles infecciosas, así como en el reumatismo (36). Se emplea como saborizante y aromatizante en la elaboración de licores y bebidas amargas (37).

2.4.2. Estudios biológicos

El aceite esencial de “muña” presentó efectos antimicóticos frente a cepas de *Cándida albicans* y frente a los dermatofitos: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans* (32).

Estudio del aceite esencial contra *Cándida albicans* mostró poseer mayor efecto antimicótico que el Fluconazol (38).

El aceite de *Minthostachys mollis* mostró la repelencia contra el *Aedes aegypti*. Se detectaron variaciones dependiendo de la procedencia geográfica de la planta, limoneno y el alcanfor fueron los principales componentes responsables de los efectos repelentes (39).

Minthostachys mollis mostro mayor eficacia antimicrobiana ante bacterias Gram positivas *L. innocua*, *S. aureus* y también era susceptible ante bacterias Gram-negativas como *E. coli* (29). El aceite esencial de *Minthostachys mollis* de Venezuela ejercido una alta actividad antimicrobiana contra varios microorganismos, siendo más eficaz contra *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (31). 3. ACEITES ESENCIALES Los aceites esenciales son productos generalmente de composición química compleja, los cuales constituyen los principios volátiles contenidos en las plantas. Aunque un amplio número de aceites esenciales son consumidos por sus virtudes medicinales, muchos son usados, debido a sus características organolépticas, en la preparación de alimentos. Se emplean para dar sabor, aroma y condimentar alimentos (40,15). Los aceites esenciales existen sólo en plantas superiores. Los géneros capaces de elaborar los compuestos que los constituyen están distribuidos en unas cincuenta familias, algunas de las cuales son Lamiales, Asterales y Rutales, pero también Laurales o Magnoliales (40,41).

Se acumulan en todos los tipos de órganos vegetales, en las flores, las hojas y menos común en las cortezas, en el leño, en las raíces, en el rizoma, en frutas y semillas. Todos los órganos de una especie dada pueden contener un aceite esencial, pero la composición de este aceite puede variar con la localización.(40,41)

Cuantitativamente, los niveles de aceite esencial en las plantas son bastante bajos, frecuentemente menos del 1 % (40,15).

3.1. Características de los aceites esenciales

Los aceites esenciales generalmente son líquidos a temperatura ambiente, volátiles, lo que los diferencia de los llamados aceites fijos. Muy raramente son coloreados, son incoloros en forma pura, aunque se colorean al exponerlos al aire (por oxidación), por la presencia de fenoles y de insaturaciones. Su densidad, generalmente, es menor que la del agua. Tienen un alto índice de refracción y la mayoría rota el plano de la luz polarizada (42,43). Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos comunes. Pueden ser destilados a vapor y son escasamente solubles en agua, sin embargo, son lo suficientemente solubles en agua para impartirle a esta una fragancia distintiva (42,43).

3.2. Métodos de obtención de aceites esenciales

Dentro de los métodos de extracción para los aceites esenciales se citan los siguientes:

a. Expresión: La expresión al igual que el resto de los métodos mecánicos son empleados para la obtención de los aceites esenciales de las cortezas de los cítricos.(44,45)

b. Extracción por medio de disolventes volátiles: Este método de extracción se emplea si el aceite esencial se descompone por calor. Generalmente se extrae con disolventes orgánicos (éter de petróleo, éter etílico o etanol), a temperatura no mayor de 50°C, eliminándose posteriormente el disolvente por destilación a presión reducida. El método de absorción en grasas purificadas: Este es un método muy empleado para obtener los aceites esenciales de los pétalos de las flores. (44,45)

c. Destilación: La destilación es el método más empleado, describiéndose tres variantes: con agua, agua y vapor, y vapor de agua. La destilación con vapor es el más utilizado y se realiza pasando

una corriente de vapor de agua a través del material a extraer, el cual condensa en un extremo. Luego de mantener en reposo aparecen 2 capas (aceite y agua). En este método se puede utilizar material fresco o seco. Se recomienda humectar el mismo en agua para evitar la descomposición de los compuestos químicos, ya que regula la temperatura y a la vez ayuda a la volatilización del aceite.(44,45)

d. El método de absorción en grasas purificadas: este es un método muy empleado para obtener los aceites esenciales de los pétalos de las flores.(44,45)

3.3. Componentes de los aceites esenciales

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas formadas por compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.

Los monoterpenos pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. A veces constituyen más del 90% del aceite esencial. Los sesquiterpenos presentan más variaciones estructurales, siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas. El alargamiento de la cadena aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí la gran variedad de estructuras conocidas (41,46). Los derivados de fenilpropano (C6-C3) son mucho menos frecuentes que los terpenoides. Generalmente son alil- y propenil - fenoles, aldehídos, característicos de determinados aceites esenciales de Apiaceae. También se pueden encontrar compuestos en C6-C1, como la vainillina o como el antranilato de metilo. Las lactonas derivados de los ácidos cinámicos (cumarinas) al ser, al menos las más sencillas de ellas, arrastables por corriente de vapor de agua, se encontrarán en algunos aceites esenciales (47).

3.4. Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas como método de análisis

Este método cromatográfico es el más conveniente, dada la volatilidad de los constituyentes. Es fácil de implementar, el tiempo de análisis es muy corto, la confiabilidad de los resultados y la automatización, la hacen un método especialmente conveniente para el análisis cualitativo y cuantitativo. Es importante destacar que su empleo es más eficiente cuando se usa en combinación con los otros métodos de separación (40,41). Por lo general, para lograr las mejores separaciones, se emplean columnas capilares de 20-50 m de longitud. Pueden emplearse diversas fases estacionarias, desde apolares (OV-1, OV-17), hasta polares (FFAP, Carbowax) para facilitar la separación. Generalmente se emplea como detector el de ionización por llama y temperatura de separación programada. (40,41).

La posibilidad de acoplar la cromatografía con varios tipos de espectrómetros incrementa valiosamente la cantidad y calidad de los resultados. El empleo de bases de datos computarizadas para la comparación de los espectros de picos desconocidos con los de referencia, además de los tiempos de retención, conducen a la identificación de los compuestos de la mezcla. Particularmente útil resulta el acoplamiento cromatografía gaseosa- espectrometría de masa (CG-EM) para la identificación de los componentes de los aceites esenciales (40,41).

3.5 Aplicaciones de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son empleados en las industrias farmacéutica, alimenticia y química (48). En la industria alimenticia, se emplean como saborizante en bebidas, licores y confituras. Todas las especies y condimentos contienen aceites esenciales (48).

En la perfumería se utiliza

para acentuar las notas de superficie, media o corazón y base o baja de perfumes, aguas de perfume, aguas de tocador,

etc. También en los

cosméticos para hacer más agradable, atractivo o impartir identidad a un producto cosmético: jabones, champús, desodorantes, labiales, cremas (48).

En la industria química se emplean los aceites esenciales y sus componentes terpénicos en perfumería, fundamentalmente los compuestos oxigenados. También se realizan transformaciones químicas de algunos compuestos terpénicos, para la obtención de otros de mayor poder aromatizante y/o acción farmacológica. Se usan en productos de aseo y limpieza para otorgar fragancia (48).

En la industria farmacéutica son empleados por sus propiedades antisépticas, desinfectantes, antihelmínticas, diuréticas, expectorantes, etc. (40,41).

3.6. Método de Folin-Ciocalteu

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante. Entre los métodos para la medición de fenoles totales se encuentra el de Folin-Ciocalteu, uno de los métodos más antiguos. Los fenoles, al igual que las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado (49,50). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno (Mo). Este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de UV/VISIBLE debido a que absorbe a una longitud de 760 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico (50).

La ventaja del método de Folin-Ciocalteu está relacionada con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción. La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes. El complejo en el caso de las proteínas es rojo o violeta y azul en el caso del amonio.(49)Una de las ventajas de ésta prueba (Folin-Ciocalteu) es que no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, si bien el método de Folin-Ciocalteu no está relacionado directamente con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimarla en los alimentos, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad de proteínas significativa. En la literatura se pueden encontrar diversos ejemplos de la aplicación del método de Folin-Ciocalteu en extractos, vinos, infusiones y jugos (51).

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los aceites esenciales están constituidos mayoritariamente por sustancias terpénicas y fenilpropánicas. A estos extracto se les ha asociado, fundamentalmente, con actividad antimicrobiana y en particular antibacteriana (52). Estudios reportan para el aceite esencial de *M. mollis* procedente de un contenido de 2,14% de timol, 2,12% de acetato de timol y 0,11% de metileugenol. Estos compuestos son de tipo fenólico y posiblemente sean los principales compuestos responsables de la actividad antimicrobiana (53).

Otros autores indican que, el aceite esencial tiene actividad anti-*Helicobacter pylori*, inhibiendo el crecimiento entre 0,7 a 6,3 cm de diámetro a una concentración de 20 a 100 µg/mL y a un pH 7,4; ellos atribuyen que dicha actividad se debe al carvacrol, isoeugenol, nerol, citral y sabineno (54).

Un estudio realizado al aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Salmonella typhi* presentó un halo de inhibición de 14,25 mm, de 11,45 mm para *Pseudomona aeruginosa* y de 21,41 mm para *Shigella dysenteriae*, mostrando actividad antimicrobiana frente a estas bacterias (55).

4.1. Difusión en agar

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos (56,57,58). El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (56,57,58). El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar, con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar. Sobre este medio de cultivo se deposita un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se siembra en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (59,60).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se trabajó con la especie vegetal *Minthostachys mollis* Griseb, con su respectiva identificación taxonómica por el Dr. Carlos Cerón Martínez Director Ad- Honorem del Herbario Alfredo Paredes (QAP) de la Universidad Central del Ecuador.

2. TRATAMIENTO POSCOSECHA DEL MATERIAL VEGETAL

a. Selección La especie *Minthostachys mollis* Griseb fue recolectada en la Provincia de Pichincha, separándose para su estudio, las hojas y flores (materia prima 1) y el follaje (materia prima 2). En ambos casos se eliminaron aquellas partes de la planta que estaban amarillentas, secas o deterioradas por insectos.

a. Lavado y secado

Las drogas vegetales se sometieron a un proceso de lavado con agua destilada, se escurrieron y una parte de ambas materias primas se sometieron al proceso de secado. La otra parte del material vegetal se utilizó fresco para la extracción del aceite esencial.

Este proceso se realizó a temperatura ambiente hasta la eliminación del exceso de agua que contenía la planta por el lavado, posteriormente se colocó en la estufa por 48 horas a una temperatura de 40°C.

b. Molienda

Tanto a las hojas y flores, como al follaje de la planta seca se sometió a un proceso de molienda en un procesador doméstico hasta obtener partículas pequeñas a través de una tamiz N°1 para obtener la droga cruda.

3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico del material vegetal (hojas y flores; follaje) se realizó con la droga cruda. Para este procedimiento, la materia prima se extrajo de forma sucesiva con éter dietílico, etanol y agua mediante maceración, para obtener las fracciones correspondientes, las cuales se someten a diferentes ensayos. En las figuras 1, 2, 3, y 4 se especifican los procedimientos desarrollados.

Los ensayos se realizaron según metodologías descritas en la literatura (42).

Extraer con 30ml de éter dietílico durante 48h a temperatura ambiente.

Extraer con 30ml de éter dietílico durante 48h a temperatura ambiente.

10g material vegetal

10g material vegetal

RESIDUO SOLIDO

RESIDUO SOLIDO

EXTRACTO ETEREO

EXTRACTO ETEREO

Filtrar

Filtrar

Extraer con tres veces el peso del residuo en volumen con etanol por maceración durante 48h

Extraer con tres veces el peso del residuo en volumen con etanol por maceración durante 48h

Filtrar

Filtrar

EXTRACTO ALCOHOLICO

EXTRACTO ALCOHOLICO

RESIDUO SOLIDO

RESIDUO SOLIDO

Extraer con tres veces el peso del residuo en volumen con etanol por maceración durante 24h

Extraer con tres veces el peso del residuo en volumen con etanol por maceración durante 24h

EXTRACTO ACUOSO EXTRACTO ACUOSO

RESIDUO SOLIDO DESECHAR

RESIDUO SOLIDO DESECHAR

Filtrar

Filtrar

EXTRACTO ETÉREO

EXTRACTO ETÉREO

Figura 1. Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de tamizaje fitoquímico.(42)

ENSAYO BALJET (Lactonas y cumarinas)

ENSAYO BALJET (Lactonas y cumarinas)

ENSAYO LIBERMANN-BUCHARD (Triterpenos y esteroides)

ENSAYO LIBERMANN-BUCHARD (Triterpenos y esteroides)

ENSAYO SUDAN (Aceites y grasas)

ENSAYO SUDAN (Aceites y grasas)

ENSAYO DRAGENDORFF (Alcaloides)

ENSAYO DRAGENDORFF (Alcaloides)

EXTRACTO ETANÓLICO

EXTRACTO ETANÓLICO

Figura 2. Esquema de las reacciones realizadas en el extracto etéreo.(42)

ENSAYO DE ALCALOIDES

ENSAYO DE ALCALOIDES

ENSAYO SHINODA

ENSAYO SHINODA

ENSAYO KEDDE

ENSAYO KEDDE

ENSAYO NIHIDRINA

ENSAYO NIHIDRINA

ENSAYO FeCl₃

ENSAYO FeCl₃

ENSAYO LIBERMANN-BUCHARD

ENSAYO LIBERMANN-BUCHARD

ENSAYO ESPUMA

ENSAYO ESPUMA

ENSAYO BALJET

ENSAYO BALJET

ENSAYO FEHLING

ENSAYO FEHLING

ENSAYO RESINAS

ENSAYO RESINAS

Figura 3. Esquema de las reacciones realizadas en el extracto etanólico.(42)

EXTRACTO ACUOSO

EXTRACTO ACUOSO

ENSAYO DE ESPUMA

ENSAYO DE ESPUMA

ENSAYO FEHLING

ENSAYO FEHLING

ENSAYO DE ALCALOIDES

ENSAYO DE ALCALOIDES

ENSAYO DE SHINODA

ENSAYO DE SHINODA

ENSAYO FeCl₃

ENSAYO FeCl₃

Figura 4. Esquema de las reacciones realizadas en el extracto acuoso (42). 4. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

La extracción del aceite esencial se efectuó desde dos materias primas: en las hojas y flores y con todo el follaje, mediante el método de hidrodestilación. El proceso se realizó empleando en cada extracción 100 g de droga y 1,2 L de agua destilada.

La droga vegetal fué colocada en un balón de 2 L al que se le añadió el agua destilada. Se conectó el balón a un sistema de destilación y se colectó el destilado durante 2 horas. Los aceites esenciales se separaron mediante extracción líquido-líquido con éter dietílico y posterior secado con sulfato de sodio anhidro. Para su conservación se almacenaron en viales ámbar a 4°C hasta realizar los análisis pertinentes (42,61,62).

4.1. Determinación del rendimiento

Para obtener el rendimiento del aceite esencial se utilizó la siguiente ecuación (42). Ecuación 1:

Dónde: AE = Rendimiento de aceite esencial (%).

PA = masa del recipiente con aceite esencial (g).

PV = masa del recipiente vacío (g).

100 = factor matemático para los cálculos.

M = masa de la droga (g).

5. ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se elaboraron extractos etanólicos partiendo también de las mismas materias primas vegetales (hojas-flores y follaje), pero, en este caso, utilizando la droga cruda.

Se empleó el método de maceración utilizando 20 g de droga cruda y 100 mL de etanol al 96% como menstro, según lo reportado.(43) El proceso extractivo se llevó a cabo durante 7 días realizando el recambio del menstro en dos ocasiones, al cual se llevó al rotoevaporador BUCHI a 40°C, para concentrar al extracto y utilizarlo en posteriores análisis.

5.1. Determinación de los parámetros de calidad del extracto

A los extractos obtenidos (hojas-flores y follaje) se le determinó un conjunto de parámetros físico-químicos de control de la calidad, según procedimientos descritos.(42) 5.1.1 Características organolépticas

Se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

a.

Determinación del olor. Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1cm de ancho por 10 cm de longitud y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con

el olor característico

del producto (42).

b. Determinación del color. Se toma un tubo para ensayos limpio y seco, se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas (42). 5.2.

Determinación del pH

Para

la determinación

del pH se utilizó un pH-metro modelo Oaklon, previamente ajustado con soluciones buffers de pH 4,01 y 7. El procedimiento se realizó por triplicado

y se calculó el promedio de las tres mediciones (42).

5.3. Índice de

refracción

Se utilizó un refractómetro Abbemat 200 de Anton Paar. Se efectuaron tres lecturas en el equipo y se calculó el promedio de las mismas (42).

5.4.

Densidad relativa

Se realizó por picnometría y se empleó una balanza analítica monoplato marca

Pioneer (42).

De la muestra de ensayo se toma la cantidad necesaria de acuerdo con la capacidad del picnómetro y se enfría a 25° C (42).

La densidad relativa se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2:

Dónde:

m = masa del picnómetro vacío (g)

m1= masa del picnómetro con la muestra de ensayo (g)

m2 = masa del

picnómetro con

agua (g)

5.5. Contenido de sólidos totales El análisis se realizó por triplicado,

a partir de 5 mL de extracto etanólico, utilizando una estufa marca Miemmer a una temperatura 105 °C por 3 horas, luego se colocó en el desecador por 15 min y se llevó a pesar en la balanza analítica monopiano marca Pioneer (42).

Los sólidos totales St se calcularon mediante la siguiente ecuación

Ecuación 3:

Dónde: Pr = masa de la cápsula más el residuo (g)

P = masa de la cápsula vacía (g)

V = volumen de la porción de ensayo (mL)

6.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

6.1. Cromatografía en capa delgada (CCD) 6.1.1

Cámara cromatografica Se empleó una cámara de vidrio.

La cámara se situó en la campana del laboratorio

y se trabajó a temperatura ambiente (25-29°C).

Se estimó un tiempo de saturación de 10 min., aproximadamente. 6.1.2

Tipo de adsorbente

Se emplearon placas de Sílica gel GF254 (0,20mm; Macherey-Nagel) sobre soporte de aluminio para los análisis cualitativos.

Las placas

no fueron activadas y presentaron dimensiones de 10 cm x 10 cm. 6.1.3 Aplicación de la muestra

Se realizó el

análisis cromatográfico tanto de los extractos etanólicos de hojas-flores y follaje, como al aceite esencial de hojas-flores y del follaje, a los cuales se les realizaron las respectivas diluciones. Adicionalmente, se tomó una alícuota del extracto etanólico del follaje y se despigmentó con la ayuda de una microcolumna RP-18, muestra que también fue analizada por CCD.

La aplicación se realizó con el uso de microcapilares, efectuándose un secado espontáneo de las aplicaciones.

Para el estudio se realizaron dos aplicaciones de la muestra en cantidades diferentes.

6.1.4

Corrida o desarrollo del cromatograma

En

ambos casos se desarrolló una corrida ascendente utilizando como

fase móvil

las mezclas hexano:acetato de etilo (7:3); dicloroformo : metanol (9:1). Las

fases móviles se prepararon a través de un simple proceso de mezclado.

La aplicación

se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue aproximadamente de 8 cm. La distancia entre cada punteo fue de 1 cm.

Después de la corrida, el secado de

la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

6.1.5 Revelado e identificación

Se realizaron dos tipos de revelado, físico y mixto. El revelado físico se desarrolló a través de la luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm

y a 365

nm. Para el revelado mixto se utilizó H₂SO₄ y calor.

Después de rociar la placa se calentó a una temperatura entre 105 C

y 110 C de 3 a 5 min., hasta que se modificó la apariencia de la misma

y posteriormente se roció la vainillina

y se aplicó nuevamente calor.

6.2 Análisis del aceite esencial por

cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (

CG-EM)

6.2.1 Condiciones cromatográficas Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890, equipado con un detector selectivo de masas,

serie 5973N. La inyección de la muestra (0,2 µL), siendo la temperatura del inyector 280 °C. La separación

se realizó en una columna HP-Ultra 2 de 12 m x 0.20 mm x 0.33 µm.

Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,8 mL/min.

La rampa de temperatura empleada fue de temperatura inicial 60 °C por 2 minutos, incrementado a 4 °C/min hasta 100, posteriormente se incrementa a 10 °C/min hasta 250 °C y se deja por 12 minutos. Tiempo de corrida 39 min.

El espectrómetro de masas fue operado en el modo de impacto electrónico (IE) a 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 230 °C y la temperatura del cuadrupolo 150 °C. La detección se realizó en el modo de barrido total desde 45-600 uma.

6.2.2 Proceso de identificación y cuantificación

Las estructuras químicas fueron asignadas según la base de datos Wiley 275. La cuantificación relativa de los compuestos se realizó por normalización interna del área bajo la curva de cada pico cromatográfico. 6.3. Análisis de los extractos etanólicos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

6.3.1 Preparación de las muestras Los extractos etanólicos obtenidos presentaron una elevada pigmentación atribuible a la presencia de clorofila, propia de las partes aéreas de las plantas. Para eliminar estos constituyentes no deseados, se tomó una alícuota de cada extracto y se pasó a través de una columna RP-18, obteniéndose extractos de coloración ligeramente amarilla. Aproximadamente, 2 mL de cada extracto se concentraron a sequedad y dispusieron para el análisis por CG-EM. El contenido de cada vial se disolvió con 1 mL de etanol al 90 %. Se tomaron 50 µL de la disolución y se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Se derivatizó por 30 min con 50 µL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) a 60 °C.

6.3.2

Condiciones cromatográficas

Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890, equipado con un detector selectivo de masas, serie 5973N. La inyección de la muestra (1 µL), siendo la temperatura del inyector 280 °C. La separación

se realizó en una columna HP-Ultra 2 de 12 m x 0,20 mm x 0,33 µm.

Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,8 ml/min.

La rampa de temperatura empleada fue de temperatura inicial 8 °C, incrementado a 5 °C/min hasta 310, posteriormente se dejó por 20 minutos. El tiempo de corrida fue de 66 min.

El espectrómetro de masas fue operado en el modo de impacto electrónico (IE) a 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 230 °C y la temperatura del cuadrupolo 150°C. La detección se realizó en el modo de barrido total desde 42-600 uma.

6.3.3 Proceso de identificación y cuantificación

Las estructuras químicas fueron asignadas según la base de datos Wiley 275. La cuantificación relativa de los compuestos se realizó por normalización interna del área bajo la curva de cada pico cromatográfico. 6.4. Espectrometría de masas por infusión directa

Obtención de espectros de masas (fingerprinting) de extractos por infusión directa 6.4.1
Preparación de la muestra

Se trabajaron los extractos etanólicos pero solo los de planta entera (follaje), previamente despigmentado según fue descrito en el acápite II.6.3.1. 1 mg del extracto etanólico seco del follaje se disolvió en 1 mL de una mezcla MeOH: 0,1 % NH₃ (8:2, v/v) para el modo negativo y MeOH: 0,1% CH₃COOH (8:2, v/v) para el modo positivo. 1 µL de la disolución anterior se diluyó hasta 1 mL usando la misma mezcla de disolventes para obtener una concentración final de 1ppm (muestra de análisis).

6.4.2 Espectros de Masas (fingerprinting)

Los espectros de masas se obtuvieron por infusión directa empleando un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ-XLTM (Thermo Scientific™). Los principales parámetros para la obtención de los espectros fueron: velocidad de infusión 5 µL/min., voltaje de ionización 3,5 Kv, flujo de gases principal/auxiliar (12/8 unidades arbitrarias), temperatura del capilar 275 °C. Los espectros se obtuvieron en modo negativo y positivo. El rango de masas evaluado fue 100-1200 Da. Los iones pseudo-moleculares que mostraron mayor intensidad fueron aislados y fragmentados para obtener los espectros EMn. La energía de colisión se seleccionó experimentalmente y su valor promedió entre 15-45.

7. MÉTODO DE FOLIN- CIOCALTEU

7.1 Preparación de los reactivos Solución diluida de Folin-Ciocalteu: Se tomaron 10 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y se diluyeron en 100 mL de agua destilada. Solución de carbonato de sodio 7,5%: Se pesó 75 g de Na₂CO₃ anhidro y se disolvió en un litro de agua destilada.

7.2

Curva de calibración

Se pesaron 500 mg de ácido gálico (en balanza analítica marca Pioneer) y se disolvieron en 20 mL de agua destilada a 80°C, o en metanol a temperatura ambiente. Se transfirió cuantitativamente

a un matraz aforado de 50 mL y

se

enrazó con agua destilada. De esta solución concentrada de ácido gálico se tomaron alícuotas de 1 hasta 5 mL y se diluyó a 100 mL.

Estas diluciones corresponden a las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/100 mL de ácido gálico.

7.3 Procedimiento

En tubos de ensayo de aproximadamente 50 mL de capacidad se adicionó:

1. 200 µL de extracto de la muestra o de la solución diluida de ácido gálico.
2. 10 mL de solución diluida de Folin-Ciocalteu

3. 1,8 mL de agua destilada

Se agitó y se esperaron cinco minutos. Se adicionan 8 mL de solución al 7,5% de Na₂CO₃. Agitando nuevamente y se dejó en reposo durante dos horas. La lectura en el espectrofotómetro Marca Milton Ray se efectuó a 765nm.

8.

ESTUDIO ANTIBACTERIANO

8.1 Revivificación de bacterias A partir de un cultivo puro de bacteria de *Staphylococcus aureus*, se seleccionaron varias colonias suspendiéndolas en 9 mL de caldo Bad Peptone e incubando a 36 oC durante 48 horas (64). Posteriormente, se procedió a sembrar en (agar Manitol) a partir del tubo de enriquecimiento, por siembra en estrías incubando a 36 ° C durante 24 horas (64).

8.2 Preparación del inóculo Se seleccionaron de cuatro a cinco colonias sembradas anteriormente y se transfirieron a un tubo que contiene 9 mL de caldo apropiado (BAD PEPTONE). Se incubo el caldo a una temperatura entre 35 °C a 37 °C por 24 horas, hasta que alcanzó la turbidez adecuada según la escala de Mc Farland (64). 8.3 Inoculación en placa Se sembró en las placas agar Mueller Hinton, el inóculo tomado del cultivo de la siguiente manera. Se sumerge el hisopo en el caldo de cultivo (108), se escurre el exceso de líquido sobre la pared interior del tubo y se estrían en el agar de la placa deslizando el hisopo suavemente por su superficie en zig-zag, girando la placa aproximadamente a 60°. Este proceso se realiza por triplicado (63).

8.4 Aplicación de actividad antimicrobiana

Se realizó por el método difusión en pozo (perforación en gel de agar). En el medio Mueller Hinton, se hicieron los pocillos sobre la superficie de los agares.(65) En cada placa Petri se realizaron 4 pocillos aplicando las muestras correspondientes, según se muestra en la cuadro 3. Cada estudio se realizó por triplicado. Cuadro 3: Descripción de la aplicación de las muestras en las placas Petris.

Placas para el análisis del aceite esencial (volumen añadido 10 µL)

Placas para el análisis del extracto (volumen añadido 10 µL) Pocillo 1 Ciprofloxacino 500 mg (control +) Pocillo 1 Ciprofloxacino 500 mg (control +) Pocillo 2 Agua destilada (control -) Pocillo 2 Agua destilada (control -) Pocillo 3 Aceite de hojas y flores Pocillo 3 Extracto de hojas y flores Pocillo 4 Aceite del follaje Pocillo 4 Extracto del follaje Luego de la aplicación se dejaron reposar por 30 minutos. Posteriormente, se incubaron a 37°C por 24 horas y se efectuó la lectura según el método Kirby-Bauer.(64) 8.5 Lectura del ensayo de actividad antimicrobiana

La lectura fue realizada por la mensuración del diámetro del halo de la zona de inhibición, considerando el diámetro del orificio (65,66,67). De acuerdo a las normas National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) se interpretaron los halos de inhibición correlacionando las mediciones de los halos del control positivo (ciprofloxacino) con los aceites y extractos estudiados.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TRATAMIENTO POSCOSECHA DEL MATERIAL VEGETAL

La droga vegetal fue recolectada en la ciudad de Quito. Se llevó una muestra representativa de la misma al herbario de la Universidad Central del Ecuador para su correspondiente identificación, emitiéndose el informe que se muestra en el anexo 2. Para el estudio se realizó, en primer lugar, el adecuado proceso de selección y lavado de la droga vegetal.

Este proceso tiene como objetivo

la conservación de

las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la droga vegetal.

El material fresco debe ser inmediatamente manejado de forma que no se deteriore,

para evitar pérdidas innecesarias y lograr un producto de óptima calidad.

Un procesamiento post-cosecha inadecuado da como resultado una materia prima de baja calidad y posible pérdida de principios activos, por lo que se realizó una selección cuidadosa de la droga vegetal,

desechando las partes decoloradas, manchadas, enfermas o deterioradas por insectos.

Mediante el lavado

se eliminaron las materias extrañas que pudieron haberse arrastrado durante la recolección

y se procedió a obtener dos materias primas diferentes: hojas y flores, y en segundo lugar el follaje.

La idea de trabajar las dos materias primas vegetales por separado, fue para poder valorar el aporte químico y biológico de cada una de ellas.

Luego de separadas las drogas objeto de estudio, se destinó una parte para la extracción del aceite esencial y otra parte para la obtención del extracto etanólico. Las que se emplearían para la extracción del aceite esencial se trabajaron en estado fresco, pues de esta manera se logra mayor rendimiento, por lo que en este caso, inmediatamente después de lavada se sometió al proceso de extracción.

Las que se utilizarían para la obtención de los extractos etanólicos se sometieron a un proceso de secado. Este proceso juega un papel muy importante en aquellas materias primas que deben ser almacenadas durante algún tiempo antes de iniciar su estudio. La presencia de humedad en la droga favorece el deterioro de esta y por consecuencia su integridad química y actividad biológica.

2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Luego de obtenida la droga cruda (seca) se le realizó un tamizaje fitoquímico a ambas partes seleccionadas (las hojas y flores; follaje).

El tamizaje fitoquímico es la investigación química preliminar de la planta para detectar la presencia de los principales grupos químicos y facilitar la correcta orientación de la investigación posterior.

Para la realización del mismo, se informan en la literatura variados esquemas de trabajo, que comprenden a su vez el uso de diferentes disolventes de extracción. La selección y el orden de los disolventes se realizó mediante la fundamentación descrita en el manual mediante una extracción sucesiva de la droga con disolventes de polaridad creciente (éter, etanol y agua). (42) Obviamente, al trabajar con diferentes disolventes se evalúa la presencia de metabolitos de polaridad afín a cada uno de ellos.

El resultado del tamizaje realizado al extracto etéreo se muestra en la cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos etéreos.

Ensayo

Metabolito Hojas y flores Parte entera Sudan Aceites y grasas + + Dragendorff Alcaloides - - Baljet Lactonas y cumarinas - - Liebermann-Burchard Triterpenos - esteroides + + Se sugiere resultado positivo para el ensayo de sudan por la presencia de grasa en las paredes del tubo de ensayo (42). En este caso no se observó la coloración roja que la literatura refiere (42), pero debe tenerse en cuenta la posible interferencia del tono verde intenso de los extractos. No obstante, es evidente la existencia de compuestos de naturaleza lipídica, por el notable aroma de la especie atribuible a los aceites esenciales que contiene, los que suelen presentarse en bajas concentraciones. Con relación a la posible presencia de triterpenos - esteroides, también se consideró positiva la reacción. Estos compuestos son de naturaleza apolar y de amplia distribución en la naturaleza. Para el resto de los metabolitos buscados se observaron resultados negativos.

Para los extractos etanólicos se realizaron una mayor cantidad de ensayos los que se presentan en la cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos etanólicos

Metabolitos

Ensayo Hojas y flores Parte entera Alcaloides Dragendorff - - Lactonas y cumarinas Baljet - - Triterpenos - esteroides Liebermann-Burchard + + Compuestos fenólicos Cloruro férrico + + Azúcares reductores Fehling + + Saponinas Espuma + + Resinas Resinas - - Aminoácidos Ninhidrina + + Flavonoides Shinoda - - Glicósidos cardiotónicos Kedde - - En estos resultados se pudo apreciar de manera evidente la presencia de compuestos triterpénicos y fenólicos, observándose, en este último caso, una coloración verde (42) más intensa que el extracto inicial. De igual manera la aparición de un precipitado rojo ladrillo sugirió la presencia de azúcares reductores, compuestos de común existencia en la mayoría de extractos vegetales. Finalmente se evaluó el extracto acuoso (Cuadro 6) mostrando resultados positivos para el ensayo con cloruro férrico con una coloración verde intensa (42), lo que indica la presencia de compuestos fenólicos. Además, resultó positivo para el ensayo de Fehling presentando una coloración roja (42) más evidente que en el extracto etanólico, indicando la presencia de azúcares reductores, los que obviamente, son más solubles en agua.

Cuadro 6. Resultados de los ensayos de tamizaje para los extractos acuosos.

Ensayo

Metabolito Hojas y flores Parte entera Dragendorff Alcaloides - - Cloruro férrico Compuestos fenólicos + + Fehling Azúcares reductores + + Espuma Saponinas + + Shinoda Flavonoides +/- +/- También se sugiere la presencia de saponinas por la existencia de espuma persistente (42). Estos metabolitos producen disminución de la tensión superficial de la solución acuosa, provocando la aparición de dicha espuma. Adicionalmente, el ensayo de shinoda para identificar la presencia de flavonoides, se le definió como dudoso. Esto sugiere que podrían existir flavonoides en forma de glicósidos, ya que son extraídos en medio acuosos, además de que podrían presentarse en bajas concentraciones.

Estos resultados no deben de tomarse como confirmatorios sino como un indicio de posibles metabolitos presentes. Ante un resultado positivo, hay que considerar la posibilidad de compuestos que interfieren provocando falsos positivo. De ahí la importancia de la revisión bibliográfica y del conocimiento de las relaciones taxonómicas, que nos permiten conocer la real posibilidad de tales interferencias. Un resultado negativo debe ser más cuidadosamente evaluado, puede estar ocasionado por la real ausencia del tipo de compuesto en el material evaluado, por la metodología empleada o por la concentración de los metabolitos. Adicionalmente, son múltiples los factores tanto extrínsecos como intrínsecos que pudieran también incidir en los resultados del tamizaje.

3. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para la obtención del aceite esencial se trabajó con la droga vegetal fresca. Luego de seleccionada y lavada, se contaba con dos materias primas: hojas y flores; follaje, a las que se les disminuyó el tamaño de partícula con el fin de aumentar los rendimientos de la extracción. Para la obtención del aceite esencial se utilizó el método de hidrodestilación, el mismo que se informa en la literatura (68) para la obtención de dicho aceite. El equipo utilizado se muestra en la figura 5.

Figura 5: Equipo de hidrodestilación empleado para la extracción del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. El proceso se desarrolló durante un tiempo de 2 horas, período tras el cual no se observó incremento del volumen de aceite.

De la destilación se obtuvo una emulsión de agua y aceite que se separó por simple decantación, el aceite esencial se recogió en frascos de color ámbar para evitar la posible descomposición por efecto de la luz.

Al aceite esencial se adicionó sulfato de sodio anhidro para evitar que tenga minúsculas cantidades de agua, el tiempo de contacto fue de 10 a 15 minutos. Debido al rendimiento bajo del aceite, no se procedió a filtrar sino que se empleó una pipeta pasteurs para trasvasarlo en un frasco color ámbar, previamente esterilizado.

El rendimiento ofrecido en el estudio fue de 0,41% para hojas y flores, para planta entera fue de 0,21%.

El rendimiento obtenido para el aceite esencial resulta ser mayor con las hojas y flores que cuando se extrae de la planta entera (follaje). Aunque los rangos obtenidos son aceptables para aceites esenciales, la literatura informa que por igual método de esta planta se han logrado rendimientos de 1,2% de acuerdo a investigaciones realizadas (31).

Es importante señalar que el rendimiento de aceite esencial, de manera general, suele ser bastante bajo, frecuentemente menos de 1 %.(15,43) Por otra parte, la variación en el rendimiento de aceites esenciales depende de un conjunto de factores tales como, características edafo-climáticas, época de recolección, condición del material vegetal (fresco o seco), donde por lo general los mayores porcentajes se alcanzan en drogas frescas.

4. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS

Paralelo a la obtención del aceite esencial se elaboraron extractos etanólicos de ambas materias primas (hojas y flores; follaje). Este estudio se ideó debido a que la literatura en su mayoría hace referencia al aceite esencial, siendo estos los metabolitos más conocidos de la especie objeto de estudio. De ahí que resultara interesante el poder conocer que otros metabolitos podían encontrarse en los extractos etanólicos. El etanol es un disolvente que se considera

general, pues favorece la permeabilidad de la célula, propiciando la extracción de metabolitos de polaridad baja, media y alta.

Se eligió el método de maceración por ser noble, sencillo y considerando que se desconocía la naturaleza química de los productos naturales presentes. Es decir, es un método que no aplica calor y por tanto no se corre el riesgo de que se degraden algunos de los metabolitos de las drogas.

Los extractos obtenidos fueron evaluados mediante diferentes parámetros con el propósito de establecer su calidad.

Organolépticamente ambos extractos mostraron una pigmentación verde muy intensa, con un olor mentolado y característico de la planta.

En la cuadro 7 se presentan los resultados del estudio de calidad realizado a los extractos.

Cuadro 7: Características físico-químicas de los extractos etanólicos obtenidos.

Parámetros

Hojas y flores Resultados/S Follaje Resultados/S pH 5,56/0,0100 5,55/0,0060 Índice de refracción 1,37/0,0020 1,38/0,0002 Densidad relativa 0,84/0,0030 0,84/0,0020 Sólidos totales 8,80/0,2600 6,28/0,0500 Como se puede apreciar no existen apreciables diferencias entre los resultados obtenidos para las hojas y flores y el del follaje completo. Los valores de pH

de ambas muestras es ligeramente ácido esto se debe a la presencia de compuestos fenólicos, además se realizó índice de refracción y densidad relativa que

son parámetros propios de cada extracto y dependen de la composición química que tenga cada uno. Estas determinaciones también pudieran ser de gran valor para estudios de estabilidad que se realizasen en un futuro.

Los sólidos totales permiten conocer que cantidad de compuestos pudieron ser extraídos bajo las condiciones empleadas. Esta podría ser una opción para trabajar cuantitativamente un extracto, cuando se desconocen cuáles son sus marcadores químicos.

5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL Y DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

5.1 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)

Se realizó la evaluación cromatográfica de los aceites esenciales utilizando dos fases móviles diferentes y dos sistemas de revelado.

La figura 6 muestra el comportamiento cromatográfico de los aceites esenciales cuando se desarrolla la placa con hexano: acetato de etilo (7:3).

Al revelar la placa con luz ultravioleta a 254 nm se puede evidenciar que en ambos aceites hay metabolitos con presencia de grupos cromóforos conjugados en su estructura, los cuales absorben apreciablemente a esta longitud de onda.

Aunque ambas manchas aparecen en los dos aceites esenciales, en el caso del follaje existe otra notable a un Rf ligeramente inferior.

Posteriormente se realizó el revelado químico pulverizando una solución de cloruro férrico sobre la placa, seguido de un tratamiento con calor. En este caso se visualizaron diversas manchas de colores oscuros a diferentes Rf, lo que sugiere la presencia de compuestos fenólicos en dichos aceites. Existe gran similitud entre ambos aceites, aunque hay manchas que difieren en intensidad, sobre todo en el follaje, sin embargo, no puede realizarse una valoración cuantitativa pues no se aplicaron cantidades iguales y exactas de ambas muestras.

Resulta interesante notar que dichos compuestos fenólicos no son los mismos que revelan con gran intensidad al efecto de la luz UV254nm

Revelado: UV 254 nm

Revelado: FeCl₃

Figura 6: Perfil cromatográfico en placa delgada de los aceites esenciales (h y f: hojas y flores; Foll: Follaje) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM hexano: acetato de etilo (7:3).

Posteriormente se realizó un análisis similar pero en esta ocasión cambiando la fase móvil para una de mayor polaridad (Figura 7).

Revelado: UV 254 nm

Revelado: FeCl₃

Figura 7: Perfil cromatográfico en placa delgada de los aceites esenciales (h y f: hojas y flores; Foll: Follaje) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM cloroformo: metanol (9:1).

Con estas condiciones no se logra la misma resolución entre las manchas, que antes se pudo apreciar. Se mantiene el revelado de compuestos con grupos cromóforos conjugados (UV 254 nm) y la presencia de compuestos fenólicos (FeCl₃).

En estas corridas se puede apreciar una sola mancha por cada aplicación, lo que deja demostrado que el hecho de que revele una sola mancha no significa que existe un compuesto puro. En ambos casos se analizan aceites esenciales que químicamente se definen como mezclas complejas de metabolitos volátiles.

De manera similar se realizó la evaluación por CCD de los extractos etanólicos, utilizando las condiciones cromatográficas antes ensayadas para los aceites esenciales.

La figura 8 muestra el comportamiento cromatográfico de los extractos etanólicos cuando se desarrolla la placa con hexano: acetato de etilo (7:3).

Al revelar la placa con luz ultravioleta a 254 nm se puede evidenciar que en ambos aceites hay metabolitos con presencia de grupos cromóforos conjugados en su estructura, los cuales absorben apreciablemente a esta longitud de onda.

Revelado: UV 254 nm

Revelado: UV 365 nm

Revelado: FeCl₃

Figura 8: Perfil cromatográfico en placa delgada de los extracto etanólico (h y f: hojas y flores; foll: follaje; foll sin clor: follaje sin clorofila) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM hexano: acetato de etilo (7:3).

El comportamiento cromatográfico en la fase móvil hexano: acetato de etilo reafirma la presencia de clorofila, pigmento característico sobre todo de las hojas de los vegetales. Por encima del punto de aplicación en las dos primeras aplicaciones (h y f; foll) aparece un grupo de manchas de color amarillo y verde al visible, que fluorescen a la luz ultravioleta y de tono rojizo bajo la luz ultravioleta (365 nm), las cuales se corresponden con la clorofila.

Existe una tercera aplicación (sin color) que corresponde a la muestra despigmentada. Cuando se cuenta con extractos altamente pigmentados por la presencia de clorofila, esta interfiere en la identificación de metabolitos de naturaleza polar. De ahí la necesidad de emplear columnas apolares que dejen retenidos los metabolitos de tal naturaleza y los polares eluyan con ayuda del metanol como FM. En este caso como se aprecia en la placa central revelada con luz UV 365 nm, las manchas rojizas desaparecen, lo que evidencia la retención de la clorofila en la microcolumna de fase inversa.

Con relación al revelado con FeCl₃ se aprecian algunas manchas oscuras que sugieren la presencia de compuestos fenólicos, pero las de mayor intensidad se observan en el punto de aplicación, por lo que se precisa de una FM de mayor polaridad.

Por lo antes expuesto se decidió realizar la corrida de las mismas muestras pero empleando como FM cloroformo: metanol (9:1), los perfiles se muestran en la figura 9.

Revelado: UV 254 nm

Revelado: UV 365 nm

Revelado: FeCL3

Figura 9: Perfil cromatográfico en placa delgada de los extractos etanólicos (h y f: hojas y flores; foll: follaje; foll sin clor: follaje sin clorofila) de *Minthostachys mollis* utilizando como FM cloroformo: metanol (9:1).

El revelado físico mostró de manera similar la presencia de grupos que absorben a la luz ultravioleta, desapareciendo la tonalidad rojiza al pasarla por la columna RP-18.

Con esta fase móvil se lograron remover del punto de aplicación los compuestos que antes revelaron de color oscuro con cloruro férrico, sin embargo, no es la FM ideal para mostrar una separación adecuada de los metabolitos presentes o lo que es igual no logra un buen perfil cromatográfico.

5.2 Análisis del aceite esencial por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Dentro de los métodos de caracterización más empleados para el estudio fitoquímico de los aceites esenciales, se encuentra la técnica de CG-EM. Existen múltiples trabajos relacionados con aceites esenciales, por lo que las bases de datos almacenan una diversidad de espectros de masas de los compuestos químicos que integran la compleja composición química de los mismos, haciéndose más fácil la interpretación de los espectros. En la figura 10 se pueden apreciar los cromatogramas gaseosos correspondientes a los dos aceites esenciales obtenidos (A: hojas y flores; B: follaje).

A simple vista se puede apreciar que difieren químicamente el aceite obtenido de las dos materias primas, siendo más compleja la apariencia cromatográfica correspondiente al follaje. Lógicamente, la presencia del tallo aporta nuevos metabolitos a la especie vegetal.

A A

B B

Figura 10: Cromatogramas gaseoso de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis*. A: Aceite esencial de las hojas y flores; B: aceite esencial del follaje. Para cada una de estas señales se realizó el espectro de masas por impacto electrónico, identificándose mediante la base de datos los metabolitos que se presentan en la cuadro 8. Como se puede apreciar muchos de estos compuestos pertenecen a la familia de los compuestos terpénicos y en particular a los monoterpenos. La estructura de muchos de los metabolitos, sobre todo los mayoritarios se muestra en la figura 11.

Cuadro 8: Composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo), según el análisis por CG-EM.

Tr

Compuestos Hojas y flores Follaje

| Compuesto | Hojas y flores (%) | Follaje (%) |
|----------------------|--------------------|-------------|
| 3-Octanol | 0,99 | 0,32 |
| L-Linalol | 4,12 | 5,36 |
| L-Mentona | 19,32 | 5,87 |
| Neomentol | 32,34 | 7,97 |
| L-Menthol | 1,21 | 9,45 |
| α -Terpineol | 0,95 | 9,60 |
| cis-D-dihydrocarveol | | |

1,97 10.82 Citronelol 14,84 10.94 Pulegona 28,42 4,63 11.67 Geraniol 24,93 12.52 8-Hidroxi-delta-4 (5)-p-mente-3-ona 1,12 12.78 Timol 2,82 14.10 Acetato de timilo 0,68 14.32 Acetato de nerilo 0,63 14.69 Acetategeranilo 8,60 15.19 B-cariofileno 0,51 15.64 p-Ment-4-en-3-ona 1,77 6,20 16.12 Isómero de 16 p-ment-3-en-2-one 0,64 1,25 17.55 Spathulenol 5,76 2,50 17.62 Óxido de cariofileno 2,20 1,54 22.11 Óxido de manoilo 1,64 0,45 23.18 3(16),14-labdien-8-ol 1,67 6,76 Compuestos como el 3-octanol, acetato de geranilo, acetato de timilo, mentona, neomentol, óxido de cariofileno, pulegona, spathulenol, timol, β -cariofileno fueron identificados en dicha especie procedente de la región de Zaruma 13). Resulta interesante el hecho de que al analizar los aceites esenciales por esta técnica no se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, los que se sugieren en el estudio de CCD al revelar con FeCl₃. Obviamente, no se descarta la presencia de estos compuestos, los que podrían no ser identificados directamente por las bases de datos.

3-

Octanol

Linalol

Mentona Neomentol

Pulegona Mentol

Alfa-Terpineol

cis-D-dihydrocarveol

Spathulenol

Óxido de cariofileno

Geraniol

Citronelol

Timol β -cariofileno

Acetato de nerilo

Acetato de geranilo

p-Menth-4-en-3-one

Oxide Manoilo

Isómero de 16. P-Menth-3-en-2-one

13(16),14-labdien-8-ol Figura 11: Algunas de las estructuras químicas identificadas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo), según el análisis por CG-EM.

Realizando una revisión de otros estudios a partir del aceite esencial de la especie *M. mollis* por CG-EM se puede apreciar (tabla 9) que la pulegona y la mentona suelen ser los componentes mayoritarios. En el presente estudio el componente mayoritario en las hojas y flores es el neomentol (32,34%), seguido de la pulegona (28,42%) y de la mentona (19,32%). Sin embargo, para el follaje de la especie, aunque dichos metabolitos se mantienen, se identificaron muchos otros, los que lógicamente, deben ser aportados por el tallo. Para esta materia prima el componente

mayoritario resulta ser el geraniol (24,93%), seguido del citronelol (14,84 %). Mentona, pulegona y neomentol, están presentes pero en menor porcentaje.

Cuadro 9. Composición química del aceite esencial de la *Minthostachys mollis* Griseb referida en otras investigaciones.

Origen Geográfico

Metabolitos Composición mayoritaria (%) Referencia Bibliográficas

Venezuela Pulegona trans-Mentona cis-Mentona Piperitenona Piperitona 55.2 31.5 4.5 1.7 1.5 (31)

Argentina Pulegona D-Mentona Limoneno Isomentona 52.6 35.8 2.6 1.5 (69) Argentina Pulegona D-Mentona Cariofileno Limoneno Isomentona 52.6 35.8 7.2 2.6 1.5 (29)

EE.UU (Indiana) Neomentol Mentona Mentol Piperitona Isomentona 29.34 24.00 20.55 8.96 4.11 (33)

Ecuador (Zaruma) Mentona Acetate de carvacrylo Pulegona Carvacrol β -Carifileeno Isomentona p-Cimeno 16.4 10.00 9.99 9.00 5.6 3.8 3.7 (13)

Colombia (Cartagena) Pulegona Mentona trans- β Cariofileno Bicyclgermacreno Germacreno D 19.00 11.90 18.00 11.30 11.00 (30) Perú (Lima) Pulegona Mentona 36.68 24.24 (32) Al contrastar los resultados obtenidos con lo que informa la literatura científica, se puede apreciar que la composición química de la misma especie cultivada en diferentes regiones varía apreciablemente, tanto cualitativamente como cuantitativamente. Este suceso no es nada particular pues la diversidad de metabolitos presentes en un aceite esencial puede cambiar según el estado vegetativo y la edad de la especie, lo cual guarda estrecha relación con la época del año en se efectúe la recolección. Además, sobre la composición química del aceite esencial ejerce gran influencia el clima donde crece la especie, la hora del día en que se recolecten, etc (41). 5.3 Análisis de los extractos etanólicos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Los extractos que se analizaron por este método fueron previamente purificados con ayuda de la microcolumna RP-18, para eliminar la clorofila y demás pigmentos interferentes (Anexo 3). Para el análisis la muestra se trató con MSTFA con el objetivo de formar los trimetilsilil derivados volátiles. Por tanto, los compuestos con grupos OH en su estructura, presentarán un M+ con 72

unidades de masas por encima de su masa molecular, por cada grupo OH.

Como se puede visualizar en la figura 12,

las señales se agrupan en tres zonas fundamentales, las que difieren en cuanto a intensidad al comparar el cromatograma A (hojas y flores) con el B (follaje).

A

A

Figura 12: Cromatogramas gaseosos de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. A: extracto despigmentado de las hojas y flores; B: extracto despigmentado del follaje.

B

B

Figura 12 cont.: Cromatogramas gaseosos de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. A: extracto despigmentado de las hojas y flores; B: extracto despigmentado del follaje.

Con ayuda de la base de datos de espectros de masas se pudieron identificar los compuestos que se presentan en la cuadro 10.

Cuadro 10. Composición química de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (tipo), según el análisis por CG-EM.

Tr

Compuestos Hojas y flores Follaje

| Compuesto | Hojas y flores | Follaje |
|---------------------------------|----------------|---------|
| % relativo | 2.55 | 2.72 |
| Ácido propanóico | 0,15 | 0,414 |
| Ácido acético | 0,03 | 2.83 |
| L-valina | 0,07 | 3.08 |
| L-alanina | 0,28 | 0,29 |
| L-valina (derivado di-TMS de 3) | 0,23 | 6.10 |
| L-leucina | 0,06 | 0,10 |
| Glicerol | 1,99 | 1,44 |
| L-isoleucina | 0,17 | 6.80 |
| 2-isopropil-5-metilfenol | 0,22 | 0,21 |
| Ácido butanedióico | 0,29 | 0,27 |
| Pirimidina | 0,11 | 8.13 |
| L-serina | 0,05 | 8.74 |
| L-treonina | 0,08 | 11.49 |
| L-prolina | 0,34 | 0,32 |
| Ácido 2,3,4-trihidroxibutírico | 0,14 | 0,08 |
| L-fenilalanina | 0,22 | 0,38 |

Cuadro 10 cont. Composición química de los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* (tipo), según el análisis por CG-EM. Tr

| Compuesto | Hojas y flores | Follaje |
|---|----------------|---------|
| Xilitol | 0,21 | 18.00 |
| Azúcar no identificada | 1,91 | 0,59 |
| D-fructosa | 18.25 | 7,35 |
| Isómero de D-fructosa | 3,70 | 18.30 |
| Isómero de D-fructosa | 2,96 | 18.41 |
| β-D-galactofuranosa | 9,57 | 18.60 |
| β-D-galactofuranosa | 0,19 | 18.88 |
| Isómero de azúcar no identificado | 2,85 | 0,78 |
| β-D-galactofuranosa | 0,86 | 0,77 |
| Azúcar no identificada | 1,11 | 19.27 |
| D-galactosa | 4,64 | 1,86 |
| D-manitol | 20.62 | 0,47 |
| Myo-inositol | 0,47 | 0,74 |
| Myo-inositol | 21.19 | 0,52 |
| Isómero de Myo-Inositol | 0,52 | 0,38 |
| Isómero de Myo-Inositol | 1,61 | 0,71 |
| D-glucosa | 21.78 | 5,09 |
| Ácido hexadecanóico | 1,92 | 22.08 |
| Ácido hexadecanóico | 0,43 | 1,20 |
| Lactato de catequilo | 0,61 | 0,50 |
| Inositol | 23.42 | 0,63 |
| Inositol | 0,63 | 0,21 |
| 3,4-dihidroxicinamate (ácido caféico) | 0,57 | 0,42 |
| Ácido 9,12-octadecadienóico | 0,15 | 25.00 |
| Ácido linoleico | 0,44 | 25.50 |
| Ácido octadecanóico | 0,49 | 29.20 |
| Azúcar no identificada | 0,33 | 31.07 |
| α-D-glucopiranosido | 4,59 | 1,27 |
| Azúcar no identificada | 31.41 | 0,94 |
| Azúcar no identificada | 0,94 | 31.97 |
| α-D-glucopiranosido | 1,53 | 0,77 |
| Isómero del azúcar que sale a 31.41 min | 1,03 | 32.28 |
| Isómero del azúcar que sale a 31.41 min | 1,03 | 32.73 |
| α-D-glucopiranosido | 5,15 | 1,59 |
| Isómero de α-D-glucopiranosido | 1,24 | 33.87 |
| β-D-glucopiranosida | 1,20 | 40.05 |
| 3,4-dihidroxicinamate (ácido caféico) isómero | 0,36 | 42.27 |
| 3,4-dihidroxicinamate (ácido caféico) isómero | 0,36 | 42.27 |
| 3,4-dihidroxicinamate (ácido caféico) isómero | 3,70 | 0,79 |
| Triterpeno | 24,01 | 58,10 |
| Triterpeno | 43.53 | 2,38 |
| No identificado | 2,38 | 4,56 |
| Isómero de triterpeno | 43.89 | 9,82 |
| Isómero de triterpeno | 9,82 | 9,43 |
| No identificado | 1,36 | 1,15 |

Como se puede apreciar el compuesto de mayor abundancia relativa en ambas materias primas se corresponde con una molécula de naturaleza triterpénica que no es identificada por la base de datos. Este resultado guarda relación con los resultados del tamizaje fitoquímico al dar positiva la reacción de Lieberman-Buchard. Los triterpenos son productos naturales de gran abundancia en la naturaleza a los que se les ha adjudicado una diversidad de efectos biológicos (41). Tal como se sospechaba por el tamizaje fitoquímico, también hay presencia de múltiples azúcares. Estos metabolitos se encuentran en la mayoría de los organismos vegetales y se consideran metabolitos primarios. De igual manera se identificaron ácidos grasos, algunos de los cuales, ácido 9,12-octadecadienóico, ácido linoleico y el ácido octadecanóico, solo se determinaron en el extracto de la planta entera.

Resalta la presencia de aminoácidos como la valina, alanina, leucina, isoleucina, serina, treonina, prolina y fenilalanina (Figura 13), la cual se sugirió anteriormente por la coloración morada que se observó en el ensayo cualitativo con ninhidrina. La presencia de estos aminoácidos, entre ellos 5 esenciales (valina, leucina, isoleucina, treonina y fenilalanina), le propiciaría un valor nutricional al follaje de la especie.

Valina Alanina Leucina Serina Isoleucina Treonina Fenilalanina Prolina Figura 13: Aminoácidos identificados en los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. Uno de los propósitos del estudio

era la búsqueda de compuestos fenólicos en estos extractos, debido a los resultados obtenidos con FeCl_3 , tanto a nivel de tubos de ensayos como en la CCD. Mediante la CG-EM se pudo determinar, compuestos como el 3,4-dihidroxycinamate (ácido caféico), isómeros del ácido caféico y el lactato de catequilo, los que se muestran en la figura 14.

Lactato de catequilo

Ácido cafeico

Figura 14: Compuestos fenólicos identificados en los extractos etanólicos de *Minthostachys mollis*. Los ácidos fenólicos como: cumárico, caféico y ferúlico, inhiben la actividad de agentes mutagénicos (70), estimulan la actividad de la enzima fenol sulfotransferasa implicada en la detoxificación de compuestos metabólicos potencialmente tóxico (71) y poseen actividad bactericida (72). 6. Análisis químico mediante espectrometría de masas por infusión directa

La espectrometría de masas (EM) es uno de los métodos físico-químicos que se aplican con mayor frecuencia en la determinación estructural de compuestos orgánicos. Su alta sensibilidad y las posibilidades de acoplarse a técnicas cromatográficas la ubican entre los métodos físico-químicos más apropiados para el estudio de productos naturales.

El análisis del extracto etanólico del follaje por espectrometría de masas se realizó tanto en modo positivo como negativo, en ambos casos se obtuvieron las correspondientes huellas dactilares. Del análisis correspondiente al espectro en modo negativo se pudo identificar la presencia de un glicósido de quercetina denominado quercetin-3-rutinósido o mejor conocido como rutina.

El espectro correspondiente al modo negativo (huella dactilar) se presenta en la figura 15

Figura 15: Espectro de masas por electronebulización en modo negativo del extracto etanólico

El espectro obtenido mostró varios iones fragmentos, siendo los de mayor intensidad los correspondientes a m/z 455 (100) y 456 (33). Además, se observó uno a un valor de m/z 609 (7) que, según la literatura consultada, se corresponde con la rutina (73).

Los espectros de masas obtenidos a partir del estudio EMn permitieron confirmar la presencia de este glicósido, tal como se describe a continuación. Los principales iones fragmentos resultantes del espectro hijo EM2 responden al siguiente esquema de fragmentación (Figura 16 y 17)

Figura 16: Espectro de masas EM2 en modo negativo del extracto etanólico.

Iones fragmentos m/z (% abundancia relativa) Yo^+ 301 (100) Z1^+ 463 (45) $[\text{M-OH}+2\text{H}]^+$ 591 (3)

Iones fragmentos m/z (% abundancia relativa) Yo^+ 301 (100) Z1^+ 463 (45) $[\text{M-OH}+2\text{H}]^+$ 591 (3)

Figura 17: Iones fragmentos (EM2) correspondiente a la rutina. Imagen tomada y modificada (73). Como se puede observar el pico base del espectro corresponde al aglicón resultante de la ruptura del enlace glicosídico, lo que origina el fragmento de m/z 301 (residuo de quercetina). Le continúa en intensidad el fragmento m/z resultante de la pérdida de la unidad de rhamnosa, m/z 463. Al aislar este último fragmento y someterlo nuevamente a la fragmentación molecular se obtiene el EM3 manteniéndose como pico base del espectro el ion m/z 301 (Figura 18), correspondiente al flavonol desprotonado. Figura 18: Espectro de masas EM3 en modo negativo del extracto etanólico. Finalmente, se continua fragmentando la molécula (EM4) para lograr iones de m/z 273 (13), 257 (8), 193 (9), 179 (100), 151 (49), 121 (7). El origen de estos fragmentos se observa en las figura 19

Iones fragmentos m/z (% abundancia relativa) $[\text{M-H-CO}]^-$ 273 (13) $[\text{M-H-CO}_2]^-$ 257 (8) $[\text{M-H-anillo B}]^-$ 193 (9) $1,2\text{A}^-$ 179 (100) $1,2\text{A}^--\text{CO}$ 151 (49) $1,2\text{B}^-$ 121 (7)

figura 19: Espectro de masas EM4 en modo negativo del extracto etanólico. Estos resultados se corresponden con lo informado por la literatura, sugiriéndose el esquema de fragmentación para el residuo de quercetina que se presenta en la figura 20 (74).

Figura 20:

Fragmentación sugerida para el residuo de quercetina [M-H]⁻, m/z 301.

Los flavonoides son pigmentos casi universales de plantas. Ellos son responsables de la coloración de flores, frutas, y a veces las hojas. Estos metabolitos se producen principalmente en las plantas como O-, C- glucósidos y agliconas libres (75).

Estudios realizados sobre el

efecto protector contra desordenes cutáneos asociados a la acumulación de melanina (77) pusieron de manifiesto que la rutina, seguida de la quercetina, se comportaban como los secuestradores más efectivos de radicales libres. Estos antecedentes podrían sugerir investigaciones futuras que permitan demostrar y diversificar los efectos terapéuticos del extracto etanólico de *Minthostachys mollis*.

Adicionalmente, se ha referido efecto hepatoprotector (76), 7.

DETERMINACIÓN FENOLES TOTALES POR FOLIN-CIOCALTEU

El contenido de fenoles totales de los extractos etanólico de *M. mollis*, se calculó a partir de la curva de calibración (Figura 21) obtenida para el ácido gálico,

la cual, luego del

análisis de regresión lineal, dio como resultado la siguiente ecuación: Absorbancia = $-0,935667 + 0,192967 \cdot \text{Concentración}$

Figura 21. Curva de calibración obtenida en el estudio de la capacidad antioxidante por el método de Folin Ciocalteu. La significación del modelo

se obtuvo

una $p < 0,05$ ($p=0.00$) y un R^2 de 99,9156. Como se puede observar el R^2 con un valor elevado, cercano a 100 por lo que la recta presenta un excelente ajuste, es decir, la ecuación refleja perfectamente la dependencia entre concentración y absorbancia. (

Anexo 4)

El contenido de fenoles totales fué de 40,88 mg/100mL para hojas y flores, mientras que fue menor para el follaje, con un valor de 32,23 mg/100mL, equivalentes a ácido gálico.

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos por este método y comparándolos con los logrados por CG-EM para dichos extractos, se llega a la conclusión de que los valores obtenidos no corresponden exclusivamente a compuestos fenólicos (no supera el 6 % en ambos extractos por CG-EM), sino que también pueden estar influidos por la presencia de aminoácidos, los que también fueron identificados por EM.

El reactivo de Folin-Ciocalteu no sólo mide los fenoles totales, sino que también puede reaccionar con cualquier sustancia reductora. En consecuencia, el reactivo

mide la capacidad reductora total de una muestra, no sólo el nivel de compuestos fenólicos.

Este reactivo

forma parte del ensayo de proteínas de Lowry, y también reaccionará con algunos compuestos que contienen nitrógeno (78).

Según los resultados se puede sugerir la posible actividad antioxidante que pudieran presentar estos extractos dado su poder reductor.

8. DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ETANÓLICOS

El propósito de este trabajo fue estudiar, además de la composición química, la actividad antimicrobiana de hojas-flores y follaje de *Minthostachys mollis*, frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*, con el fin de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta planta utilizada como medicina popular en el Ecuador. La Figura 22 muestra el resultado comparativo de los halos de inhibición correspondientes al aceite esencial de hojas y flores (grupo A) y del follaje (grupo B), frente a la cepa de *S. aureus*.(Anexo 5)

Figura 22. Halos de inhibición de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* tanto de hojas y flores (grupo A); follaje (grupo B) frente a *Staphylococcus aureus*. Como se puede apreciar los halos de inhibición del grupo A promediados dan un valor de 25 mm para hojas y flores mientras que para el follaje el valor promedio de dichos halos fue de 23 mm. Si se comparan con los obtenidos para el control negativo evidentemente ambos aceites esenciales presenta sensibilidad, según NCCLS 2000, contra la cepa objeto de estudio, pero a su vez resulta inferior al obtenido para el ciprofloxacino, antibiótico que posee actividad in vitro contra un amplio rango de microorganismos Gram (+) y Gram (-).

Los resultados a simple vista sugieren que el aceite esencial obtenido de las hojas y flores posee un mayor efecto contra las cepas de *S. aureus*. Este aceite se diferencia del obtenido a partir del follaje en los metabolitos mayoritarios, pues sus marcadores químicos son neomentol, pulegona y L-mentona.

Existen ensayos in vitro que han mostrado un efecto inhibidor significativo contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi*. Evidencias diversas sugieren que la trans-mentona, pulegona y D-germacreno, juegan un papel significativo en la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. mollis* (31). Diversos estudios realizados con el aceite esencial de esta especie han demostrado actividad contra diversos hongos como la *Candida albicans* (32), sugiriéndose que son los monoterpenos los responsables de dicha actividad. Estos estudios serán sugeridos para etapas posteriores de trabajo.

Además en los aceites esenciales los terpenos son los compuestos más abundantes, entre sesquiterpenos y monoterpenos. Los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios poseen un amplio espectro de actividad biológica, en particular antimicrobiana (79).

Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados "terpenoides". Por otro lado varios estudios han demostrado que los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos (80). Con una metodología similar a los anteriores se realizó la actividad antimicrobiana in-vitro de la planta en estudio. En la figura 23 se resumen los resultados obtenidos de los extractos fluidos (preparado en etanol al 96 %), procedente de dos materias primas hojas-flores y follaje de *M. mollis* a las cuales denominamos grupo C y D respectivamente.(Anexo 6) Como se observa en esta ocasión los halos de inhibición del grupo A promediados dan un valor de 23 mm para hojas y flores mientras que para el follaje el valor promedio de dichos halos fue de 20 mm, resultado este

último que, según metodología del NCCLS, 2000 (63), se considera como un valor medio. De manera similar al estudio anterior, el control negativo no mostró ninguna actividad y el control positivo resultó ser el más efectivo.

Figura 23. Halos de inhibición de extractos etanólicos de *Minthostachys mollis* tanto de hojas y flores (GRUPO C); follaje (GRUPO D) frente a *Staphylococcus aureus*. El componente mayoritario de estos extractos es un compuesto triterpénico de estructura desconocida, el cual se presenta en mayor concentración en el tallo. Adicionalmente, no se descarta que, la presencia de compuestos fenólicos, puedan también hacer un efecto sinérgico en la actividad antibacteriana. Estudios han demostrado que los compuestos fenólicos provenientes de diferentes plantas tienen impacto sobre la resistencia de las membranas microbianas interfiriendo en el metabolismo microbiano, entre otros posibles modos de acción, que retardan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (81,82,83).

Los resultados antimicrobianos obtenidos en este estudio *in vitro* para los extractos son ligeramente inferiores a los obtenidos para el aceite esencial. Son extractos químicamente diferentes pero sugerentes ambos desde el punto de vista biológico. No obstante, aunque es un buen punto de partida, estos estudios deben considerarse como preliminares pues se precisan otros para determinar la CMI en ambos casos.

Los estudios realizados contribuyen a validar el uso tradicional de una especie que crece en nuestro país y que la población utiliza con diversos fines medicinales, sobre todo para las vías respiratorias y digestivas (32). La búsqueda y caracterización de componentes bioactivos de vegetales así como la investigación de sus propiedades farmacológicas son de crucial importancia en la industria farmacéutica para el desarrollo racional de fármacos inocuos y efectivos para el tratamiento y la prevención de enfermedades.

La correcta dosificación de fármacos derivados de fitoquímicos es de crucial relevancia para asegurar un tratamiento óptimo que beneficie la salud y evite efectos colaterales derivados de su potencial actividad.

La demostración de actividad antibacteriana que puede ejercer una planta corresponde a un estudio base que nos brinde información

sobre para la búsqueda de para el

diseño de un fitofármaco, dicha optimización de principios activos conlleva un uso racional de los productos elaborados a base de materias primas naturales, evaluando además posibles resistencias bacterianas.

CONCLUSIONES

- Se efectuó la recolección, identificación taxonómica y procesamiento de la droga vegetal (hojas y flores; follaje), obteniéndose materias primas de adecuada calidad para los estudios fitoquímicos correspondientes.
- El tamizaje fitoquímico en extractos etéreos, etanólicos y acuosos, sugirió la presencia de aceites y grasas, triterpenos – esteroides, compuestos fenólicos, azúcares reductores, saponinas, aminoácidos y flavonoides.
- Se obtuvo el aceite esencial por el método de hidrodestilación con un rendimiento de 0,41 % para hojas y flores y de 0,21 % para el follaje.
- Se elaboraron, por maceración, extractos etanólicos de ambas materias primas (hojas y flores; follaje), estandarizándose mediante algunos parámetros físico-químicos como pH; índice de refracción, densidad relativa, sólidos totales.

- El análisis por CCD de los aceites esenciales y de ambos extractos etanólicos, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo (7:3) y cloroformo:metanol (9:1), revelando con luz UV y FeCl₃, sugirió la presencia de compuestos con grupos cromóforos conjugados y de estructuras fenólicas.
- El estudio por CG-EM de ambos aceites permitió la identificación de metabolitos, fundamentalmente, del tipo hidrocarburos monoterpénicos, resultando los componentes mayoritarios en las hojas y flores el neomentol (32,34%), pulegona (28,42%) y mentona (19,32%); mientras que en el follaje predominan el geraniol (24,93%) y el citronelol (14,84%).
- El análisis por CG-EM de los extractos despigmentados demostró la presencia de azúcares, aminoácidos (valina, alanina, leucina, isoleucina, serina, treonina, prolina, fenilalanina), compuestos fenólicos (ácido caféico, isómeros del ácido caféico, lactato de catequilo) y un triterpeno, siendo este último el compuesto mayoritario.
- Se obtuvo el fingerprint de los extractos etanólicos mediante espectrometría de masas por infusión directa, identificándose la presencia de rutina.
- El ensayo de Folin-Ciocalteu demostró la existencia de compuestos fenólicos y/o de metabolitos con capacidad reductora en general, lo que sugiere la posible actividad antioxidante para dichos extractos.
- La actividad antibacteriana se realizó tanto de los aceites y extractos, frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, obteniendo un halo de inhibición mayor a 21mm, mostrando sensibilidad, lo cual fundamenta que tiene actividad biológica frente a afecciones causadas por esta bacteria.

RECOMENDACIONES

- Para la obtención del aceite esencial, se debe tener en cuenta dos parámetros importantes la edad de la planta y la época de recolección ya que estos pueden variar en el rendimiento del aceite y la composición química de la planta vegetal.
- Realizar el control de calidad de la droga cruda.
- Realizar un estudio de dinámica de acumulación para lograr rendimientos de aceite esencial superiores, a partir de las partes aéreas de la especie *Minthostachys mollis* que crece en Quito.
- Realizar un estudio fitoquímico más profundo del extracto etanólico de las partes aéreas de *Minthostachys mollis*.
- Evaluar el potencial como antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la especie.
- Realizar los estudios de toxicidad correspondientes al extracto y fundamentalmente al aceite esencial, ya que por su composición química puede presentar un cierto grado de toxicidad, al momento de realizar una preparación farmacéutica.
- Para la actividad antimicrobiana se recomienda realizar otros estudios, con cepas diferentes a la estudiada, para ver si cumple su acción antimicrobiana al igual que sucedió con la cepa *Staphylococcus aureus*.
- Encontrar la CIM (concentración mínima inhibitoria) ya que una planta que posee actividad antimicrobiana es necesario realizar ensayos donde se demuestre a qué concentraciones se produce dicha actividad y escoger así la que represente menor uso de principio activo.

BIBLIOGRAFÍA 1. Tres J.C.. Interacción entre fármacos y plantas medicinales. Anales Sis San Navarra [revista en la Internet]. 2006 Ago [citado 2015 Ago 23] ; 29(2): 233-252.

2. Abu-Irmaileh B.E., Afifi F.U. Herbal Medicine in Jordan with special Emphasis on commonly used herbs. *J. of Ethnopharmacology*. 2003; 89, 193-197.

3. Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillon S.S. 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Rev J. of Ethnopharm*. 88: 19-44.

4. Katewa S., Chaudhry B., Jain A. Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. of Ethnopharm*. 2004; 92: 41-46.

5. Guarrera P., Forti G., Marignoli S. Ethnobotanical and etnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J. of Ethnopharm*. 2005; 96:429-444

6. Gupta M., Solís P., Calderón A., Guinneau-Sinclair F., Correa M., Galdames C., Guerra C., Espinosa A., Alvenda G., Robles G., Ocampo R. Ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. *J. of Ethnopharmacology*. 2005; 96:389-40

7. Estomba D., Ladio A., Lozada A. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from north-western Patagonia. *J. of Ethnopharm*. 2006; 103: 109-119.

8. De Natale A., Pollio A. Plants species in the Folk Medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *J. of Ethnopharm*. 2007: 295-303..

9. Bermúdez A., Oliveira-Miranda M., Velázquez D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 2005; 30(8): 453-459.

10. Annan, Kofi y Peter J. Houghton.

Antibacterial, Antioxidant and Fibroblast Growth Stimulation of Aqueous Extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., Wound-healing Plants of Ghana.

J. of Ethnopharm. 2008(119):141-144.

11. Galindo A., Lopez S., Gualdrón R. Estudio Fitoquímico Preliminar y Letalidad sobre *Artemia salina* de Plantas Colombianas. *Departamento de Farmacia*. 1997; 26(15):19-15.

12. Schmidt-Lebuhn A. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *J. of Ethnopharmacology*. 2008; 118:343-353

13.

Malagon O., Iglesias J., Vila R., Cañigueral S., Zaragoza T., Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragr. J.* 2003; 18: 527-531

14.

Zygadlo JA, Maestría DM, Lamarque AI et al. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1996; 24: 319-323.

15.

Martínez A., Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia. Colombia (Medellín). 2003 [Internet]. [citado 06 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>

16.

Muñoz F, *Plantas Medicinales y Aromaticas*, 1ª. Ed., Aedos, España 1987, p.15

17. Pino J., Ariel A., Ortega L., Rosado A., Rodríguez M., Baluja J. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. *Rev Cubana Farm* 1997;30(1)
- 18.
- Bandoni, A. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.
- Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata - Argentina.2000.
- 19.
- Grisebach, Tropico. *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. *Missouri Botanical Garden*.1874.1-38:1838 (41-1892)
20. Orfila E., Farina E.,Laminaceae Barnh. Flora del valle de Lerma. Universidad Nacional de salta. Argentina (Buenos Aires).1997.Aportes botánicos de salta. Herbario MCNS; p.1 21. Epling, C. Synopsis of the South American Labiatae. II. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*. Beihefte. 1936; 85, 97–192.
22. Schmidt-Lebuhn, A.N. Revision of the genus *Minthostachys* (Labiatae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 2008
- b; 98, 1–77
- 23.
- Epling, C. Synopsis of the South American Labiatae. *Feddes Repertorium*. 1935-1937; 85:1-341
24. Epling, C. The Labiatae of northern South America: Colombia, Ecuador and Venezuela. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*. 1937; 95: 1- 144.
- 25.
- Inga B., Guerra M. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
26. Barboza G.,Cantero C., Núñez L., Espinar A. Flora medicinal de la provincia de Córdoba. Pteridófitas y Antofitas silvestres o naturalizadas. Museo Botánico de Córdoba. Córdoba, Argentina.2006.1252 pp.
27. Pontiroli A., 1993. Labiatae. En: A.L.Cabrera (ed), Flora de la Provincia de Jujuy, Colecc. Científica Inst. Nac. Tecnol. Agrop. 13(9). Buenos Aires, 560 pp.
28. Banchio E., Zygadlo J.,Valladares G. Effects of Mechanical Wounding on Essential Oil Composition and Emission of Volatiles FROM *Minthostachys mollis*. *J. of Chemical Ecology* .2005; 31(4).
29. Pellegrini M., Alvarez M., Ponce A., Cugnata N., De Pianoa F., Fuselli S. Anti-quorum sensing and antimicrobial activity of aromatic species from South America. *Journal of Essential Oil Research*, 2014. Vol. 26, No. 6, 458–465.
30. Olivero J., Gonzalez T., Guete J., Jaramillo B., Stashenko E. Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Rev. bras. farmacogn.* vol.20 no.4 Curitiba Aug./Sept. 2010

31. Mora F., Araque M., Rojas L., Ramírez L., Silvia B. Usubillaga A. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. *Nat. Prod. Commun.* 2009; 4(7):997-1000.
32. Cano C., Bonilla P., Roque M., Ruiz J.
Actividad Antimicótica In Vitro y Metabolitos Del Aceite Esencial De Las Hojas De *Minthostachys mollis* (MUÑA).
Perú Med Exp Salud Publica. 2008; 25(3):298-301.
33. Alkire B., Tucker A., Maciarello M. Tipo, *Minthostachys mollis*(LAMIACEAE) an Ecuadorian Mint. *Economic Botany* .1994;48(1):60-64
34. Hammond G., Fernández I., Villegas L., Viasberg A. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J. of Ethnopharmacology.* 1988; 61:17-30.
35. White, A. 1985. *Herbs of Ecuador.* Ediciones Libri Mundi, Quito, Ecuador
36. Carvajal G, Thilly W. Mutagenic activity of *Minthostachys mollis* in AHH1 lymphoblast cells. *Plant Foods for Human Nutrition.* 1988;38: 105–114. .
37. Alonso J., Desmarchelier C. *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.* Editorial Fitociencia. Buenos Aires. 2006:663.
38. Alcalá M., Alvarado A., Paredes A., Huayane E. Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de las Hojas de *Minthostachys Mollis* (Muña) Comparado con el Fluconazol en Cultivo de *Candida albicans*. *Cimel.* 2011; 16(2):83-86
39. Gillij Y., Gleiser R., Zygadlo J. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology.* 2008;99: 2507–2515.
40. Bruneton J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants.* Intercept Ltd., Andove, United Kingdom. 1995
41.
Bruneton J. *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales. Segunda Edición.* Editorial Acribia S.A. España. 2003
42.
Miranda M., Cuellar. *Manual de Practicas de Laboratorio Farmacognosia y Productos Naturales.* Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2001
43.
Evans, W.C. *Farmacognosia Trease y Evans. 13ra. Edición Interamericana,* McGraw-Hill, México D.F., (1991).
44.
Bruneton. *Farmacognosia, fotoquímica, plantas medicinales.* Editorial Acribia 1ª Edición. 2011
45. Wankat, P.C. 1988. Equilibrium Staged Separations. *Separations in Chemical yield chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*.* *Food Chemistry.* 99:19-23

46. Ortuño M. Manual práctico de aceites esenciales de aromas, y perfumes. 1ª ed. Aiyala. 2006
47. Bruneton, J. Farmacognosia, fotoquímica, plantas medicinales. Editorial Acribia 2ª Edición. 2001
48. Humboldt A.,
Biocomercio sostenible. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos. Bogotá, Colombia. 2003. p 109.
49. Bolaños B.P. Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de frutas producidos industrialmente disponibles para su consumo en el área metropolitana de la Ciudad de Guatemala. [Tesis en Licenciado en Química Biológica]: Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2003.
50. Martínez J.B. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helicarpus terebinthinaceus*. Tesis en opción al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca, México. 2007
51. Roginsky V. y Lissi E.A. (2005).
Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, 235-254. 2005.
52.
Brack A, Heinz P. Perú Maravilloso. Edit. Epenza. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima, 2002.
53. Fuertes C., Murguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb "muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación.* 2001;4(1): 23-39.
54. Bergonzelle E, Donnicola D, Porta N, Cortéis-Theulaz E. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *J. Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(10): 3240-6
55. Carhuapoma M., López S., Roque M., Vela B., Bell C., Whu D. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* griseb "Ruyaq Muña". *Ciencia e investigación.* 2009; 12(2): 83-89
56. L. Barry, D. Amsterdam, M. B. Coyle, E. H. Thornsberry, H. R. W, "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." *J. Clin. Microbiology.*, Vol. 10, pp. 910, 1979.
57. Comité S. "L'Antibiogramme de la Société Franc, De Microbiologie.", "Technical recommendations for in vitro susceptibility testing", *Clin. Microbiol Infect.*, Vol. 2, S11, 1996.
58. National Committee for Clinical Laboratory "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., Vol. 17(1), 1997.
59. National, for, Clinical, Laboratory, Standards., Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico. (1998), pp. 7.18-7.21.

60. D. M. Hacek, D. C. Dressel, L. R. Peterson, "Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macro-dilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37(6), pp. 1881, 1999.
61. Rincón C., Castaño C., Ríos E. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Rev Cubana Plant Med* vol.17 no.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2012
62. Hernández L., Gonzales A., Gutiérrez N., Muñoz L., Quintero A.
Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos.
*Rev. Mex.*2011;10, (3): 455-463.
63. Cona E., Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar, *Rev. chil. infectol.* v.19 supl.2 Santiago 2002.
64. Buzzini P, Pieroni A. Antimicrobial activity of extracts of *Clematis vitalba* towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms. *Fitoterapia*.2003;74: 397 – 400
65. Morais L., Do Carmo G., Viegas E., Teixeira D., Barreto A., Pizarro A., Gilbert B. Evaluation of antimicrobial activity of extracts of medicinal plants on three tomato phytopathogens. *ISHR Acta Horticulturae. Acta Horticulturae*.2002; 569: 87-90
66. Silva D, Denham E, Faleiro L, Miguel G, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antimicrobial activity of the essential oils of *Dittrichia viscosa* subsp *viscosa* on *Helicobacter pylori*. *Rev Traditional Medicine and Nutraceuticals* 2002; 8(1):680
67. Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Cap.11.2000
68. Rojas Lb., Velasco J., Díaz T., Gil Otaiza R., Carmona J., Usubillaga A..
Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinaros.
Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2010:956-62. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85612108007>. Fecha de consulta: 25 de octubre de 2015.
69. Ruffinengo S., Eguaras M., Floris I., Faverin C., Bailac P., Ponzi M. DL50 y repelentes efectos de los aceites esenciales de las especies de plantas silvestres argentinas sobre *Varroa destructor*. *J Econ Entomol.* 2005 Jun; 98 (3): 651-5.
70.
Krizkova L., Nagy M., Polonyi J., Dobias J., Belicova A., Grancai D., Krajcovic J.
Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutation Research*.2000; 469 (1): 107-104
71. Yeh C., Yen G. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J. of Agricult. And Food Chemistry*.2003; 51(5): 1474-1479.

72. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. of Applied Microbiol.* 2001; 90 (4): 494-507.
73. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry.* 2000;54, 237-256
- 74.
- Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2001;12, 707–715
- 75.
- Bruneton, J. *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes medicinales*, 3rd ed.; Tec & Doc: Paris, 1999; p 310.
76. Pin-Ho P., Shih-Yi L., Ya-Yu W., Wen-Ying C., Yu-Han C., Chih-Cheng W., Chun-Jung C.. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 2014(73); 106-116
77. Junsei T., Eito T., Masatsugu U., Natsuko O., Wakana O., Takayuki O. The leaf extract of *Mallotus japonicus* and its major active constituent, rutin, suppressed on melanin production in murine B16F1 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5(10): 819–823
78. Ikawa M., Schaper T., Dollard C., Sasner J.
- Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds». *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(7): 1811–5.
- 79.
- Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol.* 1999;12:564-82
80. Shane Griffin. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. *Physic Bulletin.* 1979; 30: 262.
81. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* 2007; 21:308-323.
82. Nychas G., "Natural antimicrobials from plant" En: Gould G.W (ed.) *New methods of food preservation.* Black Academic and Professional. Glasglow. Pp:59-89, 1995
83. Kabara J., "Medium-chain fatty acids and esters" En: Davidson P.M, J.N Sofos, and A.L Branen (eds.) *Antimicrobials in food.* Marcel Dekker. New York. pp. 327-360, 2005
- ANEXOS Anexo 1 Lista de especies y subespecies aceptados en *Minthostachys* en la reciente revisión taxonómica (5), con la sinonimia y su distribución. Nombre aceptado Sinonimia Distribución
Minthostachys andina (Britt. Ex Rusby) Epling *Bystropogon andinus* Britt. Ex Rusby Bolivia: Sorata
Minthostachys dimorpha Schmidt-Leb Perú: Machu picchu *Minthostachys fusca* Schmidt-Leb Bolivia: Tipuani valley *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling *Xenopoma verticillatum* Griseb.; *Bystropogon kuntzeanus* Briq.; *Minthostachys verticillata* var. *eupatorioides* Epling Northwestern and central Argentina *Minthostachys elongate* Schmidt-Leb Bolivia: Tarija Ecuador: Loja
Minthostachys glabrescens (Beth) Epling *Bystropogon glabrescens* Benth Southern Peru
Minthostachys salicifolia Epling Alean slopes oof southern Peru *Minthostachys latifolia* Schmidt-

Leb western Bolivia *Minthostachys septentrionalis* Schmidt-Leb Venezuela, Colombia
Minthostachys setosa *Bystropogon setosus* Briq.; *Bystropogon setosus* var. *Menthiodorus* Kuntze;
Bystropogon setosus var. *Citronella* Kuntze Central Bolivia *Minthostachys diffusa* Epling Bolivia:
 Yungas *Minthostachys spicata* (Beth)Epling *Bystropogon spicatus* Benth Coastal cordillera of Peru
 and southernmost, Ecuador *Minthostachys acris* Scmidt-Leb *Minthostachys glabrescens* auct.,
 non (Benth) Epling quoad typum Peru: southern highlands *Minthostachys acutifolia* Epling
Minthostachys ovatta (Briq.) Epling *Byatropogon ovatus* Briq.; *Bystropogon andinus* var.
hypoleucus Briq. Bolivia: La Paz Central Bolivia *Minthostachys rubra* Schmidt-Leb Ecuador: Carchi
Minthostachys mollis(HBK) Griseb *Bystropogon mollis* HBK; *Mentha mollis* (HBK) Benth.:
Bystropogon canus Benth.: *Bystropogon pavonianus* Benth.: *Bystropogon tomentosus* Benth.:
Minthostachys tomentosa (Benth.) Epling Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Bolivia
Minthostachys mollis var. *mollis* *Bystropogon mollis* HBK; *Mentha mollis*(HBK) Benth.: *Bystropogon*
canus Benth.: *Bystropogon pavonianus* Benth.: *Bystropogon tomentosus* Benth.: *MInthostachys*
tomentosa (Benth.) Epling Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru *Minthostachys mollis* var. *hybrid*
 Schmidt-Leb Venezuela, Colombia *Minthostachys mollis* var. *mandoniana* (Briq.) Schmidt-Leb
Bystropogon madonianus Briq.: *Minthostachys mandoniana* (Briq.) Epling Southern Peru, western
 Bolivia

Anexo 2 Certificado de la identificación taxonomica de la especie vegetal en estudio, en el Herbario
 Alfredo Paredes (QAP) de la Universidad Central de Ecuador. Anexo 3 Despigmentación del
 extracto por micro columna, previo al análisis por espectrometría de masas por infusión directa

Anexo 4 Análisis de regresión lineal para la curva de calibración del método Folin Ciocalteu

Regression Analysis – Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Col_1 Independent variable: Col_2 Standard T Parameter Estimate Error
 Statistic P-Value Intercept -0,0935667 0,00515809 -18,1398 0,0000 Slope 0,0192967 0,000155522
 124,077 0,0000 Analysis of Variance Source Sum of Squares Df Mean Square F-Ratio P-Value
 Model 1,11708 1 1,11708 15394,99 0,0000 Residual 0,0009433 13 0,0000725615 Total (Corr.)
 1,11803 14 Correlation Coefficient = 0,999578 R-squared = 99,9156 percent R-squared (adjusted
 for d.f.) = 99,9091 percent Standard Error of Est. = 0,00851831 Mean absolute error = 0,00625778
 Durbin-Watson statistic = 1,82763 (P=0,2503) Lag 1 residual autocorrelation = 0,0189924

Anexo 5 Resultados de los halos de inhibición de los aceites de hojas y flores; follaje y los controles
 positivo y negativo.

Anexo 6 Resultados de los halos de inhibición de los extractos de hojas y flores; follaje y los
 controles positivo y negativo.

I 10

[Metadata removed]

Hit and source - focused comparison, Side by Side:

Left side: As student entered the text in the submitted document.

Right side: As the text appears in the source.
