



## **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA**

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

### **TRABAJO DE TITULACIÓN**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACEUTICA**

#### **TEMA:**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO Y LETAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MASTRANTE (*Ageratum conyzoides*), GUABIDUCA (*Piper carpunya*), AJENJO (*Artemisia absinthium*) Y CEDRÓN (*Lippia citriodora*), CULTIVADOS EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR.**

#### **AUTORA:**

Priscilla Valeria Valverde Balladares

#### **TUTOR:**

Haydelba D'Armas, MSc., PhD

**MACHALA – EL ORO – ECUADOR**

2015

## CERTIFICACIÓN

Dra. Haydelba D'Armas, PhD, Prometeo de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, tutor del presente trabajo de titulación con tema "**COMPOSICIÓN QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO Y LETAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MASTRANTE (*Ageratum conyzoides*), GUABIDUCA (*Piper carpunya*), AJENJO (*Artemisia absinthium*) Y CEDRÓN (*Lippia citriodora*), CULTIVADOS EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR**", desarrollado por PRISCILLA VALERIA VALVERDE BALLADARES, certifico que el presente trabajo investigativo fue desarrollado por el autor en forma sistemática y de acuerdo con las normas establecidas para proyectos de investigación ya que revisando su contenido y forma autorizo su presentación.

Machala, 06 de Abril del 2015



.....  
Dra. Haydelba D'Armas, MSc., PhD

Pasaporte: 046083704

## RESPONSABILIDAD

Yo, **PRISCILLA VALERIA VALVERDE BALLADARES**, autora del siguiente Trabajo de Titulación “**COMPOSICIÓN QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO Y LETAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MASTRANTE (*Ageratum conyzoides*), GUABIDUCA (*Piper carpunya*), AJENJO (*Artemisia absinthium*) Y CEDRÓN (*Lippia citriodora*), CULTIVADOS EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR**”, declaro que la investigación, resultados y conclusiones expuestas en el presente trabajo, son de mi absoluta responsabilidad.

.....  
**PRISCILLA VALERIA VALVERDE BALLADARES**  
**AUTOR**

## CESIÓN DE DERECHO DE AUTORÍA

Yo, **PRISCILLA VALERIA VALVERDE BALLADARES**, con cédula de identidad **0706423290**, egresada de la escuela de Bioquímica y Farmacia, de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala, responsable del presente trabajo de titulación con tema “**COMPOSICIÓN QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO Y LETAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*), MASTRANTE (*Ageratum conyzoides*), GUABIDUCA (*Piper carpunya*), AJENJO (*Artemisia absinthium*) Y CEDRÓN (*Lippia citriodora*), CULTIVADOS EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR**”, Durante los meses de AGOSTO del 2014 hasta ABRIL del 2015, certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones del presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría, una vez que ha sido aprobado por mi tribunal de sustentación del trabajo de titulación autorizando su presentación.

Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de autor a la Universidad Técnica de Machala para que ella proceda a darle el uso que crea conveniente.

.....  
**PRISCILLA VALERIA VALVERDE BALLADARES**

**C.I. 0706423290**

## DEDICATORIA

A mis padres, Gunter Valverde y Martha Balladares, por darme la vida y apoyo incondicional.

Mis tres grandes amores, María José, Evita Tatiana y José Antonio.

Mi abuela y mi tía, María Silvestre y Vielca Balladares, por ser mis amigas y ser un pilar fundamental en mí.

Mi gran amigo Denis Abarca, por ser un pilar fundamental en mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo, merece expresar un profundo agradecimiento, a todas las personas que de alguna forma son parte de su culminación, quienes con su apoyo, comprensión y ayuda me alentaron a culminarlo. Mi agradecimiento va dirigido especialmente a mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente día tras día; a mis docentes, quienes han impartido sus conocimientos, para formarme como una profesional, a mi estimada Dra. Carmita Jaramillo que supo brindarme su confianza y apoyo para poder realizar mi trabajo y a mi querida tutora Dra. Haydelba D'Armas, MSc., PhD, quien supo creer en mi capacidad y siempre orientarme sin interés alguno, para culminar con éxito esta investigación.

Priscilla Valeria Valverde Balladares.

**LA AUTORA**

## ÍNDICE

CERTIFICACIÓN	II
RESPONSABILIDAD	III
CESIÓN DE DERECHO DE AUTORÍA	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA	2
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL:	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	4
HIPOTESIS	4
1. MARCO TEÓRICO	5
ESPECIES DE PLANTAS	5
1.1.1. HIERBA LUISA ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	5
1.1.1.1. Propiedades y aplicación	5
1.1.2. MASTRANTE ( <i>Ageratum conyzoides</i> )	5
1.1.2.1. Propiedades y Aplicación	6
1.1.3. GUABIDUCA ( <i>Piper carpunya</i> )	6
1.1.3.1. Propiedades y aplicaciones.	6
1.1.4. AJENJO ( <i>Artemisia absinthium</i> )	6
1.1.4.1. Propiedades y aplicaciones	7
1.1.5. CEDRÓN ( <i>Lippia citriodora</i> )	7
1.1.5.1. Propiedades y aplicaciones	7
1.2. ACEITE ESENCIAL	7
1.2.1. Definición	7
1.2.2. Localización	8
1.2.3. Extracción	8
1.3. CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTOFOTOMETRIA DE MASAS	8
Fuente: Departamento de Química de la Universidad de Alberta.	9
1.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	10
1.4.1. Cepas Bacterianas	10
1.4.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	11

2.1.4.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	12
1.4.2. Cepas fúngicas	13
1.4.2.1. <i>Cándida albicans</i>	13
1.5. ACTIVIDAD LETAL	13
1.6.2. Bioensayo de <i>Artemia salina</i>	13
2.5.2. <i>Artemia salina</i>	14
2.5.2.1. Generalidades	14
2.5.2.2. Características Morfológicas	14
2.6. MEDICAMENTOS USADOS COMO PATRONES	15
2.6.1. CIPROFLOXACINA	15
2.6.1.1. Espectro bacteriano	15
2.6.1.2. Farmacocinética	16
2.6.2. KETOCONAZOL	16
2.6.2.1. Farmacocinética	17
3. METODOLÓGIA	18
3.1. Localización de la Investigación	18
3.2. Universo de trabajo	18
3.3. Tipo de muestra	18
3.4. Materiales	18
3.4.1. Materiales de laboratorio	18
3.4.2. Otros materiales	19
3.4.3. Equipos	19
3.4.4. Sustancias	19
3.4.5. Material biológico	20
3.5. MÉTODOS	20
3.5.1. Tipo de Investigación	20
3.5.2. Selección de las muestras	20
3.5.3. Procesamiento del material vegetal	20
3.5.4. Obtención de los aceites esenciales	20
3.5.5. Composición Química	21
3.5.5.1. Técnica	21
3.5.6. Actividad antimicrobiana	22
3.5.6.1. Actividad bacteriana	22
3.5.6.2. Actividad antifúngica	22
3.5.7. Actividad tóxica o letal	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24

4.1.	OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES _____	24
4.2.	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM): _____	25
4.3.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA _____	32
4.4.	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA _____	34
4.5.	ENSAYO DE LETALIDAD O TOXICIDAD CONTRA <i>Artemia salina</i> _____	35
5.	CONCLUSIONES _____	40
6.	RECOMENDACIONES _____	41
7.	BIBLIOGRAFÍA _____	42
	ANEXOS _____	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS. ....	9
<b>FIGURA 2.</b> IMAGEN DE <i>S. AUREUS</i> .....	10
<b>FIGURA 3:</b> IMAGEN DE <i>E. COLI</i> .....	11
<b>FIGURA 4.</b> IMAGEN DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	12
<b>FIGURA 5.</b> TAXONOMÍA DE <i>CÁNDIDA ALBICANS</i> .....	13
<b>FIGURA 6.</b> IMAGEN DE <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	15
<b>FIGURA 7:</b> EQUIPO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES .....	21
<b>FIGURA 8.</b> CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA ( <i>C. CITRATUS</i> ).....	25
<b>FIGURA 9:</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES EN LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE <i>C. CITRATUS</i> . ....	26
<b>FIGURA 10.-</b> CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CONYZOIDES</i> ....	26
<b>FIGURA 11.-</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE COMPUESTOS DE MÁS ABUNDANTES EN LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE <i>A. CONYZOIDES</i> . ....	27
<b>FIGURA 12.-</b> CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. CARPUNYA</i> .....	28
<b>FIGURA 13.-</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES EN LOS ACEITES.....	29
<b>FIGURA 14.-</b> CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. ABSINTHIUM</i> ....	29
<b>FIGURA 15.-</b> ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>A. ABSINTHIUM</i> . ....	30
<b>FIGURA 16.-</b> CROMTOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>L. CITRIODORA</i> .....	30
<b>FIGURA 17.-</b> ESTRUCTURA QUIMICA DE COMPUESTOS MÁS ABUNDANTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE <i>L. CITRIODORA</i> . ....	31
<b>FIGURA 18.-</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES ESTUDIADOS ANTE LA <i>S. AUREUS</i> . ....	32
<b>FIGURA 19.-</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES ESTUDIADOS ANTE LA <i>P. AERUGINOSA</i> ....	32
<b>FIGURA 20.-</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES ESTUDIADOS ANTE LA <i>E. COLI</i> . ....	33
<b>FIGURA 21.-</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES ESTUDIADOS ANTE LA <i>C. ALBICANS</i> .....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.-</b> RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS ACEITES OBTENIDOS.....	24
<b>TABLA 2.-</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>C. CITRATUS</i> .....	25
<b>TABLA 3.-</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ( <i>A. CONYZOIDES</i> ) .....	27
<b>TABLA 4.-</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. CARPUNYA</i> .....	28
<b>TABLA 5.-</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. ABSINTHIUM</i> . .....	29
<b>TABLA 6.-</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>L. CITRIODORA</i> .....	31
<b>TABLA 7.-</b> PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>C. CITRATUS</i> CONTRA <i>A. SALINA</i> .....	35
<b>TABLA 8.-</b> PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CONYZOIDES</i> CONTRA <i>A. SALINA</i> .....	35
<b>TABLA 9.-</b> PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. CARPUNYA</i> CONTRA <i>A. SALINA</i> .....	36
<b>TABLA 10.-</b> PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. ABSINTHIUM</i> . CONTRA <i>A. SALINA</i> .....	36
<b>TABLA 11.-</b> PORCENTAJE DE MORTALIDAD POR EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>L. CITRIODORA</i> . CONTRA <i>A. SALINA</i> .....	36
<b>TABLA 12.-</b> CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>C. CITRATUS</i> . .....	37
<b>TABLA 13.-</b> CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CONYZOIDES</i> .....	37
<b>TABLA 14.-</b> CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. CARPUNYA</i> .....	37
<b>TABLA 15.-</b> CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. ABSINTHIUM</i> . .....	38
<b>TABLA 16.-</b> CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>L. CITRIODORA</i> .....	38

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**HD:** Hidrodestilación.

**TR:** Tiempo de retención.

**CG/EM:** cromatografía de gases-espectrometría de masas

**CL<sub>50</sub>:** concentración letal media

**IE:** Impacto con electrones

## RESUMEN

Se evaluaron y compararon de acuerdo al rendimiento, composición química y actividad biológica, los aceites esenciales de hierba luisa (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*), guabiduca (*P. carpunya*), ajeno (*A. absinthium*) y cedrón (*L. citriodora*), obtenidos mediante hidrodestilación (HD). Los aceites esenciales obtenidos por HD, presentaron un olor intenso y penetrante. Su rendimiento fue: hojas de hierba luisa, 0,2459%; hojas de mastrante, 0,0424%; hojas de guabiduca, 0,0482%; hojas de ajeno, 0,0327 % y hojas de cedrón, 0,0223%. La caracterización de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada-espectrometría de masas (CG/EM) mostró que dichos aceites poseen una gran variedad de metabolitos secundarios volátiles constituyentes, cuya composición química varía en cada planta. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales fue evaluada frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, obteniéndose halos inhibitorios variables para cada especie, presentando estos cinco tipos de aceites esenciales actividad antimicrobiana contra las cepas mencionadas. La actividad antifúngica de los aceites esenciales fue evaluada frente a cepas de *Candida albicans*, obteniéndose halos de inhibición variables para cada especie, presentando estos cinco tipos de aceites esenciales, bioactividad contra *C. albicans*. La actividad letal de dichas esencias fue evaluada frente a nauplios de *Artemia salina*, presentando letalidad contra *A. salina* en un 100%, solo las soluciones de todos los aceites esenciales ensayados a concentraciones de 1000 y 100 µg/ml. Se obtuvieron concentraciones letales medias (CL<sub>50</sub>) muy significativas para *C. citratus*, *A. conyzoides*, *A. absinthium* y *L. citriodora* (31,62 µg/ml, 31,57 µg/ml, 31,76 µg/ml y 31,42µg/ml, respectivamente, y toxicidad significativa para *P. carpunya* (CL<sub>50</sub>= 523,80 µg/ml).

**Palabras Claves:** aceites esenciales, hierba luisa (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*), guabiduca (*P. carpunya*), ajeno (*A. absinthium*) y cedrón (*L. citriodora*), hidrodestilación.

## ABSTRACT

They were evaluated and compared according to yield, chemical composition and biological activity of essential oils of lemongrass (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*) guabiduca (*P. carpunya*), wormwood (*A. absinthium*) and verbena (*L. citriodora*), obtained by hydrodistillation (HD). The essential oils obtained by HD, presented an intense and penetrating odor. Its performance was, lemon verbena leaves, 0.2459%; mastrante leaves, 0.0424%; guabiduca leaves, 0.0482%; leaves of wormwood, 0.0327% and leaves of lemon verbena, 0.0223%. Characterization of essential oils by gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS) showed that these oils have a wide variety of secondary metabolites volatile constituents, whose chemical composition varies with each plant. Antibacterial activity of essential oils was tested against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, yielding inhibitory halos variables for each species, presenting these five types of essential oil antimicrobial activity against the strains mentioned. The antifungal activity of the essential oils was evaluated against *Candida albicans* strains, variable inhibition halos obtained for each species by presenting these five types of essential oils, bioactivity against *C. albicans*. The lethal activity of such essences was evaluated against *Artemia salina*, presenting lethality against A. 100% saline, all solutions only essential oils tested at concentrations of 1000 and 100 ug / ml. Very significant mean lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) for *C. citratus*, *A. conyzoides*, and *A. absinthium* *L. citriodora* (31,62µg / ml, 31.57 / ml, 31.76 ug / ml y31,42µg / were obtained ml respectively) and significant toxicity to *P. carpunya* (LC<sub>50</sub> = 523.80 g / ml).

**Keywords:** essential oils, lemon grass (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*) guabiduca (*P. carpunya*), wormwood (*A. absinthium*) and verbena (*L. citriodora*), hydrodistillation.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las plantas medicinales tienen su origen en los albores de la humanidad, en el tratamiento de las enfermedades en la prehistoria del ser humano comenzó probablemente, en el íntimo contacto con la naturaleza, con la observación de las costumbres de otros animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o provocada de algunas especies vegetales (JIMÉNEZ, 2007).

En la actualidad el uso de los aceites esenciales de las plantas son muy utilizados, ya sea con propósitos ornamentales o medicinales, estos compuestos obtenidos por hidrodestilación, u obtenidos mediante otras maneras, son muy utilizados por sus propiedades medicinales.

Los compuestos químicos que tienen los aceites esenciales de las plantas pueden ser considerados como fuente incalculable de información para el descubrimiento de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina.

Además, estudiar la actividad biológica de dichas esencias, al determinar su propiedad bactericida, utilizando cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y actividad antifúngica contra la cepa del hongo *Cándida albicans*. Empleando el método antibiograma para ambos casos. Aunado a estas bioactividades, conocer la letalidad o toxicidad mediante un bioensayo con nauplios de *Artemia salina* también es fundamental, ya que los resultados del mismo serán indicativos de la posible actividad antitumoral (Pino, 2010) que posean los aceites esenciales analizados.

La obtención y análisis de los aceites esenciales de estas plantas se realizaron en la Universidad Técnica de Machala, en laboratorios de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, y en la Universidad de Alberta (Canadá). Toda esta información que se obtuvo sobre los aceites esenciales es valiosa ya que se refiere a ejemplares cultivados en Ecuador.

## PROBLEMA

En Ecuador existe una gran variedad de plantas medicinales, las cuales en la actualidad siguen siendo muy utilizadas, aunque aún se desconocen todas las propiedades que tienen las mismas. Desde la antigüedad se han venido usando, especialmente en el campo; el afán por conocer todas estas propiedades terapéuticas que tienen las plantas han llevado a varios estudios, ya que aún no se conoce con exactitud todo el potencial que tienen las plantas medicinales.

Se conoce que familias en el área rural y urbana disponen de numerosas plantas medicinales usándolas medicinalmente u ornamentalmente, pero es lamentable que las personas aún ignoren todas las propiedades y los usos que tienen consigo éstas.

Los aceites esenciales naturales de estas plantas se obtienen directamente de las partes botánicas, generalmente de las hojas, por arrastre de vapor de agua o hidrodestilación, se sabe que cada aceite esencial de estas plantas es diferente, debido su composición química estos aceites esenciales son los responsables del aroma característico de cada planta, estos son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, se dice que en condiciones ambientales éstos son un poco menos densos que el agua, siendo más viscosos que ésta.

Se sabe que la clasificación de los aceites esenciales se pueden dar según su consistencia, el origen y la naturaleza química que tiene cada uno de estos, teniendo en cuenta que la última clasificación es la más compleja, ya que se basa en la composición química de los aceites esenciales de estas plantas, por medio de cromatografía de gases (MARTÍNEZ, 2003).

Existen algunos estudios científicos de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), mastrante (*Ageratum conyzoides*), guabiduca (*Piper carpunya*), ajeno (*Artemisia absinthium*) y cedrón (*Lippia citriodora*), enfocados en sus propiedades terapéuticas (VALAREZO, 2008); pero no orientados a la determinación de su composición química y sobre todo en su actividad biológica (antimicrobiana y letal).

Es sabido que las plantas medicinales presentan propiedades terapéuticas, las cuales podrían variar dependiendo del hábitat donde crece la planta. Por ello el conocimiento de la composición química, poder antimicrobial y letal de las especies a estudiar, recolectadas en latitudes ecuatorianas, otorgan una información fundamental al campo fitofarmacéutico.

## JUSTIFICACIÓN

Debido al gran uso que en la actualidad se le da a lo natural, se evaluaron la composición química, los potenciales antimicrobianos y la actividad letal, de los aceites esenciales que se obtuvieron de las cinco especies de plantas que fueron estudiadas, con el fin de que suministrar una información valiosa al campo fitofarmacéutico y proporcionar una base científica para otras investigaciones afines en el campo de los productos naturales.

Además, es importante determinar el potencial antimicrobiano que presentan las esencias extraídas de las hojas de las plantas en estudio, a su vez conocer cuál de estos aceites es más potente para investigaciones futuras, creaciones de fármacos antibacterianos y antifúngicos provenientes de aceites esenciales de estas plantas de amplio uso medicinal en Ecuador, entre otros.

El bioensayo de letalidad o citotoxicidad, es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales o compuestos químicos en larvas del crustáceo *Artemia salina*, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos. Por lo cual este ensayo permitió estimar la posible actividad antitumoral de las esencias analizadas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la composición química y la actividad biológica de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), mastrante (*Ageratum conyzoides*), guabiduca (*Piper carpunya*), ajeno (*Artemisia absinthium*) y cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la República del Ecuador.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtener los aceites esenciales de las hojas de las plantas por hidrodestilación.
- Determinar la composición química de los aceites esenciales.
- Analizar la actividad bactericida de dichos aceites esenciales
- Determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales obtenidos.
- Realizar el bioensayo de letalidad contra nauplios o larvas *Artemia salina*.

## HIPOTESIS

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), mastrante (*Ageratum conyzoides*), guabiduca (*Piper carpunya*), ajeno (*Artemisia absinthium*) y cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la República del Ecuador, poseen gran variedad de compuestos químicos, actividad bactericida, antifúngica y letal.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. ESPECIES DE PLANTAS

La diversidad de la flora y vegetación de Ecuador, ubicado en la parte Noroeste de América del Sur, depende de su variabilidad climática en las regiones que determinan su biodiversidad.

Hoy en día, se consideran plantas a los organismos pluricelulares, muy diversos morfológicamente y autótrofos, particularidad que les permite actuar como un auténtico motor de la biosfera, además, casi siempre están dotados de órganos, raíces, tallos y hojas. Las hojas son órganos laterales de morfología laminar, que se originan en el tallo (LLAMA y ACEDO, 2002).

#### 1.1.1. HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*)

Pertenece a la familia Poaceae, es una hierba perenne, robusta gramínea que alcanza hasta 2 m de altura, tallos muy ramificados de 1 a 2 m de alto con los nudos ceríferos. Hojas aromáticas, amontonadas cerca de la base, lampiña, glaucas, de 6 a 10 dm, sus ramas alargadas y un tanto penduladas. No florece o lo hace muy rara vez (Soto, 2002).

##### 1.1.1.1. Propiedades y aplicación

Se usa como anticatarral, febrífugo, antitusivo, estomáquico, carminativo, expectorante y ansiolítico, para aliviar el vómito, antiespasmódico, analgésico, antipirético, como depresor del sistema nervioso central y para disminuir el colesterol. Se reporta también como antipalúdico, diaforético y estimulante, diurético y en el control de la presión arterial (MENDOZA Y TARBODA., 2010).

#### 1.1.2. MASTRANTE (*Ageratum conyzoides*)

Pertenece a la familia Asterácea, una hierba con una gran historia de usos medicinales tradicionales en muchos países, es una de las hierbas más comunes, se

trata de una especie silvestre. Esta posee una amplia gama de compuestos químicos, incluyendo alcaloides, flavonoides, cromenos, benzofuranos y terpenoides.

Se ha encontrado que los extractos y metabolitos de esta planta poseen actividades farmacológicas e insecticidas.

Su cultivo requiere de pocos cuidados pues al establecerse en el campo el efecto alelopático de la planta inhibe el desarrollo de otras hierbas en las hileras (SOLARES, 2008).

#### **1.1.2.1. Propiedades y Aplicación**

Toda la planta o sus partes aéreas se utilizan en polvo o infusión para obtener efectos analgésico, antiinflamatorio y febrífugo. La infusión de la planta se utiliza también para tratar afecciones gastrointestinales y respiratorias, reumatismo, cistitis, gonorrea, retención urinaria, hemorragias, enfermedades venéreas y cefalea. Se le atribuye propiedad carminativa, depurativa, diurética, emenagoga, sudorífica y tónico estimulante (SOLARES, 2008).

#### **1.1.3. GUABIDUCA (*Piper carpunya*)**

Pertenece a la familia Piperácea y habita en la cuenca del Amazonas sus; hojas son aromáticas, y adquieren mayor fragancia cuando se hallan bien desecadas. Es un árbol de 8 metros de alto; ramillas con nudos hinchados; hojas alternas, elípticas, las inflorescencias son amentos. Sus hojas son ampliamente utilizadas en la medicina popular en los países tropicales y subtropicales de América del Sur (QUINTANA, 2012).

##### **1.1.3.1. Propiedades y aplicaciones.**

Esta especie vegetal se la usa como un remedio anti-inflamatorio, antiúlceras, antidiarreico y antiparasitario, así como para tratar irritaciones de la piel (QUINTANA, 2012).

#### **1.1.4. AJENJO (*Artemisia absinthium*)**

Pertenece a la familia Asterácea, es ampliamente utilizado en la medicina popular. El aceite volátil destilado de las hojas y flores secas se utiliza como fragancia.

La composición del aceite esencial de *A. absinthium* ha sido objeto de varios estudios, especialmente por el contenido de compuestos como los isómeros de tujona y camazuleno. (ORAV, et al., 2006).

#### **1.1.4.1. Propiedades y aplicaciones**

El ajeno se usa, principalmente, para tratar disfunciones del hígado, vesícula biliar y estómago, además de ser empleado desde hace siglos para expulsar lombrices intestinales. Esta planta puede usarse sola o en combinación con otras hierbas que también se emplean contra males gastrointestinales. También esta especie contiene sustancias amargas que estimulan el apetito y ha sido usada en el pasado para estimular la menstruación (GONZALEZ, 2004).

#### **1.1.5. CEDRÓN (*Lippia citriodora*)**

Pertenciente a la familia Verbenácea se ha utilizado ampliamente en la medicina popular por sus propiedades farmacológicas (QUIRANTES, et al., 2013).

Arbusto, ocasionalmente con porte arbóreo, de hasta 3 metros de altura, muy aromático cuando se restriegan sus hojas, ramificado. Tallos redondos, leñosos, provistos de finas rayas longitudinales. Sus hojas son simples, lanceoladas. Las flores son pequeñas (DELLACASSA y BANDONI, 2003).

#### **1.1.5.1. Propiedades y aplicaciones**

Los compuestos de esta planta, tiene efectos protectores asociados sobre todo con su potente actividad antioxidante. El extracto protege las células contra el daño oxidativo en sangre y muestra actividades antiinflamatorias y antiaterogénicas potenciales (QUIRANTES, et al., 2013).

## **1.2. ACEITE ESENCIAL**

### **1.2.1. Definición**

Un aceite esencial es una mezcla volátil de compuestos orgánicos generalmente líquidos, que tienen una apariencia oleosa, el cual otorga el olor de cada planta. Pocos aceites esenciales son valorados por su actividad antibacteriana, antifúngica y letal.

Los componentes de los aceites esenciales se encuentran a menudo en las glándulas o espacio intercelulares en el tejido de las plantas. Además se suelen concentrar en las semillas, flores hojas o frutos (GUARNIZO y MARTÍNEZ, 2009).

Los aceites esenciales (AE) poseen características lipofílicas, que se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas a través de métodos físicos, destilación con vapor, y que llevan en sí misma la huella, olor y sabor, del material vegetal del que proceden. Los AE poseen una química compleja, generalmente consisten en una mezcla heterogénea de sustancias orgánicas: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc., de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente (VARGAS y BOTTIA, 2008).

### **1.2.2. Localización**

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta.

Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de las plantas.

- En las hojas.
- En las raíces
- En el pericarpio del fruto
- En las semillas
- En el tallo
- En las flores
- En los frutos (SHIVA, 2007).

### **1.2.3. Extracción**

La extracción de los aceites esenciales es el proceso de aislamiento o separación de aceite esencial de la materia prima (planta aromática) por hidrodestilación generalmente a la especie vegetal que ya se haya sometido al proceso de extracción del aceite esencial se le denomina material agotado (VALAREZO, 2008).

## **1.3. CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTOFOTOMETRIA DE MASAS**

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es una técnica analítica poderosa, que permite la separación de los componentes de una muestra en el tiempo y brinda información estructural acerca de los analitos eluidos.

En CG-EM se utilizan como criterios de identificación la información de los tiempos e índices de retención junto con la información estructural, i.e. patrones de fragmentación,

obtenidos a partir de los espectros de masas de los analitos que eluyen de la columna cromatográfica e ingresan al sistema de detección (espectrómetro de masas). En sentido general, el espectrómetro de masas consta de seis bloques principales, a saber: un sistema de inyección, la fuente de ionización, el analizador de iones, los sistemas de detección y registro, el sistema de alto vacío y el sistema de datos. Existe una amplia variedad de instrumentos que pueden ser clasificados de acuerdo con los métodos de ionización y los procedimientos para el análisis de iones. Entre los métodos de ionización el más empleado es el de impacto con electrones (IE), mientras que, el tipo de analizador de iones más común es cuadrupolo (VARGAS y BOTTIA, 2008).

**Figura 1.** Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.



**Fuente:** Departamento de Química de la Universidad de Alberta.

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

El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío (GUTIÉRREZ y DROGUET., 2002).

## 1.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

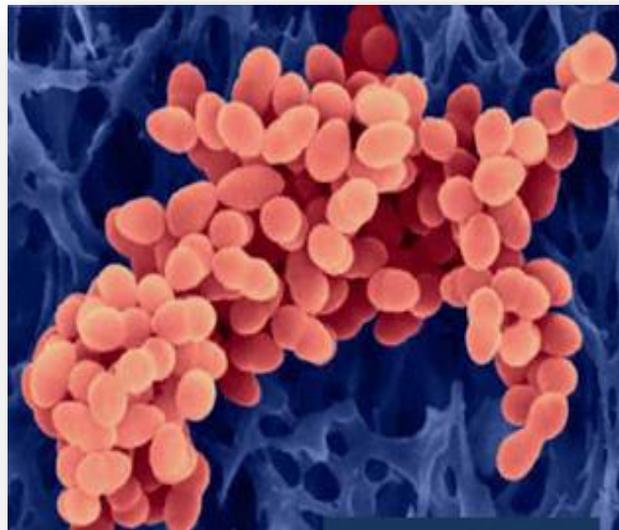
La actividad de una sustancia antimicrobiana se define como: la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado” y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos (MARTINEZ, 2005).

Es común el empleo de partes vegetales con la finalidad de obtener varios efectos terapéuticos y que han sido respaldados por estudios científicos. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales se incluye la acción antibacteriana. Los hallazgos obtenidos del estudio de vegetales con potencial terapéutico podrán servir como instrumento de apoyo médico-social para un mayor grupo poblacional, principalmente el más carente, estando también la industria farmacéutica más interesada en los conocimientos de esta área (DE PAULA Y MARTÍNEZ, 2000).

### 1.4.1. Cepas Bacterianas

#### 1.4.1.1. *Staphylococcus aureus*

**Figura 2.** Imagen de *S. aureus*



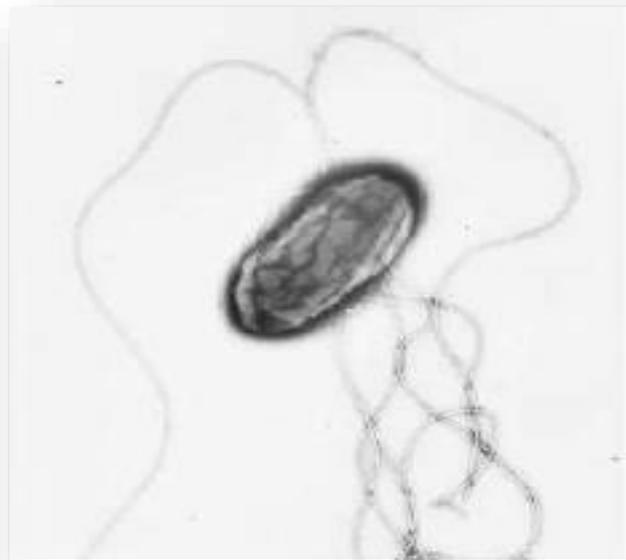
**Fuente:** López, 2012.

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *S. aureus* es considerada la más virulenta,

responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. *S. aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente (CERVANTES *et al.*, 2014).

#### 1.4.1.2. *Escherichia coli*

**Figura 3:** Imagen de *E. coli*.



**Fuente:** Faleiro, 2009.

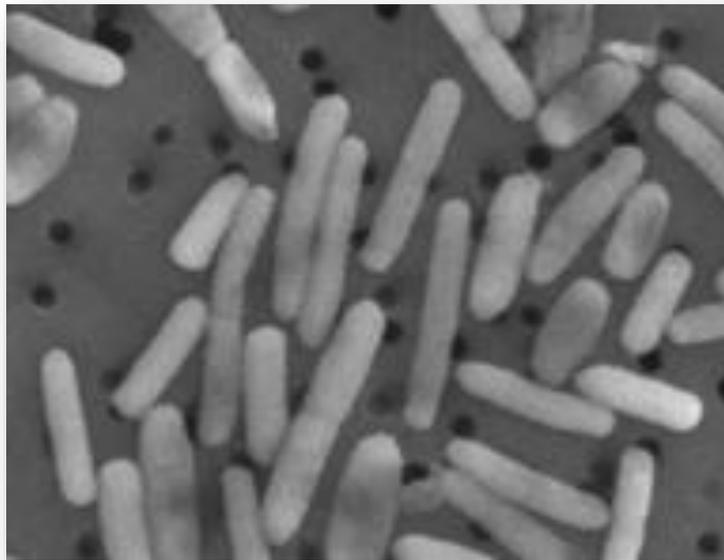
La *Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y los seres humanos. Aunque generalmente son inofensivas, algunas *E. coli* son patógenas y pueden contaminar los alimentos, el agua y el medioambiente. Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de la *E. coli* y se producen cientos de muertes.

*Escherichia coli* enteropatógena es una de las principales causas de diarrea en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo. La principal característica histopatológica de la infección es una lesión que induce en el intestino conocido como la lesión A/E (adherencia y eliminación).

Las bacterias se adhieren a los enterocitos y permiten la acumulación de la actina del citoesqueleto en la región apical de la célula, hasta formar una estructura de tipo “pedestal” y causar la eliminación de las microvellosidades intestinales. A pesar de que se conoce de modo detallado el proceso de formación de los pedestales de actina, aún no se ha esclarecido el mecanismo global de la diarrea que induce (VIDAL *et al.*, 2007).

#### **2.1.4.3. *Pseudomona aeruginosa***

**Figura 4.** Imagen de *P. aeruginosa*



**Fuente:** Harrington, 2011

Es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas*, tanto respecto al número, como al tipo de infecciones causadas y a la morbilidad y mortalidad asociadas. Esta especie se encuentra típicamente en suelos y aguas, es también un patógeno oportunista de plantas y animales.

El espectro de infecciones que puede causar, va desde una foliculitis, hasta la bacteremia que puede comprometer la vida de los pacientes. Las infecciones por este patógeno pueden ocurrir en todas las localizaciones anatómicas, y todas ellas pueden derivar en bacteremia. También es particularmente importante en pacientes con quemaduras severas y fibrosis cística.

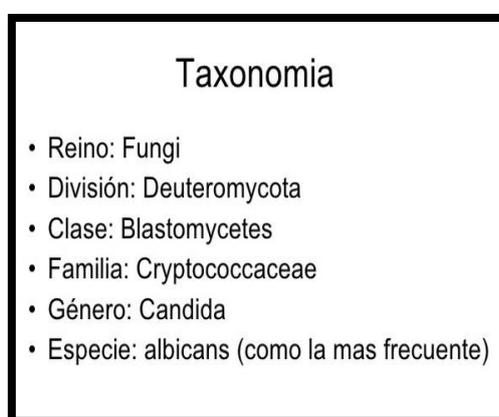
Además, es la causa principal de neumonías asociadas a ventilación automática e infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos. (RUIZ., 2007)

## 1.4.2. Cepas fúngicas

### 1.4.2.1. *Cándida albicans*

Es considerada un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado. La *C. albicans* al igual que otros patógenos tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en aparatos implantados, especialmente catéteres intravasculares lo que les confiere mayor resistencia a antifúngicos (LAFORET., 2010).

**Figura 5.** Taxonomía de *Cándida Albicans*



**Fuente:** Sánchez, 2011.

## 1.5. ACTIVIDAD LETAL

### 1.5.1. Bioensayo de *Artemia salina*

La toxicidad in vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. Este organismo es fácil de cultivar y manipular en laboratorio, es sensible a una gran variedad de tóxicos; y genera resultados confiables en cuanto alternativa poco costosa, sencilla y rápida.

Puede ser usada de manera rutinaria en la investigación fitoquímica y permite crear una base para adelantar posteriores estudios, que brinden aplicaciones. Este bioensayo es aplicable a compuestos con estructuras y modos de actividad diversos, lo que le otorga la característica de ser de amplio espectro, de ahí que sea usado como método de

análisis para detectar residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos y compuestos de tipo morfínico, entre otros (SANCHEZ Y NEIRA., 2005).

Los extractos positivos al bioensayo se someten al estudio químico detallado para llegar a compuestos puros o mezcla de compuestos, los cuales se someten de nuevo al bioensayo, para hacer la selección en base a la concentración letal 50 (CL50) (SIERRA y ZARATE, 2008).

## **2.5.2. *Artemia salina***

### **2.5.2.1. Generalidades**

El género *Artemia* (Crustacea, Anostraca) incluye pequeños crustáceos o “camaroncitos de la sal” (brine shrimp, en inglés) que viven en aguas saladas continentales, con excepción de la Antártida. Durante la década de 1980, se hicieron populares a nivel mundial porque sus huevos de resistencia (cistos o quistes). Las poblaciones de *Artemia* se encuentran extensamente distribuidas por todo el mundo en lagos salinos naturales o salinas de construcción artificial y se adaptan a amplias variaciones de la temperatura y de la calidad del agua. Este género tiene importancia como recurso natural, principalmente como alimento para la cría de peces en acuicultura y en acuarios ornamentales. También es muy interesante desde el punto de vista científico, en primer lugar, por sus adaptaciones a ambientes extremadamente salinos y, en segundo término, como modelo para estudios genéticos, comparable a las especies de mosca *Drosophila* (CURTO, 2009).

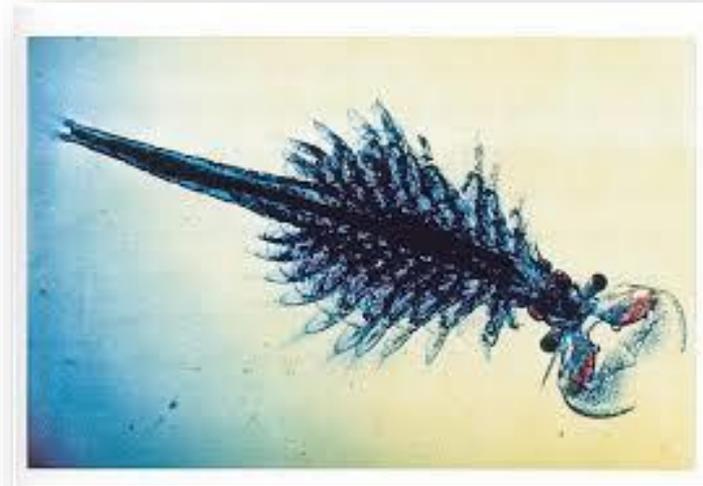
### **2.5.2.2. Características Morfológicas**

Los adultos de *Artemia* miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas. El adulto tiene patas planas en forma de hoja y una larga “cola” formada por los últimos ocho segmentos del cuerpo. Carece de cubierta calcárea y su cuerpo es transparente. La cabeza tiene un par de ojos compuestos ubicados en el extremo de las protuberancias oculares.

El cuerpo está dividido en 11 segmentos torácicos con apéndices denominados toracópodos, siete segmentos abdominales y dos o tres segmentos caudales con filamentos. Los segmentos torácicos le sirven para nadar, desplazándose con el vientre hacia arriba. El macho posee un par de piezas prensiles muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica, que le permiten ser reconocido fácilmente.

La hembra de *Artemia* no tiene apéndices distintivos en la región cefálica pero, en cambio, posee el saco de puesta o útero ubicado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. (CURTO, 2009).

**Figura 6.** Imagen de *Artemia Salina*



**Fuente:** Pinzón, 2000

## **2.6. MEDICAMENTOS USADOS COMO PATRONES**

### **2.6.1. CIPROFLOXACINA**

La ciprofloxacina se usa para tratar o prevenir determinadas infecciones bacterianas, pertenece a una clase de antibiótico llamada fluoroquinolona y posee, además, un amplio espectro de acción según el nivel de actividad.

#### **2.6.1.1. Espectro bacteriano**

Los efectos antibacterianos de la ciprofloxacina se deben a la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa bacterianas. Estas topoisomerasas alteran el DNA introduciendo pliegues super helicoidales en el DNA de doble cadena, facilitando el desenrollado de las cadenas.

La DNA-girasa tiene dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, y actúan rompiendo las cadenas del cromosoma bacteriano y luego pegándolas una vez que se ha formado la superhélice. Las quinolonas inhiben estas subunidades impidiendo la replicación y la transcripción del DNA bacteriano, aunque no se conoce con exactitud por qué la inhibición de la DNA-girasa conduce a la muerte de la bacteria. Las células humanas y de los mamíferos contienen una topoisomerasa que actúa de una forma parecida a la

DNA-girasa bacteriana, pero esta enzima no es afectada por las concentraciones bactericidas de la ciprofloxacina.

Como todas las quinolonas, la ciprofloxacina muestra un efecto post-antibiótico: después de una exposición, los gérmenes no pueden reiniciar su crecimiento durante unas 4 horas, aunque los niveles del antibiótico sean indetectables.

### **2.6.1.2. Farmacocinética**

La ciprofloxacina se administra por vía oral e intravenosa. Después de una dosis oral, la ciprofloxacina se absorbe rápidamente en el tracto digestivo, experimentando un mínimo metabolismo de primer paso. En voluntarios en ayunas se absorbe el 70% de la dosis, alcanzándose las concentraciones plasmáticas máximas en 0.5 a 2.5 horas. Cuando el fármaco se administra con la comida, se retrasan las concentraciones máximas, pero la absorción global no queda afectada. Después de una dosis oral de 500 mg, las concentraciones plasmáticas son de 1.6-2.9 mg/ml. Después de una dosis intravenosa de 400 mg, las concentraciones son de 4.6 mg/ml. Las concentraciones plasmáticas se mantienen durante 12 horas por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias para la mayoría de las bacterias.

La ciprofloxacina se distribuye ampliamente por todo el organismo, siendo mínima su unión a las proteínas del plasma. La penetración en el líquido cefalorraquídeo es mínima cuando las meninges no están inflamadas. Se alcanzan concentraciones superiores a las plasmáticas en la bilis, los pulmones, los riñones, el hígado, la vejiga, el útero, el tejido prostático, el endometrio, las trompas de Falopio y los ovarios. El 50% de la dosis oral de ciprofloxacina es excretada por vía renal como fármaco sin alterar. En los pacientes con la función renal normal la semivida de eliminación es de 3-5 horas, pero puede aumentar a 12 horas en sujetos con insuficiencia renal. La excreción fecal alcanza el 20-40% de la dosis (SUAREZ y VERA, 2011).

### **2.6.2. KETOCONAZOL**

Antifúngico imidazólico activo frente dermatofitos, hongos dimórficos (*Histoplasma* y *Coccidioides*) y levaduras patógenas excepto *Cryptococcus*. Altera la permeabilidad lipídica al bloquear el citocromo P450 del hongo e inhibe la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos por el hongo.

### **2.6.2.1. Farmacocinética**

Es débilmente dibásico. Requiere la presencia de un medio ácido para su disolución y absorción. Se absorbe rápido en pacientes normales después de su administración oral. Se distribuye de forma amplia en humanos (basado en modelos animales), aparece en el líquido de las articulaciones inflamadas, saliva, bilis, orina, grasa, cerumen, heces, tendones, piel y tejidos blandos. Atraviesa poco la barrera hematoencefálica y solo cantidades insignificantes alcanzan el líquido cefalorraquídeo, donde concentraciones mayores de 1 µg/mL son raras. También atraviesa la barrera placentaria. El metabolismo tiene lugar en el hígado, primero por oxidación y degradación de los anillos de imidazol y piperazina, ortodesalquilación oxidativa e hidroxilación aromática a varios metabolitos inactivos. Su excreción es principalmente por la bilis. Aproximadamente 13 % lo hace por los riñones y de esta cantidad, entre 2 y 4 % aparece en la orina en forma inalterable. También se excreta por la leche. Vida media plasmática: fase alfa: 1,4 a 3,3 h durante las primeras 10 h; fase beta: 8 h después. Tiempo para la máxima concentración sérica: de 1 a 4 h. Máxima concentración sérica: aproximadamente 3,5 µg/mL seguidos de una simple dosis de 200 mg administrada con una comida. Se ha reportado concentraciones de más de 50 µg/mL.

### 3. METODOLÓGIA

#### 3.1. Localización de la Investigación

El presente trabajo de investigación, se realizó en la Planta Piloto de Farmacia, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Investigaciones de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

#### 3.2. Universo de trabajo

Se tomó muestra de las plantas a analizarse (*C. citratus*, *A. conyzoides*, *P. carpunya*, *A. absinthium* y *L. citriodora*), que son vendidas en la Provincia de El Oro.

#### 3.3. Tipo de muestra

Para el análisis y la investigación respectiva de los aceites esenciales se utilizaron las hojas de las plantas de hierba luisa (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*), guabiduca (*P. carpunya*), ajeno (*A. absinthium*) y cedrón (*L. citriodora*).

#### 3.4. Materiales

##### 3.4.1. Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación de 500, 250 y 50 ml
- Agitador
- Embudo
- Tubos de ensayo
- Erlenmeyer
- Cajas Petri
- Pipetas volumétricas
- Pipetas Pasteur
- Pera
- Lupa
- Lámpara de alcohol
- Soportes
- Pinzas
- Mechero de Bunsen
- Papel filtro
- Embudo de separación
- Bomba para oxigenación

- Lámpara de luz blanca

#### **3.4.2. Otros materiales**

- Tijeras
- Papel periódico
- Lavacara
- Lápiz graso
- Hisopos
- Papel aluminio
- Toallas absorbentes
- Fundas plásticas

#### **3.4.3. Equipos**

- Equipo de Hidrodestilación
- Estufa
- Balanza analítica
- Incubadora
- Autoclave
- Plancha de calentamiento.

#### **3.4.4. Sustancias**

- Agua destilada
- Dimetilsulfoxido
- Agua de mar
- Agar Müller Hinton
- Agar Papa-dextrosa
- Alcohol potable
- Cloroformo
- Agua de mar filtrada
- Sulfato de sodio anhidro.

#### **3.4.5. Material biológico**

- Huevos de *Artemia salina*
- Cepa de hongo *Candida albicans*
- Cepas de bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *E. coli*

### **3.5. MÉTODOS**

#### **3.5.1. Tipo de Investigación**

**Experimental-analítico:** Determinar la actividad letal, antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales de las especies vegetales, conocer la composición química en cada especie, a las cuales deben sus propiedades medicinales.

#### **3.5.2. Selección de las muestras**

Los aceites esenciales que se utilizaron fueron obtenidos de las hojas frescas de hierba luisa (*C. citratus*), mastrante (*A. conyzoides*), guabiduca (*P. carpunya*), ajeno (*A. absinthium*) y cedrón (*L. citriodora*), durante los meses de agosto, septiembre y octubre de 2014.

#### **3.5.3. Procesamiento del material vegetal**

Se separaron las hojas de las plantas, se lavaron con agua corriente, luego un enjuague con agua destilada. Se dejaron secar y posteriormente se procedió a cortar las hojas en trozos pequeños.

#### **3.5.4. Obtención de los aceites esenciales**

Se obtuvieron los aceites esenciales a partir de las hojas frescas. Este procedimiento se realizó por hidrodestilación, en el laboratorio de Investigaciones de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, se procedió a realizar el procesamiento del material vegetal, luego se colocaron en el balón de 500ml, se armó el equipo de destilación correctamente y se procedió a la destilación por tres horas, el producto obtenido será una mezcla heterogénea de aceite y agua, la cual se recibió en un embudo de separación, el aceite es el sobrenadante; para extraer el aceite se procedió a agregar 10 ml de cloroformo y se agita la mezcla, el cloroformo se unirá al aceite llevándolo a la superficie inferior, separándose la capa



Para la separación de dichos componentes, se disolvió el aceite en cloroformo en una relación 1: 200 V/V, luego se inyectó 1µl de la solución preparada del aceite esencial en un Cromatógrafo de Gases marca Agilent Technologies modelo 7890, con fuente de ionización de 70ev por impacto electrónico (EI) y un Detector de Masas *single cuadrupole* modelo 5975C, equipado con una columna de metil-silicona de 30 m x 250 µm x 0,25 µm. La cuantificación de los compuestos químicos se realizó con base en las áreas relativas de cada pico en el cromatograma a obtener, y la identificación de los mismos se hizo por comparación de los espectros de masas obtenidos con la base de datos de la librería NIST 08 del equipo.

### **3.5.6. Actividad antimicrobiana**

#### **3.5.6.1. Actividad bacteriana**

La presencia de principios activos antibacterianos se determinó utilizando cepas de bacterias patógenas y/o certificadas, Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

Este ensayo se realizó siguiendo la técnica de difusión en agar o método de Antibiograma (BAUER *et al*, 1966).

- Se preparó el medio (agar Müller Hinton) y la solución de los aceites esenciales de 40 mg/ml.
- Una vez que se agregó el medio a las cajas de Petri, se deja enfriar para su completa solidificación.
- Rotular las cajas de Petri.
- Se procedió a inocular en el medio la suspensión bacteriana de concentración conocida ( $10^8$  células/mL) de las diferentes cepas (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*)
- Se hicieron pocillos de 6mm de diámetro en el medio inoculado y se colocaron 10 ó 25 µL de una solución preparada a una concentración de 40 mg en 1 ml de un solvente adecuado (cloroformo).
- Luego se llevó a incubar a 37°C por 24 h. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro (mm) del halo de inhibición alrededor de los pocillos.

#### **3.5.6.2. Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica fue evaluada mediante la utilización de cepas de hongos tipo *Candida albicans*.

Se utilizó la misma técnica de Antibiograma, consistió en incubar cepas de hongos por una semana, en tubos de vidrio a temperatura ambiente; al cabo de este tiempo se añadieron 10 ml de agua destilada estéril a cada tubo, se agitó y filtró para obtener una suspensión de esporas de cada cepa incubada.

La solución obtenida se sembró sobre cápsulas de Petri, previamente servidas con agar Papa Dextrosa (PDA), usando hisopos estériles. Seguidamente, se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro en el medio inoculado y colocaron 10 ó 25  $\mu\text{L}$  de una solución preparada a una concentración de 40 mg en 1 ml de un solvente adecuado (cloroformo).

Se incubó durante 48 horas a temperatura ambiente para permitir el crecimiento fúngico. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco, fue el indicativo de la actividad fúngica del aceite esencial, los cuales se midieron tomando en cuenta el diámetro del halo de inhibición en mm (MADUBUNYI, 1995).

### **3.5.7. Actividad tóxica o letal**

El grado de toxicidad o letalidad de los aceites esenciales obtenidos, se evaluó con crustáceos de *A. salina*. Los quistes o huevos se colocaron en un envase de plástico provisto de una apertura con agua de mar filtrada y salinidad adecuada, fuente de luz de 75W y de esta manera facilitar la aireación continua durante 24 horas para obtener los nauplios o larvas de *A. salina*.

Este método consistió en la preparación de una solución madre de 10 000  $\mu\text{g/ml}$  del aceite esencial (20mg) con 0,5ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,5ml de agua destilada. A partir de la solución madre, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$  mediante diluciones sucesivas.

Posteriormente, a cada solución se le agregaron entre 8 y 13 nauplios de *Artemia salina* y, por cada concentración se realizaron 3 réplicas y controles con igual número de réplicas.

El grado de mortalidad de los nauplios se determinó después de transcurridas 24 y 48 horas desde el inicio del bioensayo y, luego se anotó el número de organismos muertos para cada una de las concentraciones. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de mortalidad y la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) utilizando el programa estadístico de computación (Probit, Logit o Binomial), diseñado con un límite de confianza de 95% (STEPHAN, 1977).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación, fueron analizados realizándose un estudio de la bioactividad de los mismos, mediante ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica y letalidad o toxicidad aguda contra *Artemia salina*; procediéndose a determinar la actividad biológica de cada uno de los aceites, según la metodología descrita previamente, a fin de evaluar las esencias que resultaron más bioactivas; además se realizó un estudio de la composición química, mediante la identificación de los compuestos químicos por la técnica de cromatografía de gases.

Los resultados obtenidos de los análisis, se presentan a continuación:

### 4.1. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

**Tabla 1.-**Rendimiento porcentual de los aceites obtenidos.

ESPECIE VEGETAL	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA			DS
	Masa inicial utilizada (g)	Aceite esencial obtenido (g)	Rendimiento (%) <sup>a</sup>	
Hojas de guaviduca ( <i>Piper carpunya</i> )	164,00	0,0790	0,0482	0,001
Hojas de cedrón ( <i>Lippia citriodora</i> )	228,00	0,0507	0,0223	0,002
Hojas de hierba luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).	97,72	0,2404	0,2459	0.007
Hojas de mastrante ( <i>Ageratum conyzoides</i> ).	166,00	0,0704	0,0424	0,003
Hojas de ajeno ( <i>Artemisia absinthium</i> ).	210,00	0,0687	0,0327	0,001

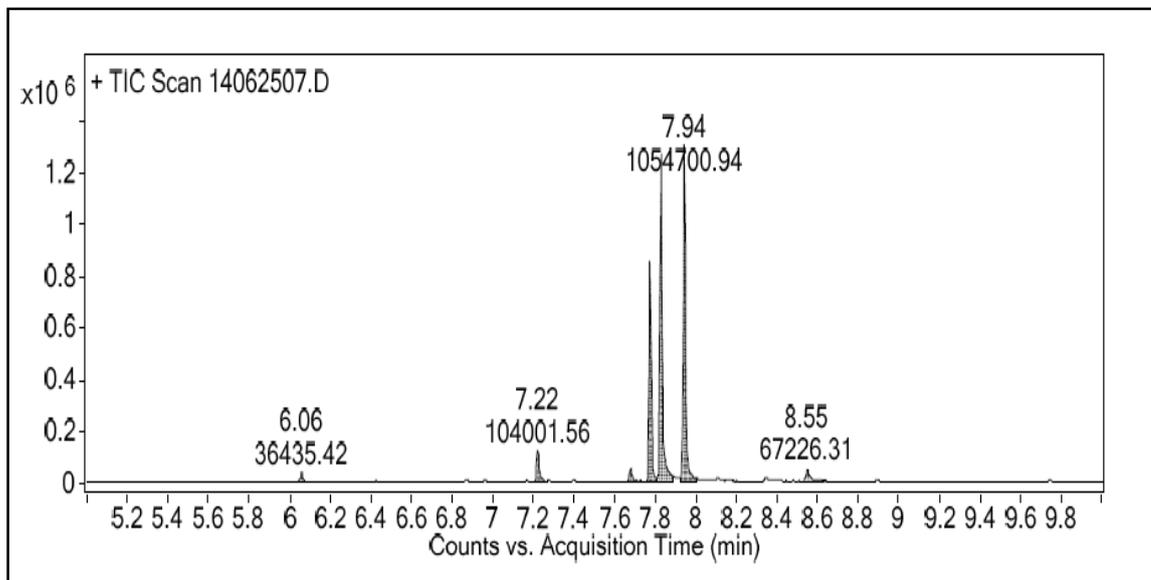
<sup>a</sup>Rendimiento porcentual= (masa inicial (hojas)/masa del aceite)\*100

**Fuente:** Valverde, 2015.

Como se puede observar en la tabla 1, el mayor rendimiento porcentual (0,24 %) se lo obtuvo en las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), debido a la baja concentración de agua de esta materia prima, *Piper carpunya* (0,0482%), *Ageratum conyzoides* (0,0424%), *Artemisia absinthium* (0,0327%) y *Lippia citriodora* (0,0223%), no presenta diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en el rendimiento de aceite esencial.

#### 4.2. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM):

**Figura 8.** Cromatograma del aceite esencial de Hierba Luisa (*C. citratus*)



**Fuente:** Departamento de Química. Universidad de Alberta

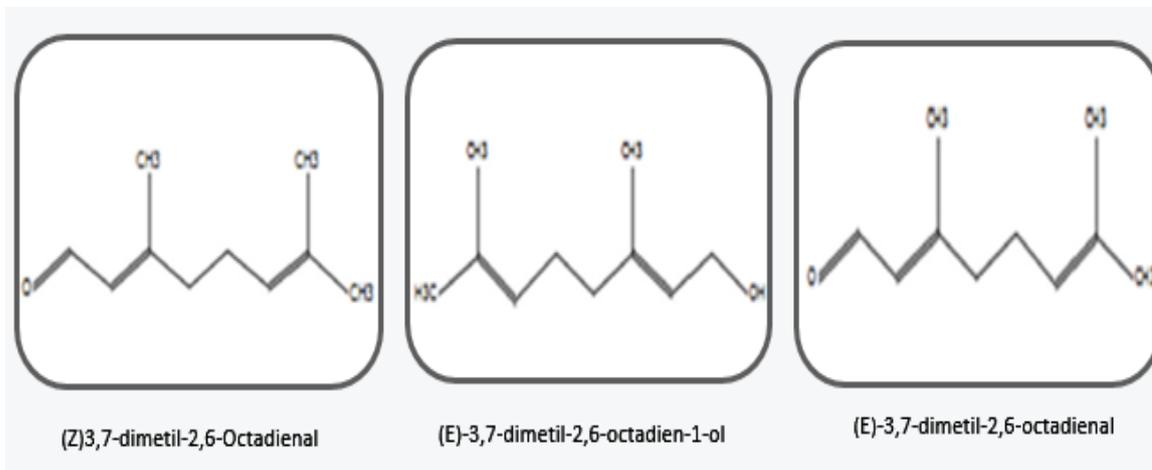
Se puede apreciar en la figura 8, la mayor concentración de 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (Geraniol) es del 12,37 mg/kg, compuesto responsable de otorgar la coloración rosácea (Dazeley, 2015).

**Tabla 2.-** Composición química del aceite esencial de *C. citratus*

Pico	Tiempo de Retención	Compuesto químico	% Área	Conc.
1	6.04	Beta-mirceno	1,21	6,24
2	7.21	3,7-dimetil-6-octenal	3,46	6,45
3	7.66	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	1,89	8,52
4	7.76	(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal	21,09	5,8
5	7.83	(E)-3,7-dimetil 2,6-octadien-1-ol	35,01	6,51
6	7.94	(E)-3,7-dimetil 2,6-octadienal	35,10	6,43
7	8.53	(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	2,24	12,37

**Fuente:** Valverde, 2015

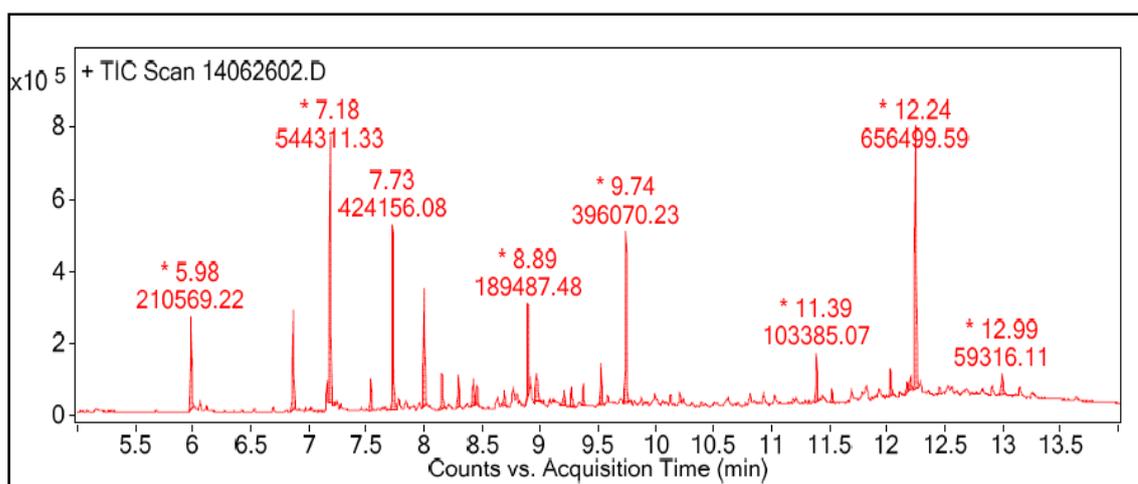
**Figura 9:** Estructuras químicas de los compuestos más abundantes en los aceites esenciales de las hojas de *C. citratus*.



**Fuente:** Valverde, 2015

La composición química de la esencia de *C. citratus*, mostró variaciones significativas de los componentes mayoritarios presentes en las esencias, en la (Figura 9) se muestran las estructuras químicas de los compuestos más abundantes.

**Figura 10.-** Cromatograma del aceite esencial de *A. conyzoides*



**Fuente:** Departamento de Química. Universidad de Alberta.

Se puede observar en la figura 10 que el componente mayoritario es el terpenoide (óxido de cariofileno), el cual se encuentra en un porcentaje de 12,51 mg/kg, este compuesto tiene actividad farmacológica (CANNA, 2015).

**Tabla 3.-** Composición química del aceite esencial de (*A. conyzoides*)

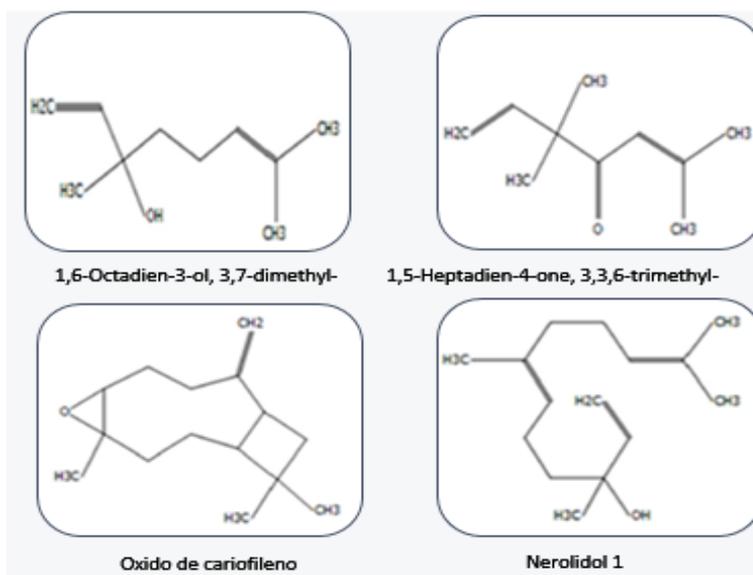
Pico	TR	Compuesto químico	% Área	Conc
1	5.98	1-octen-3-ol	5,32	-
2	6.87	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	11,6	5,76
3	7.17	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-4-ona	13,77	529
4	7.52	4-trimetil-3-ciclohexen-1-metanol	18,77	5,65
5	7.71	4,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona	10,73	6,38
6	7.97	3-metil-6-(1-metiletenil)-2-ciclohexen-1-ona	6,71	6,48
7	8.14	2,3,5,6-tetrametil-p-benzoquinona	2,27	7,55
8	8.28	Eugenol	.....1,77	6,57
9	8.4	4,11,11-trimetil-8-metilen-bicyclo[7.2.0]undec-4-eno	2,07	9,23
10	8.45	ciclooctanecarboxaldehido	1,02	6,57
		1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-1-		7,35
11	8.68	naftalenol	0,86	
12	8.88	nerolidol 1	4,79	6,54
13	8.95	oxido de cariofileno	2,75	12,51

TR: tiempo de retención

**Fuente:** Valverde, 2015

En la composición química del AE de *A. conyzoides*, se muestra una amplia composición química, los compuestos que son mayoritarios no presentan un porcentaje significativo. Se presenta la estructura química de los compuestos mayoritarios o más abundantes en esta especie (Tabla 3).

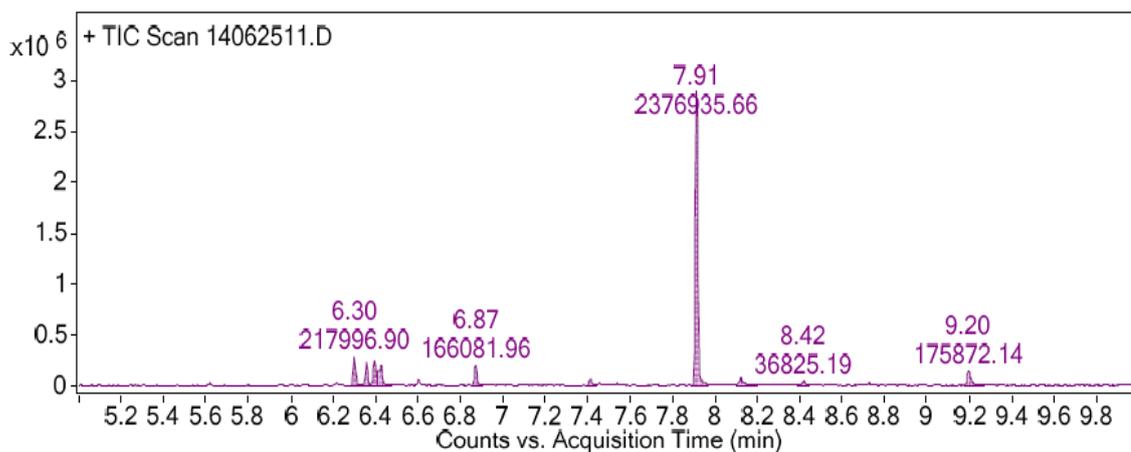
**Figura 11.-** Estructuras químicas de compuestos de más abundantes en los aceites esenciales de las hojas de *A. conyzoides*.



**Fuente:** Valverde, 2015

Un estudio realizado por VARGAS y BOTTIA (2008) en hojas de *A. conyzoides*, presenta una gran similitud en los resultados obtenidos en la composición química, aunque varía bastante los porcentajes mas no sus estructuras; la composición química puede variar en muestras de la misma especie dependiendo del habitat, el clima y las variables agronómicas (ANTOLINES, 2008).

**Figura 12.-** Cromatograma del aceite esencial de *P. carpunya*.



**Fuente:** Departamento de química. Universidad de Alberta.

Se puede observar en la figura 12 que el componente mayoritario es el 5-(2-propenil)-1,3-benzodioxolo (safrole), el cual se encuentra en un porcentaje de 12,26 mg/kg, este compuesto tiene actividad cancerígena (Lui, 1999).

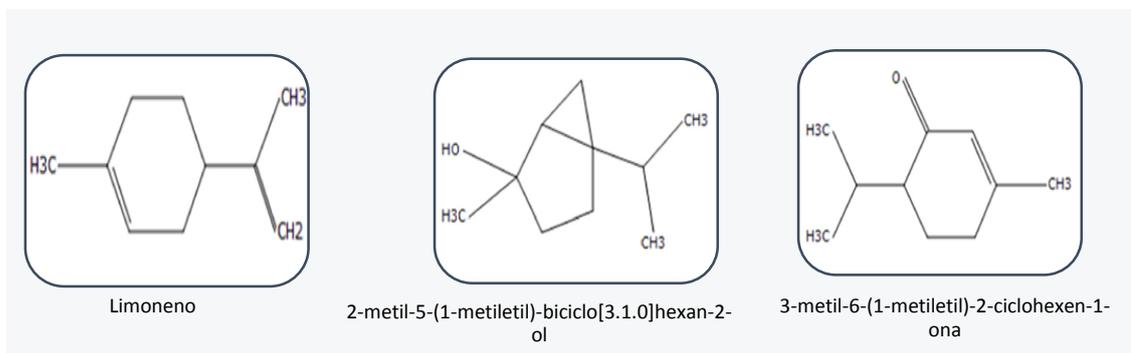
**Tabla 4-** Composición química del aceite esencial de *P. carpunya*.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE GUAVIDUCA				
Pico	TR	Compuesto químico	% Área	CONC.
1	6.3	1-metil-4-(1-metiletilideno)-ciclohexeno	5,77	4,83
2	6.63	1-metil-4-(1-metiletil)-benceno	4,65	5,11
3	6.39	Limoneno	5,33	5,22
4	6.42	2-metil-5-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hexan-2-ol	6,98	8,68
5	6.87	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	4,40	5,70
6	7.41	trans-2-Caren-4-ol	1,25	6,17
7	7.91	3-metil-6-(1-metiletil)-2-ciclohexen-1-ona	62,94	6,5
8	8.12	5-(2-propenil)-1,3-benzodioxolo	3,04	12,26
9	8.42	acetato de 1-metil-4-(1-metiletenil)ciclohexanol	0,98	7,76
10	9.2	1,2-dimetoxi-4-(1-propenil)-benceno	4,66	11,43

TR: tiempo de retención

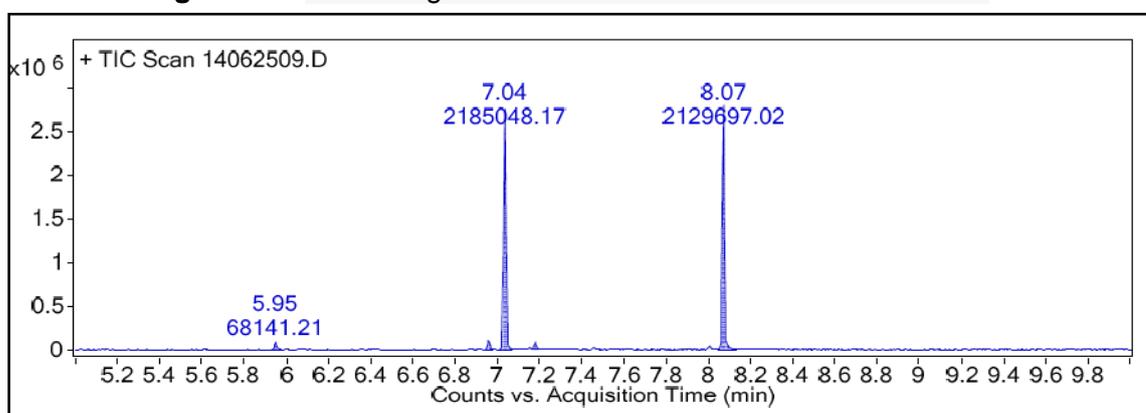
**Fuente:** Valverde, 2015

**Figura 13.-** Estructuras químicas de compuestos más abundantes en los aceites esenciales de las hojas de *P. carpunya*.



**Fuente:** Valverde, 2015

**Figura 14.-** Cromatograma del aceite esencial de *A. absinthium*



**Fuente:** Departamento de Química. Universidad de Alberta.

Como se aprecia en la figura 16 el componente mayoritario (6,12 mg/kg) 4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo [3.1.0] hexan-3-ol (*Sesquiterpeno*) actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios (Dewick, 2009).

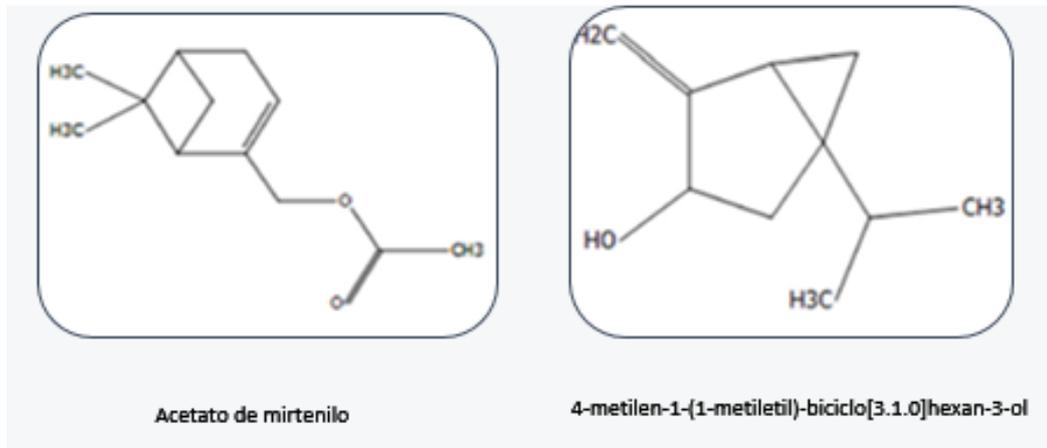
**Tabla 5.-** Composición química del aceite esencial de *A. absinthium*.

COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE AJENJO				
Pico	TR	Compuesto químico	% Área	CONC.
1	5.95	4-metileno-1-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hexano	1,5	4,52
2	6.96	tujona	1,83	5,28
3	7.04	acetato de mirtenilo	48,29	5,56
4	7.18	4-metil-1-(1-metiletil)-bicyclo[3.1.0]hexan-3-ona	1,31	5,27
5	8.07	4-metilen-1-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hexan-3-ol	47,06	6,12

TR: tiempo de retención

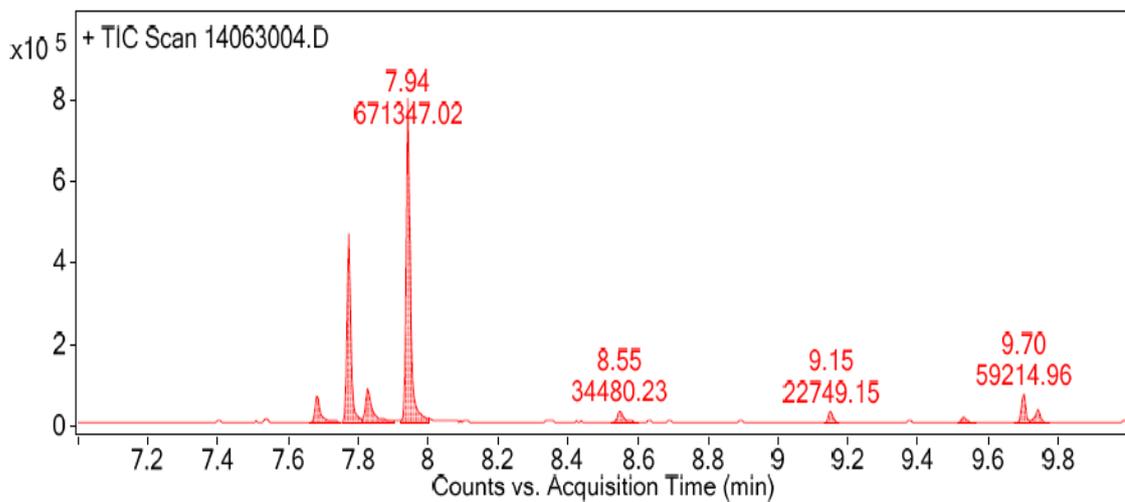
**Fuente:** Valverde, 2015

**Figura 15.-** Estructuras químicas de los compuestos más abundantes en el aceite esencial de las hojas de *A. absinthium*.



**Fuente:** Valverde, 2015

**Figura 16.-** Cromatograma del aceite esencial de *L. citriodora*



**Fuente:** Departamento de Química. Universidad de Alberta

La figura 16 nos muestra que el componente mayoritario (11,39 mg/kg) (E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (Geraniol), el cual actúa como colorante otorgando la coloración rosácea, característica cuando está seco. También posee propiedades insecticida (Barnard & Xue, 2004).

Las especies *Lippias* y *Aloysias* muestran rendimiento en su aceite esencial dependiendo de la época de cosecha y muestreo, es mayor en los meses de máximo crecimiento de la planta, es decir, en las épocas de verano o primavera (Ricciardi, *et al* 2000). Estudios realizados muestran una variabilidad de porcentajes y de ciertos componentes, esto podría depender del lugar donde la especie fue cultivada.

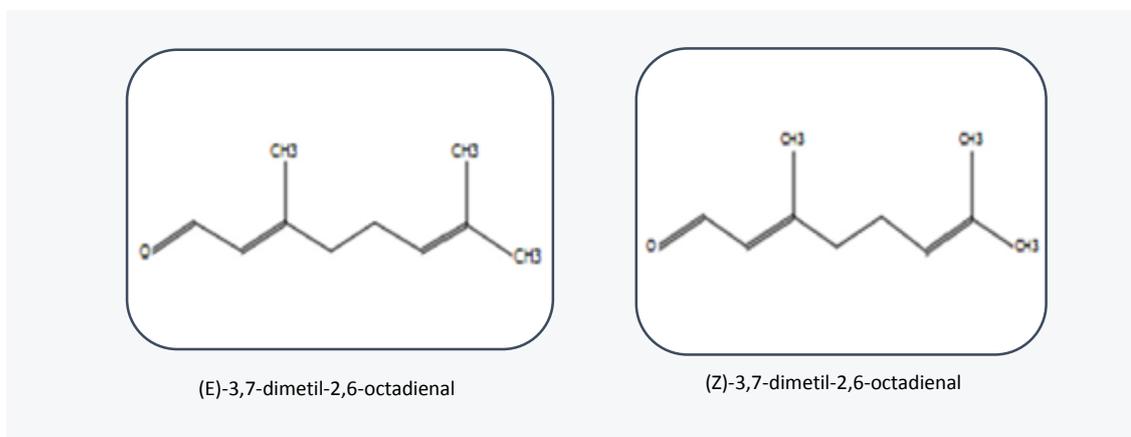
**Tabla 6.-** Composición química del aceite esencial de *L. citriodora*

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CEDRÓN				
Pico	TR	Compuesto químico	% Área	CONC.
1	7.68	(E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	5,48	9,33
2	7.78	(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal	26,59	6,25
3	7.83	(E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	8,76	11,39
4	7.94	(E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal	47,78	6,70
5	8.55	acetato de (Z)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	2,46	10,23
6	9.15	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benceno	1,62	7,51
7	9.53	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	0,93	9,79
8	9.7	decahidro-1,1,7-trimetil-4-methylen-1H-cicloprop[e]azulen-7-ol	4,21	8,28
9	9.74	2-metilciclopropil-1,3-bis-(2-ciclopropil)-but-2-en-1-ona	2,16	9,79

TR: tiempo de retención

**Fuente:** Valverde, 2015

**Figura 17.-** Estructura química de compuestos más abundantes en el aceite esencial de las hojas de *L. citriodora*.

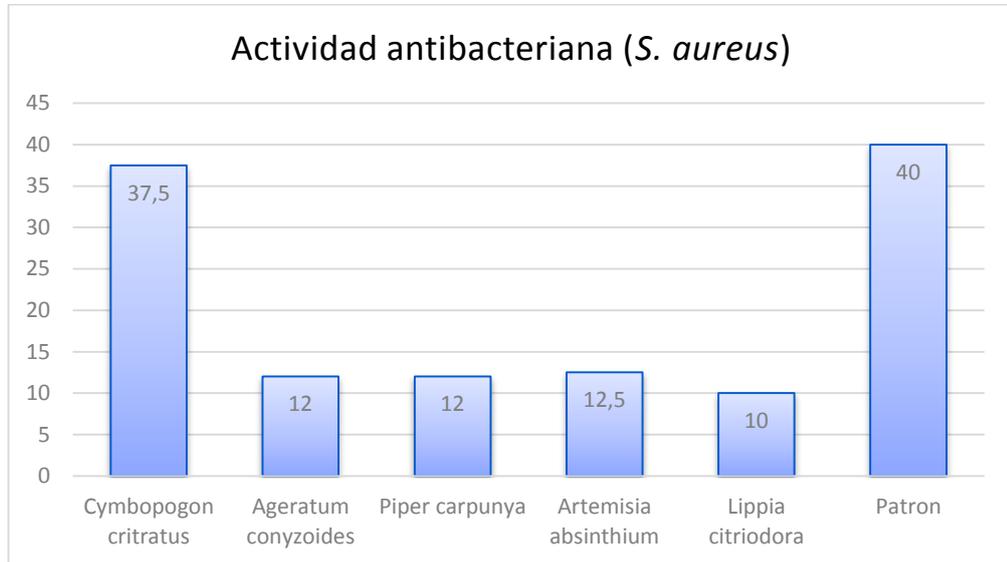


**Fuente:** Valverde, 2015

Los aceites esenciales (AE) en su composición química están compuestos por una mezcla formada de terpenos y no terpenos (TABORNA y MENDOZA., 2010). Las muestras de los aceites evaluados, presentaron una composición química diversa para cada especie, la composición química puede variar en muestras de la misma especie dependiendo del habitat, el clima y las variables agronómicas (ANTOLINES, 2008).

### 4.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

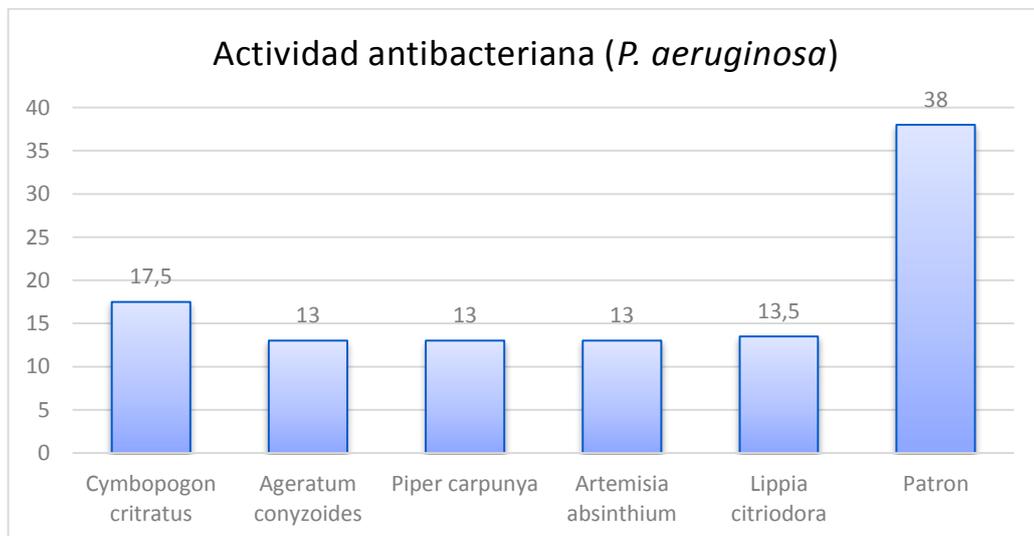
**Figura 18.-** Representación gráfica de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales estudiados ante la *S. aureus*.



**Fuente:** Valverde, 2015

En los resultados obtenidos se puede observar que el aceite esencial obtenido de las hojas, que presenta un mayor halo de inhibición para *S. aureus*, es el aceite esencial de *C. citratus*, poseyendo una actividad antibacteriana muy fuerte, y el que presenta menor halo de inhibición es el aceite esencial de *Lippia citriodora*.

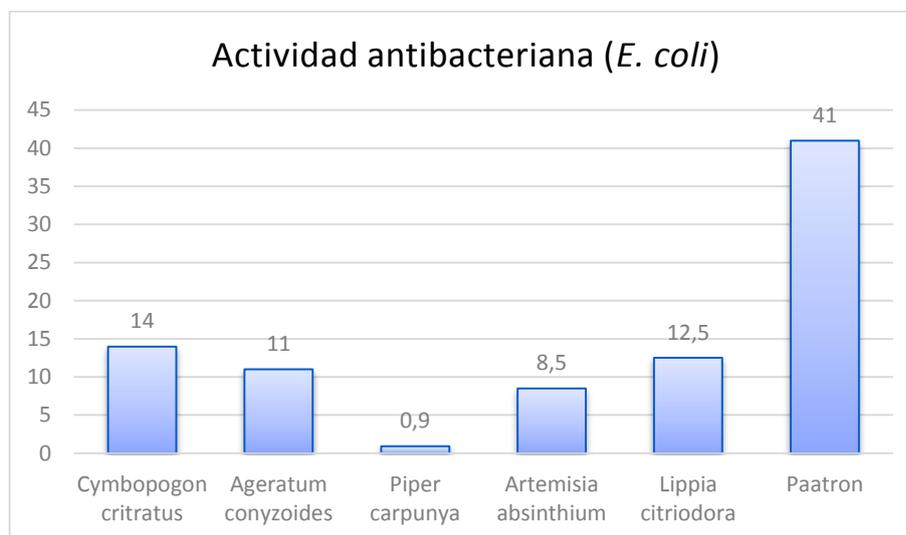
**Figura 19.-** Representación gráfica de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales estudiados ante la *P. aeruginosa*



**Fuente:** Valverde, 2015

El halo de inhibición de mayor tamaño contra *P. aeruginosa* es el de *C. citratus*, por lo cual esta especie mostro una actividad antibacteriana fuerte, y *A. conyzoides*, *P. carpunya* y *A. absinthium* tienen un menor halo de inhibición.

**Figura 20.-** Representación gráfica de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales estudiados ante la *E. coli*.



**Fuente:** Valverde, 2015

Para *E. coli*, el aceite esencial de *C. citratus* presenta un mayor halo de inhibición, y el que menor halo de inhibición tiene contra *E. coli* es el aceite esencial de *P. carpunya* en un valor menor.

El método utilizado se optimizó en lo concerniente a sensibilidad, repetividad y cuantificación. Los aceites esenciales de las especies vegetales demostraron una actividad bacteriana contra los organismos utilizados *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Para comprobar los resultados obtenidos se realizaron réplicas, además de utilizar un patrón que en este caso fue el cloranfenicol, para la respectiva investigación de la actividad antibacteriana.

Los cinco aceites esenciales de las especies vegetales utilizadas en esta investigación resultaron ser antibacterianos.

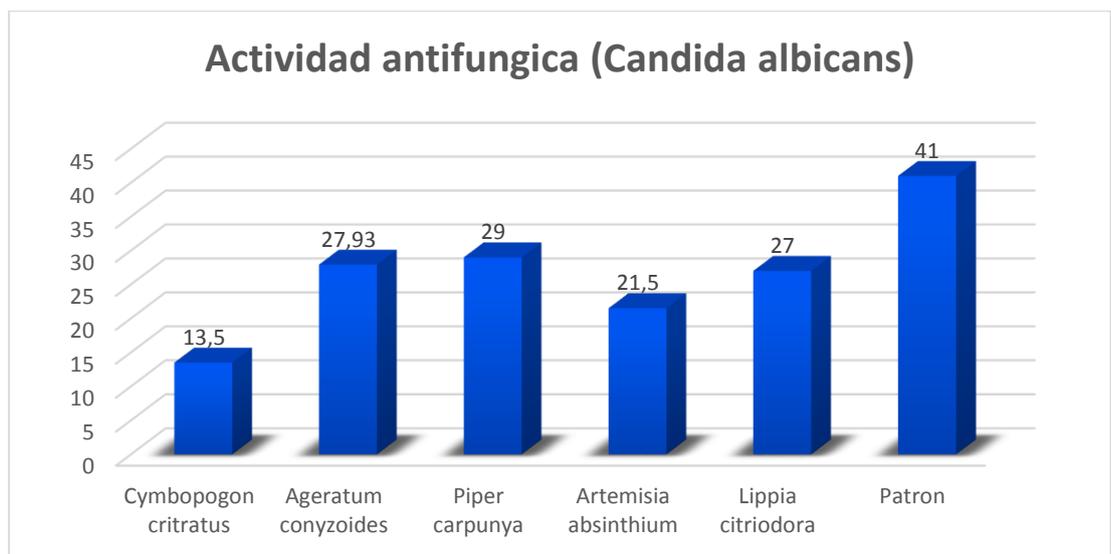
Los antimicrobianos estudiados pueden ser fácilmente extraídos mediante hidrodestilación. El uso popular de estas especies vegetales utilizadas muestra una baja toxicidad, la cual sería muy importante en la elaboración de medicamentos antimicrobianos.

Estudios realizados muestran la evolución antimicrobiana de aceites esenciales frente a las mismas cepas bacterianas utilizadas en esta investigación, además de usar el ciprofloxacina también usaron la griseofulvina como control positivo (LIZCANO y VERGARA, 2008).

Para el uso del patrón se tuvo en cuenta que sea un antibiótico de amplio espectro activo en técnica *in vitro* contra un gran número de bacterias, ya que previene la formación de enlaces peptídicos y la síntesis proteica en una gran variedad de organismos Gram negativos y Gram positivos, es por esto que se usó ciprofloxacina, ya que en varios estudios sobre actividad antimicrobiana ha sido utilizado (DAUD *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2010; VALENCIA *et al.* 2008).

#### 4.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

**Figura 21.-** Representación gráfica de la actividad antifúngica de los aceites esenciales estudiados ante la *C. albicans*



**Fuente:** Valverde, 2015

La actividad antifúngica dio como resultados que para *C. albicans* el aceite esencial que presento mayor halo de inhibición fue el de *P. carpunya*, con muy poca diferencia le siguen los aceites esenciales de *A. conyzoides* y *L. citriodora* y el de menor halo de inhibición fue el de *C. citratus*.

La solución esporangial de hongos que se utilizo fue de cepas de *C. albicans*, porque es un hongo que es muy frecuente en nuestro medio, es causante de micosis superficiales o profundas, tanto orales como cutáneas o vaginales.

Los trabajos publicados en los años 60 y 70 por varios grupos en USA (Armstrong, Bennett, Bodey y Fainstein, Hughes, Kozinn y Taschdjian, Louria, McMillan y Law y

Remington) fueron altamente influyentes en atraer la atención a los problemas causados por las fatales infecciones diseminadas por *Cándida* en huéspedes altamente inmunocomprometidos, tales como pacientes con cáncer, pacientes con quemaduras y pacientes recuperados de cirugía principal (CARDENAS, 2000).

Autores señalan que han usado en investigaciones al género *C. albicans* (CANELA *et al*, 2014), observan que aceites como el de *Aristolochia gibertii* no presenta actividad antifúngica contra *C. albicans*.

#### 4.5. ENSAYO DE LETALIDAD O TOXICIDAD CONTRA *Artemia salina*

**Tabla 7.-** Porcentaje de mortalidad por efecto del aceite esencial de *C. citratus* contra *A. salina*

Concentración (mg/ml)	24 horas			48 horas		
	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>
1000	24	24	100	24	24	100
100	24	24	100	24	24	100
10	24	0	0	24	0	0
1	27	0	0	27	0	0

a: % mortalidad= (Número de organismos muertos /Número de organismos expuestos)x100

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 8.-** Porcentaje de mortalidad por efecto del aceite esencial de *A. conyzoides* contra *A. salina*

Concentración (mg/ml)	24 horas			48 horas		
	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>
1000	25	25	100	25	25	100
100	25	25	100	25	25	100
10	24	0	0	24	0	0
1	26	0	0	26	0	0

a: % mortalidad= (Número de organismos muertos /Número de organismos expuestos)x100

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 9.-** Porcentaje de mortalidad por efecto del aceite esencial de *P. carpunya* contra *A. salina*

Concentración (mg/ml)	24 horas			48 horas		
	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>
1000	30	30	100	30	30	100
100	32	32	100	32	32	100
10	31	0	0	31	0	0
1	29	0	0	29	0	0

a: % mortalidad= (Número de organismos muertos /Número de organismos expuestos)x100

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 10.-** Porcentaje de mortalidad por efecto del aceite esencial de *A. absinthium* contra *A. salina*

Concentración (mg/ml)	24 horas			48 horas		
	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>
1000	25	25	100	25	25	100
100	25	25	100	25	25	100
10	29	0	0	29	0	0
1	24	0	0	24	0	0

a: % mortalidad= (Número de organismos muertos /Número de organismos expuestos)x100

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 11.-** Porcentaje de mortalidad por efecto del aceite esencial de *L. citriodora* contra *A. salina*

Concentración (mg/ml)	24 horas			48 horas		
	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>	Organismos totales ensayados	Organismos totales muertos	% de mortalidad <sup>a</sup>
1000	30	30	100	30	30	100
100	36	36	100	36	36	100
10	30	0	0	30	0	0
1	31	0	0	31	0	0

a: % mortalidad= (Número de organismos muertos /Número de organismos expuestos)x100

**Fuente:** Valverde, 2015

En los resultados de los porcentajes de mortalidad por efectos de los aceites esenciales analizados, no tuvieron diferencia ya que en la concentración de 1000 y 100mg/ml, murieron todos los nauplios, mientras que en la concentración de 10 y 1mg/ml no murió ninguno.

**Tabla 12.-** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de *C. citratus*.

Método estadístico	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	31,62	10,00	100,00
Moving Average	-	-	-
Probit	-	-	-
Logit	32,32	0,00	∞

CL<sub>50</sub>= 31,62µg/ml

(-) = No arrojo ningún dato estadístico

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 13.-** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de *A. conyzoides*

Método estadístico	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	31,57	10,00	100,00
Moving Average	-	-	-
Probit	-	-	-
Logit	31,60	0,00	∞

CL<sub>50</sub>= 31,57 µg/ml

(-) = No arrojo ningún dato estadístico

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 14.-** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de *P. carpunya*

Método estadístico	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	31,59	10,00	100,00
Moving Average	-	-	-
Probit	-	-	-
Logit	31,25	0,00	∞

CL<sub>50</sub>= 523,80 µg/ml

(-) = No arrojo ningún dato estadístico

**Fuente:** Valverde, 2015

**Tabla 15.-** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de *A. absinthium*.

Método estadístico	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	31,76	10,00	100,00
Moving Average	-	-	-
Probit	-	-	-
Logit	3,09	0,00	∞

CL<sub>50</sub>= 31,76 µg/ml

(-) = No arrojo ningún dato estadístico

**Fuente:** Valverde, 2015

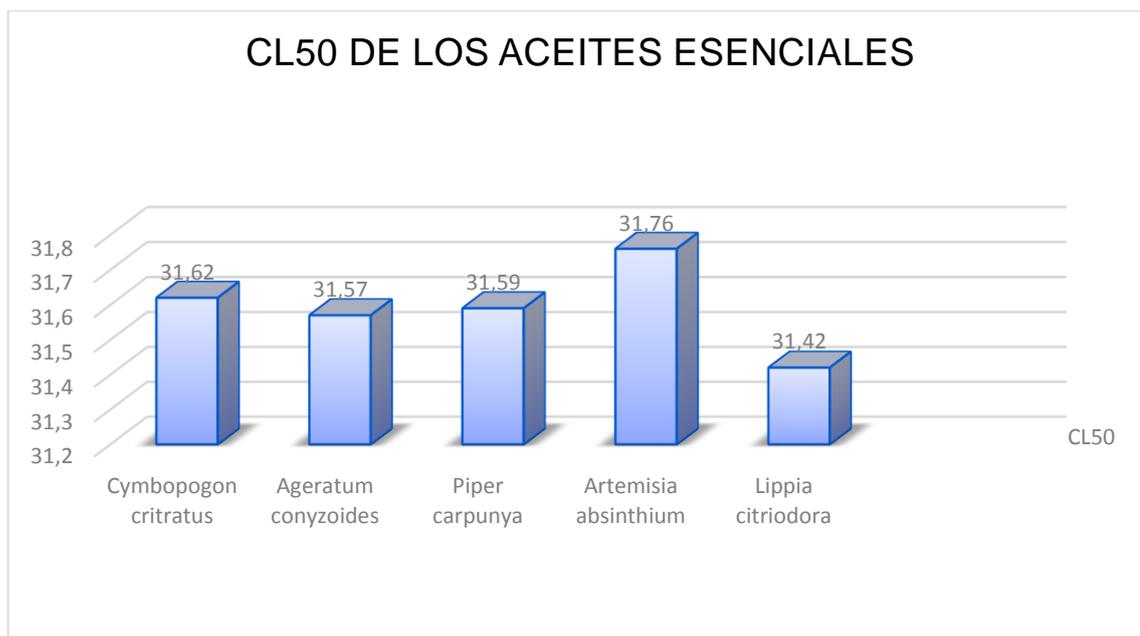
**Tabla 16.-** Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del aceite esencial de *L. Citriodora*.

Método estadístico	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límites de confianza del 95%	
		Mínimo	Máximo
Binomial	31,42	10,00	100,00
Moving Average	-	-	-
Probit	-	-	-
Logit	30,75	0,00	∞

CL<sub>50</sub>= 31,42µg/ml

(-) = No arrojo ningún dato estadístico

**Fuente:** Valverde, 2015



**Figura 25.-** Representación gráfica de los datos estadísticos obtenidos CL<sub>50</sub>

El grado de mortalidad de los nauplios se determinó transcurridas 24 horas desde el inicio del bioensayo y, luego se anotó el número de organismos muertos para cada una de las concentraciones. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de mortalidad y la concentración letal media (CL50) utilizando un programa estadístico de computación (Probit, Logit o Binomial), diseñado con un límite de confianza de 95% (STEPHAN, 1977).

Para la evaluación tóxica de los aceites esenciales de las especies de plantas se hace una correlación con los compuestos químicos, ya que depende de ellos la toxicidad que puede presentar el aceite y así proceder a la clasificación de los aceites según los valores de CL<sub>50</sub> (JARAMILLO *et al*, 2007). Los CL<sub>50</sub> de los aceites varían solo entre el 31,42 y 31,76 µg/ml, no existió una gran diferencia entre estos aceites esenciales, ya que solo en las disoluciones de 1000 y 100 murieron todos los nauplios de *A. salina*. Estas esencias poseen letalidad o toxicidad muy significativa, CL<sub>50</sub><100 µg/ml, por lo cual se presume que los mismos podrían tener actividad antitumoral.

## 5. CONCLUSIONES

Entre los aceites esenciales obtenidos de las especies vegetales analizadas, el mayor rendimiento lo presentó la guabiduca.

La composición química de los aceites esenciales, determinada por CG/EM, mostró una gran diversidad de tipos de compuestos químicos con contenidos (%) diferentes para los mismos, además de la presencia de algunos componentes comunes para dichas esencias.

De la actividad antibacteriana, resalta que el aceite que más inhibe a las cepas de las bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, es el de las hojas de *Cimbopogon citratus* (hierba luisa), ya que para las tres bacterias analizadas, éste fue el que presentó los mayores diámetros de los halos de inhibición. Lo cual evidencia su posible empleo como bactericida.

En la determinación de la actividad antifúngica, se demostró que el aceite esencial de *Piper carpunya* (guabiduca) mostró el mayor efecto fungicida, con mayores halos de inhibición; por lo tanto es posible su uso como antimicótico.

En el bioensayo contra nauplios de *Artemia salina*, se determinó que las esencias analizadas poseen una letalidad o toxicidad muy significativa,  $CL_{50} \ll 100 \mu\text{g/ml}$ , por lo cual se presume que las mismas podrían tener actividad antitumoral.

## 6. RECOMENDACIONES

Ahondar en la investigación de estas especies vegetales ya que tienen un potencial alto para combatir las células cancerígenas.

Profundizar el estudio en la especie *Cymbopogon citratus*, ya que esta es especie vegetal que presenta mayor inhibición al crecimiento de las bacterias.

Promover el uso, consumo y utilización de estas especies vegetales ya que poseen estos potenciales muy diversos.

Realizar una investigación de estas especies vegetales pero de diferentes partes botánicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMES, M., MENDOZA, E., OSPINA, L. Estudio del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* Bailey. p. 95-100 <<http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V4N1P95-113.pdf>>
2. ANTOLINEZ, J., DE COLMENARES, N., USABILLAGA, A., DARGHAN, E., LINARES, S. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon Citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. 2008(33)9. <[http://http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008000900014](http://http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000900014)>.
3. BAUER, A., KIRBY, A., SHERRIES, J. y TURK. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4) 1966: 493-496.
4. *Big Tobacco's List of 599 Cigarette Additives*. Dazeley, Peter. 2015. 2015, Medical Review Board.
5. CARDENAS, C. Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación. Universidad de la Laguna. <http://ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp121.pdf>>
6. CANELA, N., ALVARENGA, N., FERRO, E., ZACCHINO, S., GETTE, M. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Aristolochia gibertii* Hooker <[http://www.qui.una.py/botanica/cq/Vol%2011\(1\\_2\)%202012/1\\_Actividad%20antifungica%20del%20aceite%20esencial%20de.pdf](http://www.qui.una.py/botanica/cq/Vol%2011(1_2)%202012/1_Actividad%20antifungica%20del%20aceite%20esencial%20de.pdf)>
7. CANNA. (2015). Los terpenos-Cannabis sativa L. Revista de la fundación CANNA.
8. CURTO, E. Artemia el camaron de sal . Academia Nacional de Ciencias, CORDOBA, Argentina.<<http://www.promarmarchiquita.com.ar/subsitios/publicaciones/documents/c09-Artemiaelcamarondelasal.pdf> >

9. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. Edición 2012. Ketoconazol. Disponible en: <http://www.pediamecum.e>.
10. CARLINI, E., SILVA, A., DA SILVERIA, N., FROCHTENGARTES, M. y BUENO, O. Diario de Etnofarmacología. 17(1)1986. p. 37-64. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874186900723>>.
11. CERON, C. Plantas de los Andes Ecuatorianos. Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador. 2006. 285p. <<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>>.
12. CERVANTES, E., GARCIA, R., SALAZAR., P. Características generales del Staphylococcus Aureus. 2014. p. 28-30. <<http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>>
13. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Editorial Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnologías para el Desarrollo. 1995. p. 45-46
14. CRUZ, A., RODRIGUEZ, N., RODRIGUEZ, C. EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum* 2010(13)2. <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262010000200014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262010000200014&script=sci_arttext)>
15. CURTO, E., Artemia, el camarón de sal. Universidad Nacional de Córdoba. 2006. p.181-193 <<https://www.yumpu.com/es/document/view/14886977/artemia-el-camaron-de-la-sal-promar>>
16. DAZELEY, P. (2015). Big Tobacco's List of 599 Cigarette Additives. Medical Review Board.

17. DAUD, A., HABIB, N., SANCHEZ, A. Actividad antimicrobiana de extractos alcohólicos de hojas y corteza de *Polylepis australis* Bitter (queñoa). 2008(13)3<[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962008000300006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962008000300006&script=sci_arttext)>
18. DELLACASSA, E., BANDONI. Revista de Fitoterapia. 2003 (3)1. p. 19-21 <[http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF3\\_1\\_HIERBALUISA.pdf](http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF3_1_HIERBALUISA.pdf)>
19. DE PAULA, J. y MARTÍNEZ, A. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev. Cubana Plant. Med. 5(1) 2000: 26-9.
20. FALEIRO, P., Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Universidad Complutense de Madrid. España. 2010. p 26.
21. *Food and Chemical Toxicology*. Lui, T. 1999. 1999, págs. Págs. 697–702.
22. GONZALEZ, A. Ajenjo (*Artemisia absinthium*). 2004. 3p. <<http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/facts/Ajenjo-hoja%20datos%20-Jul%2004.pdf>>
23. GUARNIZO, A., y MARTÍNEZ, P. Experimentos de Química Orgánica. Editorial: Ediciones Elizcom. Colombia. 2009. 89p. <[http://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=Otm5wsEeKYEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)>
24. GUTIERREZ, M., DOGUET, M., La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. 2002. p. 35-41. <<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/2733/1/5CROMGASES.pdf> >
25. HARRINGTON, J., **Spacebound Bacteria Inspire Earthbound Remedies. 2011.** <[http://www.nasa.gov/topics/shuttle\\_station/features/pseudomonas\\_prt.htm](http://www.nasa.gov/topics/shuttle_station/features/pseudomonas_prt.htm) >

26. JARAMILLO, B., TADEO, J., MULOZ K., Composición química volátil aguda (CL50) frente a *Artemia salina* del aceite esencial del cotron malambo colectado en la costa norte de Colombia. 2007. p. 299-302. <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903383>>
27. JIMENEZ, J. Medicina naturista fitoterapia. Universidad de Verano de Lanzarote. <[http://www.medicina-naturista.net/salon\\_lectura/medicina\\_naturista\\_fitoterapia.pdf](http://www.medicina-naturista.net/salon_lectura/medicina_naturista_fitoterapia.pdf)>.
28. *Laboratory evaluation of mosquito repellents against Aedes albopictus, Culex nigripalpus, and Ochlerotatus triseriatus (Diptera: Culicidae).* **Barnard, D.R y Xue, R. 2004.** 2004, Journal Medical Entomol, págs. Págs. 726-730.
29. LAFORET, L. Estudio de pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Universidad de Valencia.
30. < <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31891/laforet.pdf?sequence=1>>.
31. *Los terpenos-Cannabis sativa L.* **CANNA. 2015.** 2015, Revista de la fundación CANNA.
32. LIZCANO, A., VERGARA, J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* Frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos. Pontificia Universidad Javeriana.
33. < <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>>
34. LLAMA, F., ACEDO, C. Lo que usted debe saber de plantas útiles. Universidad de León. <<http://www.saber.es/web/biblioteca/libros/plantas-utiles/plantas-utiles.pdf>>
35. LOPEZ, M., *Estafilococo aureus...* patogenicidad. 2013. <<http://hmpmps.blogspot.com/2013/02/estafilococo-aureus-patogenicidad.html>>
36. LUI, T. (1999). Food and Chemical Toxicology. Págs. 697–702.
37. MADUBUNYI, I. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. Intern. J. Pharm., 33(3)1995: 232-237.

38. MARTÍNEZ A. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, Medellín. Facultad de Química Farmacéutica. 2003. <[farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf](http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf)>.
39. MARTINEZ, R. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibiótico de administración intravenosa a través de método in vitro. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2005. p. 88.
40. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Dewick, Paul. M., 2009. 2009, John Wiley and Sons, Vol. ISBN 9780470741689.
41. MENDOZA, D., TABORDA, M., Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (acari: pyroglyphidae). 2010. P. 21-30.<[http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9\(2\)\\_4.pdf](http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9(2)_4.pdf)>.
42. MEYER, B., FERRIGNI, N., PUTNAM, J., JACOBSEN, L., NICOLS, D. y MCLAUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1) 1982: 31-34.
43. MONGELLI, E., COUSSIO, J. y CICIA, G. Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales Argentinas mediante el bioensayo de *Artemia Salina* Leach. 12 1995: 1-3.
44. MONKS, N.; C, LERNER.; A, HENRIQUES.; F, FARIAS.; E, SCHAPOVAL.; E, SUYENAGA.; A, DA ROCHA.; G. SCHWARTSMANN. y B, MOTHE. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 281: 1-12.
45. MORENO, A., VARGAS, L., CARMONA, Y. Extracción de Aceites esenciales. <<http://extraccioneaceitesesenciales.wordpress.com/tag/hidrodestilacion/>>

46. OKUNADE, A. Fitoterapia. 73(1)2002: 1-16.  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X01003641>>
47. ORAV, A., RAAL, A., ARAK, E., MUURISEPP, M. y KAILAS, T. Composition of the essential oil of *Artemisia adsinthium* of different geographical origin. 2006. p. 155-156. <[http://www.kirj.ee/public/va\\_ke/chem-2006-3-4.pdf](http://www.kirj.ee/public/va_ke/chem-2006-3-4.pdf)>.
48. PINO, O. y JORGE, F. Ensayo de *Artemia salina*. Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y Químicos de productos Naturales. 22 2010: 34-35.
49. PINZON, I., Estimación de los requerimientos alimenticios para el crecimiento del braquiópodo *Artemia franciscana* Kellog, 1906) alimentado con la diatomea *Chaetoceros muelleri* (Lemmerman) orientada a la producción masiva. Universidad de Colima. 2000.
50. QUILEZ, A., BERENQUER, B., GILARDONI, G., SOUCCAR, C., MENDOZA, S., OLIVEIRA, L., MARTÍN, M. y VIDARI, G. Journal of Ethnopharmacology. 128(3)2010:523-589.  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000108X>>
51. QUINTANA, K. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de achillea (*Achillea millefolium* L.) y guaviduca (*Piper carpunya* Ruiz & Pav.) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. 2012. p. 29-30.  
<<http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/2601/1/56T00378.pdf>>
52. QUIRANTES, R., HERRANZ, M., FUNES, L., BORRAS, I., MICOL, V., SEGURA, A. y FERNÁNDEZ, A. Phytomedicine. 20(12)2013: 112-1118.  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711313002067>>.
53. RICCIARDI, G., RICCIARDI, A., BANDONI, A. Fitoquímica de Verbenáceas (Lippias y Aloysias) del Nordeste Argentino. <<http://file:///C:/Users/Windows%208/Downloads/aceites-verbenaceas.pdf>>.
54. RUIZ, L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportacion al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contibuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Universidad de

Bacerlona.[http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf?sequence=1)>

55. SALAZAR, C. Metabolitos secundarios presentes en la planta waltheria berteroi (sterculiaceae) colectada en el estado amazonas (venezuela) y su actividad antimicrobiana y letal. Universidad de Oriente. <[http://ri.bib.udo.edu.ve/bitstream/123456789/3212/1/TESIS\\_CS.pdf](http://ri.bib.udo.edu.ve/bitstream/123456789/3212/1/TESIS_CS.pdf)>.
56. SANCHEZ, L., NEIRA, A., Bioensayo general de letalidad en artemia salina, a las fracciones del extracto etanólico de psidium guajava. I y psidium guineense. Sw. 2005. p. 40-45. <<http://file:///C:/Users/Windows%208/Downloads/76-288-1-PB.pdf> >
57. SANCHEZ, L., Micosis oportunistas. 2011. <<http://es.slideshare.net/jonas120/micosis-oportunistas-9234561> >.
58. SHIVA, C. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universidad de Barcelona. <<http://www.tesisenxarxa.net/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf?sequence=1> >
59. SIERRA, M., ZARATE, Determinación de la concentración letal media (cl50-48) del plomo y plata en los vertimientos de una industria galvanica, mediante ensayos toxicológicos sobre daphnia magna. Universidad de la Salle. <<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14115/T41.08%20S17d.pdf?sequence=1>>
60. SOLARES, J. Validación farmacológica de la actividad diurética de las infusiones acuosas de las hojas de mejorana (Ageratum conyzoides L.), chalcupha (Rauvolfia tetraphylla L.) e infusión acuosa de la raíz de valeriana (Valeriana prionophylla Standl.) en ratas albinas. Universidad San Carlos de Guatemala. 2008. p. 7-8. <[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2653pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2653pdf)>.
61. SOTO, R., VEGA, G. y TAMAJON A. Instructivo técnico del cultivo de Cymbopogon citratus (D.C) Stapf caña santa, Rev Cubana Plant Med, 2002(2)

2002. <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962002000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962002000200007)>
62. STEPHAN, C. 1977. Methods for calculating in LC50. En: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. Mayer y J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pensilvania. Pág. 65.
63. SUAREZ, T., VERA. V., Farmacología clínica. Uso y abuso de ciprofloxacina. Medisan 2011.15(3):384
64. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID. Tetraciclinas, cloranfenicol y antibióticos polipeptídicos. Guía 65. <[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a55-tetraciclinas,\\_cloranfenicol\\_y\\_antibioticos\\_polipeptococ.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a55-tetraciclinas,_cloranfenicol_y_antibioticos_polipeptococ.pdf)>.
65. VALAREZO, E. Aceites esenciales: generalidades, extracción, caracterización y usos. Instituto de Química Aplicada. Universidad Técnica Particular de Loja. 2008. p. 3-14 <<http://memorias.utpl.edu.ec/sites/default/files/documentacion/ingenieria-quimica/utpl-ingenieria-quimica-2008-aceites-esenciales.pdf>>.
66. VALENCIA, G., GARIN, M., TELLEZ, M., DURAN, E. Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de Pleurotus djamoR. 2008(22). <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802008000300014](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300014)>
67. VARGAS, A., BOTTIA, E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de bolívar y el peñón – Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. <<http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/infraestructura/cibimol/tesis%20cibimol/Edwin%20Bottia%20y%20Adriana%20Vargas.pdf>>.
68. VIDAL, J., CANIZALEZ, A., GUTIERREZ, J., NAVARRO, F., Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena.

2007. p. 376-378. <[http://bvs.insp.mx/rsp/\\_files/File/2007/Septiembre%20Octubre/7-patogen.pdf](http://bvs.insp.mx/rsp/_files/File/2007/Septiembre%20Octubre/7-patogen.pdf)>

## ANEXOS



**Anexo 1:** Preparación de diluciones para el bioensayo de letalidad en nauplios de *Artemia salina*.



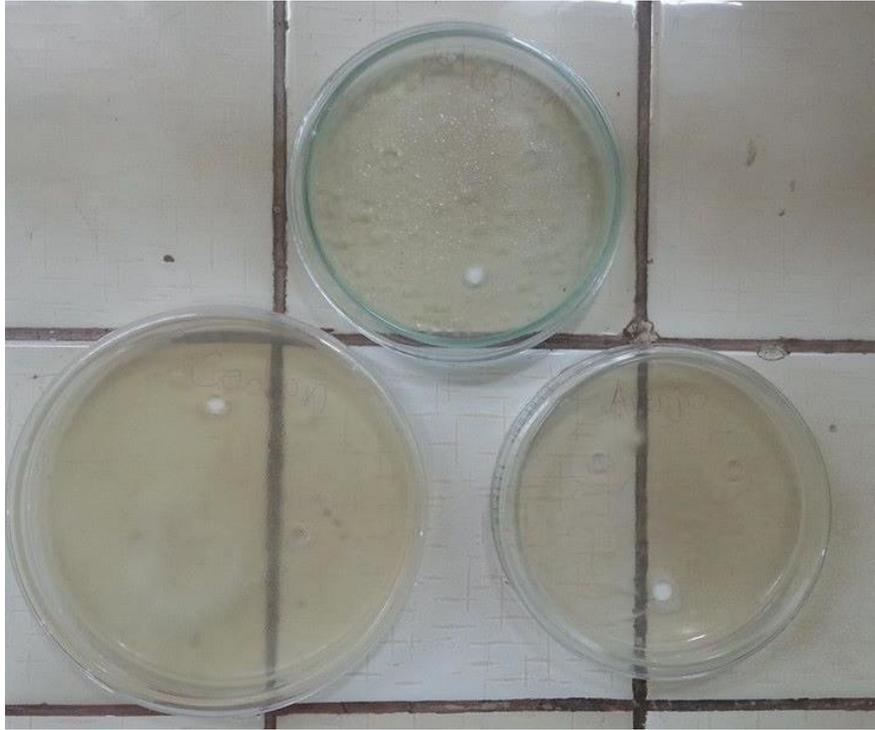
**Anexo 2:** Contando y colocando los nauplios de *Artemia salina* en los tubos donde están las soluciones.



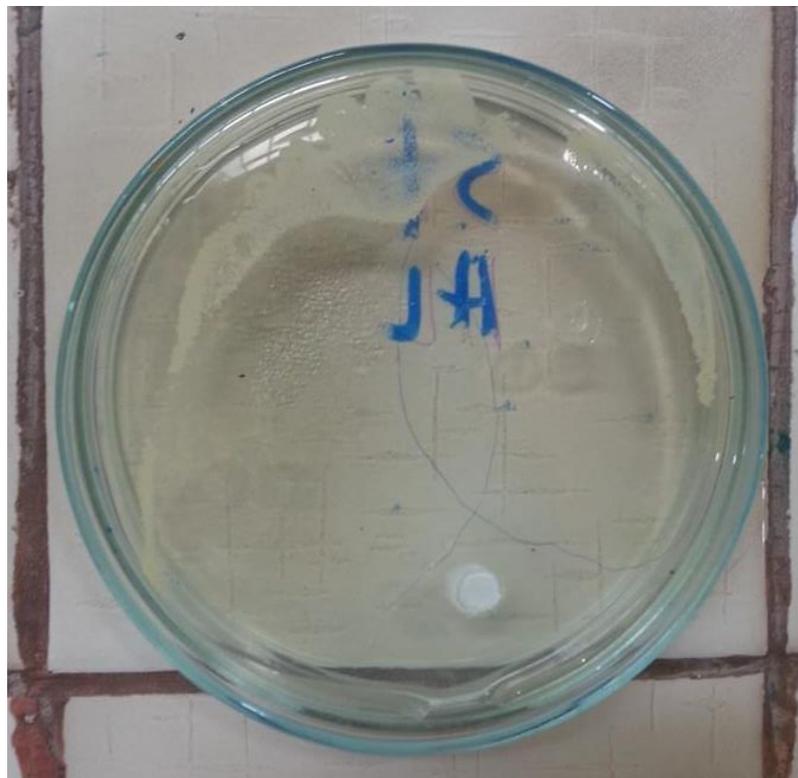
**Anexo 3:** Hidrodestilación de aceite esencial.



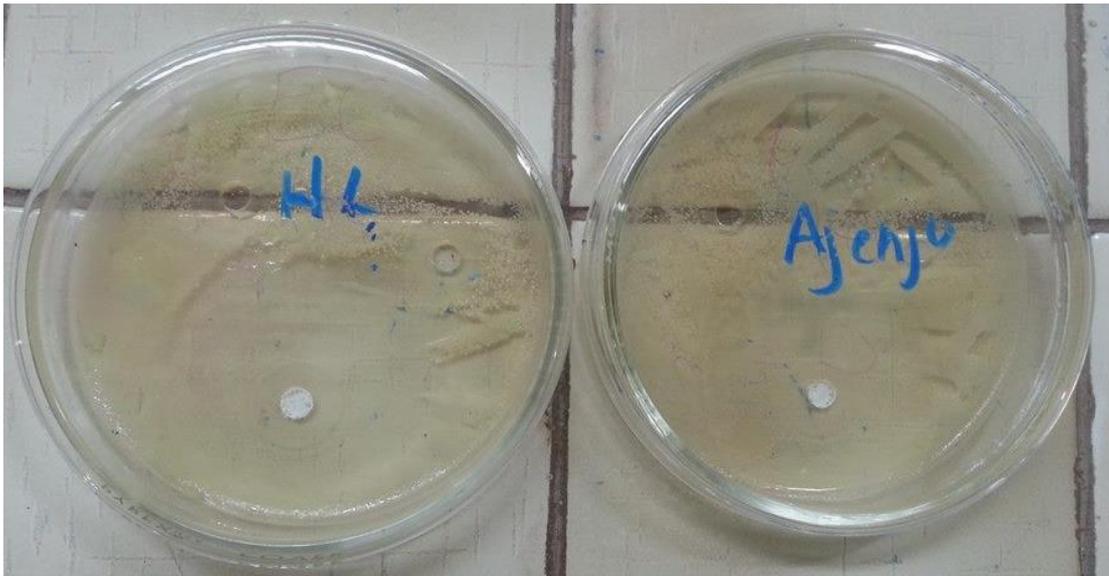
**Anexo 4:** Separación de aceite esencial.



**Anexo 5:** Siembra de ajeno, cedrón y mastrante, para posterior observación contra *C. albicans* usando ketoconazol como patrón.



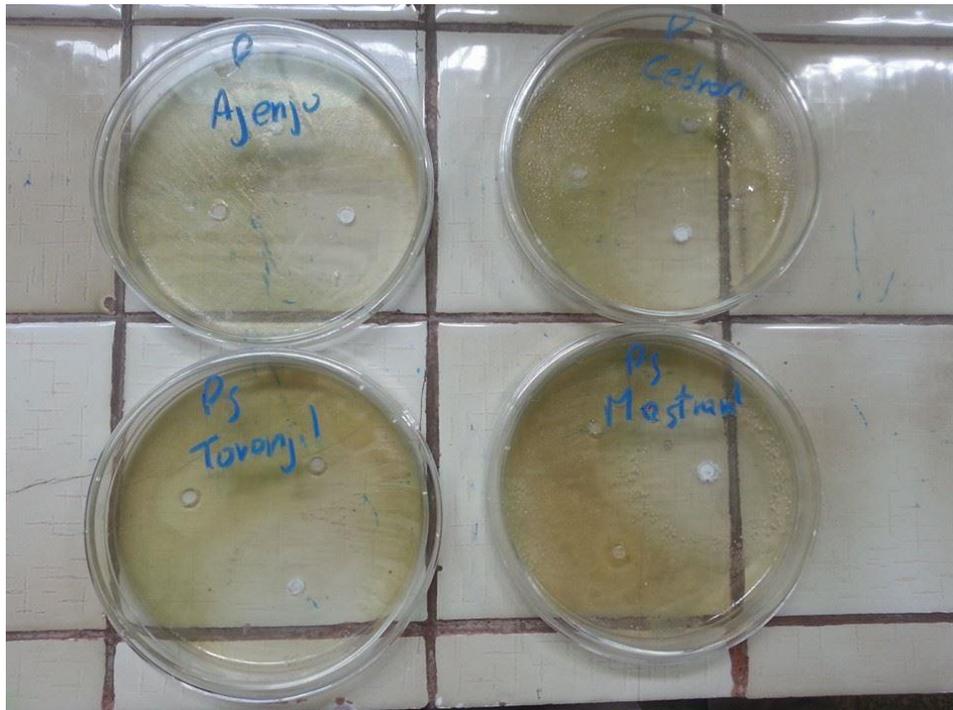
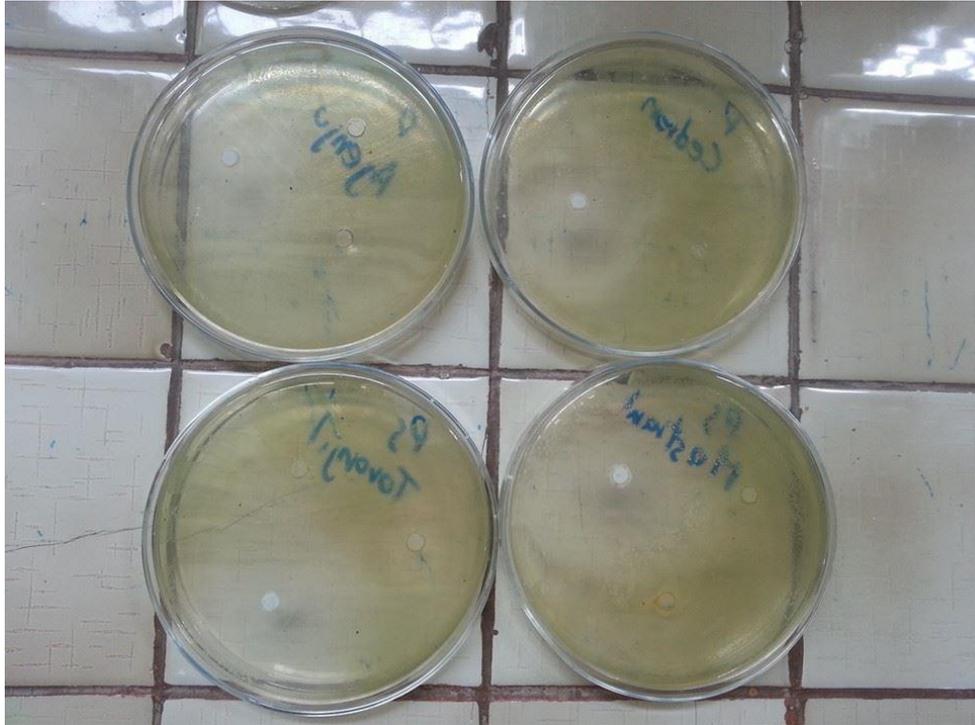
**Anexo 6:** Halos de inhibición del aceite esencial de hierba luisa contra *S. aureus*



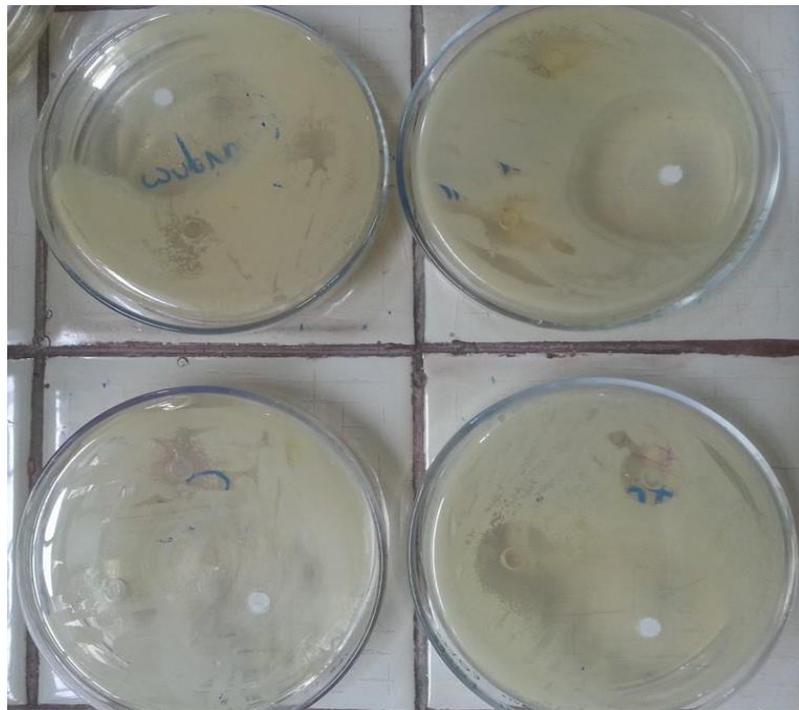
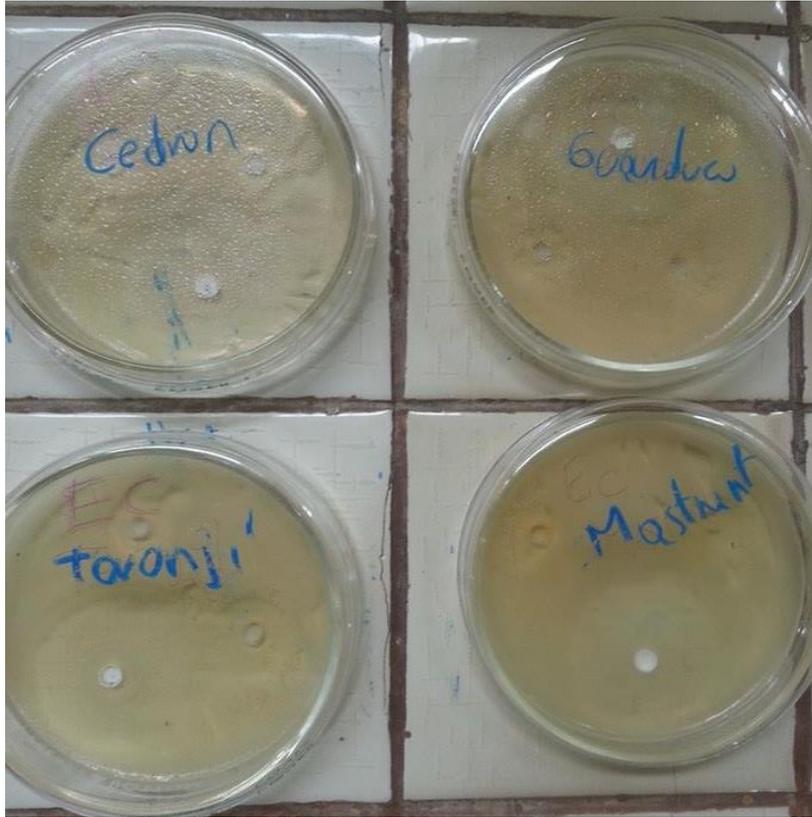
**Anexo 7:** Halos de inhibición del aceite esencial de hiebaluisa y ajenjo contra *E. coli*



**Anexo 8:** Halos de inhibición del aceite esencial de hierba luisa y guabiduca contra *P. aeruginosa*



**Anexo 9:** Halos de inhibición del aceite esencial de ajeno, cedrón, mastrante contra *P. aeruginosa*



**Anexo 9:** Halos de inhibición del aceite esencial de cedrón, guabiduca y mastrante contra *E. coli*.