



Composición química (volátiles), caracterización físico química y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador

Carlos Julio Tubay Bermúdez

2018



**Composición química (volátiles), caracterización físico
química y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia
alba* de Ecuador**

Disertación para la obtención del Grado de Máster en Gestión de Calidad
y Seguridad Alimentaria

Carlos Julio Tubay Bermúdez

Trabajo realizado bajo la orientación de:

Dra. Clélia Neves Afonso, Professora Adjunta da ESTM-IPLeiria.

Dr. Alex Dueñas Rivadeneira y Dr. Armando Moro de la Peña,
Professores da Universidad Técnica de Manabí

2018

Título: Composición química (volátiles), caracterización físico química y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador

Copyright©: Carlos Julio Tubay Bermúdez

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnología do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios, a mis padres el Sr. Ulbio Tubay Lucas y la Sra. Berthilda Bermúdez Basurto, a mis hermanos Pablo Rene, Karina Elizabeth, Darwin Humberto y demás familiares, por su apoyo y guía permanente en cada paso que doy.

A mis tutores de tesis de maestría Dr. Alex Dueñas Rivadeneira, Dr. Armando Moro Peña y Dra. Clélia Neves Afonso por haber dado todo de sí para la conclusión de este trabajo, agradezco su profesionalismo, su amistad y confianza.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia Tecnología y Educación (SENESCYT) por haberme otorgado una beca que me ha permitido realizar mis estudios de cuarto nivel en Instituto Politécnico de Leiria de Portugal (IPL).

A la Escuela Superior de Turismo y tecnología de Mar (ESTM) del IPL a su director y a todo el personal administrativo, de docentes y de servicio Social por todo su apoyo brindado y haberme acogido en un entorno familiar durante mi estadía en Portugal.

A la Universidad Técnica de Manabí, a su señor Rector Dr. Vicente Veliz, al Ing. Emilio Cedeño, Ing. Gissella Cedeño, por haber facilitado las instalaciones donde se desarrolló la investigación.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de País Vasco (UPV/EHU) España y a su director el Dr. Néstor Exebarria por su colaboración en el análisis de componentes volátiles de los aceites esenciales de *Lippia alba*.

También mi agradecimiento al Dr. Luis Bravo, Dra. Dania Feraud, Dr. Joan Rodríguez, Ing. Luis Zambrano, Ing. Sabina Mera, Dr. Ulbio Alcívar, Ing. Nataly Giler, Ing. Larissa Sacoto, Sr. Pedro Lucas, Sra. Delfina Llerena por su colaboración en la investigación.

Resumen

Lippia alba es una especie arbustiva ampliamente distribuida en el centro y sur de América. Su aceite esencial es reconocido en la literatura por contener gran cantidad de compuestos bioactivos (terpenoides, cetonas, polifenoles, éteres, entre otros) componentes con actividad biológica de gran interés (antioxidante, antimicrobiana, entre otras) ante lo cual podrían ser aplicados como conservantes naturales en industria alimentaria. Debido a las diferencias edafoclimáticas de cada país la composición volátil del aceite esencial puede variar coexistiendo ciertos quimiotipos como: citral, linalol, carvona, mirceno, cariofileno, neral, α -tirpeneol. Ecuador como país megadiverso conserva el 10% de todas las especies vegetales del mundo. Sin embargo hasta la fecha no existían estudios sobre esta especie. El objetivo del presente trabajo es evaluar por primera vez la composición y actividad biológica (actividad antioxidante y antimicrobiana) del aceite esencial obtenido de *Lippia alba* del Ecuador. El material vegetal fue obtenido de especímenes vegetales de la provincia de Manabí. La extracción fue realizada mediante hidrodestilación (Clevenger). Se evaluaron parámetros fisicoquímicos tales como: densidad, pH e índice de refracción. La composición volátil fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). La capacidad antioxidante se evaluó mediante los ensayos 2,2 azino-bis 3-ethybenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), Ferric Reducing/antioxidant power (FRAP) y contenido fenólico (Folin Ciocalteu). La actividad antimicrobiana se determinó por la técnica de difusión y dilución en disco agar. El rendimiento del aceite esencial fue de aproximadamente 1%. Los resultados de los parámetros fisicoquímicos mostraron valores de densidad $0,953 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 5,5 e índice de refracción 1,5110 situándose dentro de los rangos de calidad de los aceites esenciales. Los componentes volátiles mayoritarios identificados mediante CG-MS fueron artemisa cetona (43%) y citral geranial (18%) sugiriendo un nuevo quimiotipo. En la actividad antioxidante, se obtuvieron valores de $23,08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ABTS y $14,916 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para FRAP mientras el contenido fenólico fue de $968 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los ensayos de actividad antimicrobiana mostraron que los microorganismos *Escherichia coli* y *Salmonella* son sensibles al aceite esencial existiendo mayor grado de inhibición en el último microorganismo en concentraciones de 100 y 50% de aceite esencial de *Lippia alba*. Se puede sugerir la existencia de un quimiotipo de aceite esencial obtenido de *Lippia alba*, confirmándose una alta actividad antioxidante y capacidad antimicrobiana con lo que confirma su elevado potencial biotecnológico.

Palabras claves: *Lippia alba*, aceite esencial, GC- MS actividad antioxidante, actividad antimicrobiana

Resumo

Lippia alba é uma espécie arbustiva amplamente distribuída na América central e do sul. O óleo essencial é reconhecido na literatura contém muitos componentes compostos bioactivos (terpenóides, cetonas, polifenóis, éteres entre outros) com actividade biológica de grande interesse (antioxidante, antimicrobiana entre outras), que pode ser aplicado antes como conservantes naturais em na indústria de os alimentos. Devido às diferenças condições edafoclimáticas e agronomicas na composição volátil de óleo de cada país s essencial podem variar de coexistindo certas quimiotipos como citral, linalol, carvona, mirceno, cariofileno, neral, α -tirpeneol. O Equador, como país megadiverso, conserva 10% de todas as espécies vegetais do mundo. No entanto até à data não houve estudos sobre esta espécie. O objectivo deste estudo foi avaliar primeira composição e actividade biológica (antioxidante e antimicrobiana) do óleo essencial obtido de *L alba* Equador. O material vegetal foi obtido de espécimes de plantas da província de Manabí. A extração foi realizada por hidrodestilação (Clevenger). Parâmetros físico-químicos como: densidade, pH e índice de refração foram avaliados. A composição volátil foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) .A capacidade antioxidante foi avaliada testando 2,2 azino-bis ácido 3-ethybenzothiazoline-6-sulfónico (ABTS), férrico Redução / antioxidante potência (FRAP) e conteúdo fenólico (Folin Ciocalteu). A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão e diluição do disco de ágar. O rendimento do óleo essencial foi de aproximadamente 1%. Os resultados dos parâmetros físico-químicos apresentaram valores de densidade de 0,953 g • mL⁻¹, pH 5,5 e o índice de refração de 1,5110, ficar dentro das gamas de óleos essenciais de qualidade. Os principais componentes voláteis identificados pelo CG-MS foram artemiss cetona (43%) e geral citral (18%) sugerindo um novo quimiotipo. Actividade antioxidante, os valores de 23,08 mg•L⁻¹ de ABTS e 14,916mg•L⁻¹ foram obtidas por FRAP enquanto o conteúdo fenólico era 968 mg•L⁻¹. Os ensaios de actividade antimicrobiana mostrou que os microrganismos *Escherichia coli* e *Salmonella* são sensíveis ao óleo essencial ter uma maior inibição no primeiro microrganismo em concentrações de 100 e 50% de óleo essencial *Lippia alba*. Pode sugerir a existência de um quimiotipo de óleo essencial obtido a partir de *Lippia alba*, confirmando uma elevada actividade antioxidante e capacidade antimicrobiana confirmando o seu elevado potencial biotecnológico.

Palavras-chave: *Lippia alba*, óleo essencial, GC-MS, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana

Abstract

Lippia alba is a shrub species widely distributed in central and south America. Its essential oil is recognized in the literature for containing a large number of bioactive compounds (terpenoids, ketones, polyphenols, ethers) components with biological activity of great interest (antioxidant, antimicrobial, among others) before it could be applied as preservatives natural in the food industry. Due to the edaphoclimatic differences of each country, the volatile composition of the oil can be mixed with chemotypes such as: citral, linalool, carvone, myrcene, caryophyllene, neral, α -tirpeneol. Ecuador as a megadiverse country conserves 10% of all plant species in the world. However, to date there are no studies on this species. The objective of the present work is to evaluate for the first time the biological and antioxidant activity of the essential oil obtained from *Lippia alba* of Ecuador. The plant material was obtained from the plant specimens from the province of Manabí. The extraction was carried out by hydrodistillation (Clevenger). Physicochemical parameters were evaluated such as: density, pH and refractive index. The azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid (ABTS), ferric reducer / antioxidant The ferric acid / antioxidant reduction is based on the specification of absorbed power gases (FRAP) and phenolic content (Folin Ciocalteu). The antimicrobial activity was determined by the agar disc diffusion and dilution technique. The yield of the essential oil was approximately 1%. The results of the physicochemical parameters were performed with density values of $0.953 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 5.5 and refractive index 1.5110, which were within the quality ranges of the essential oils. The major volatile components identified by CG-MS were artemisa ketone (43%) and geral, citral (18%) suggesting a new chemotype. In the antioxidant activity, values of $23.08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for ABTS and $14,916 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for FRAP were obtained while the phenolic content was $968 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The tests of antimicrobial activity showed that the microorganisms of *Escherichia coli* and *Salmonella* are sensitive to the essential oil and that they exist in a greater degree of inhibition in the last microorganism in concentrations of 100 and 50% of essential oil of *Lippia alba*. It is possible to suggest the existence of a chemotype of essential oil obtained from *Lippia alba*, confirming a high antioxidant activity and antimicrobial capacity with what confirms its potential biotechnological potential.

Keywords: *Lippia alba*, essential oil, GC- MS antioxidant activity, antimicrobial activity

Contenido	
Derecho de autor	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Resumo	vi
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xi
1 Introducción	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo General	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
2 Revisión de la literatura	5
2.1 <i>Lippia alba</i>	5
2.2 Aceites Esenciales	5
2.3 Extracción de aceites esenciales.	5
2.3.1 Hidrodestilación.	5
2.4 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.	6
2.4.1 Densidad.	6
2.4.2 Índice de Refracción.	6
2.4.3 pH.	6
2.5 Determinación de volátiles.	6

2.5.1	Cromatografía de gases y espectrofotometría de masas	7
2.6	Actividad antimicrobiana	10
2.7	Actividad antioxidante	12
2.4.	Aplicación de aceites esenciales en la industria	15
3	Metodología	17
3.1	Lugar de la investigación	17
3.2	Localización, Identificación y caracterización de la especie	18
3.2.1	Preparación de espécimen	18
3.2.2	Identificación y caracterización de la especie.....	19
3.3	Extracción de Aceites esenciales	19
3.3.1	Procedimiento para la extracción del aceite esencial	21
3.4	Caracterización fisicoquímica	22
3.4.1	Densidad Relativa.	22
3.4.2	pH	22
3.4.3	Índice de refracción	23
3.5	Composición química	23
3.6	Actividad Antioxidante.....	23
3.6.1	Análisis estadístico	26
3.7	Actividad Antimicrobiana	26
3.7.1	Análisis estadístico	27
4	Resultados y Discusión	28
4.1	Extracción de Aceites esenciales.	28

4.2	Caracterización fisicoquímica	29
4.3	Composición química (Volátiles)	30
4.4	Actividad Antioxidante	31
4.4.1	ABTS	31
4.4.2	FRAP	34
4.4.3	Contenido fenólico	37
4.5	Actividad Antimicrobiana	38
5	Conclusiones y perspectivas futuras	47
6	Bibliografía	48

Índice de figuras

Figura 2. 1.	Artemisia ketone	7
Figura 3. 1.	Plan de trabajo.....	17
Figura 3. 2.	Localización de la especie.....	18
Figura 3. 3.	<i>Lippia alba</i>	19
Figura 3. 4.	Técnicas empleadas para la extracción de aceite esencial de <i>Lippia alba</i> ..	20
Figura 3. 5.	Flujograma para la extracción de aceite esencial.....	21
Figura 3. 6.	Mecanismo aplicado para determinar la actividad antioxidante por la técnica de ABTS	24
Figura 3. 7.	Mecanismo aplicado para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> con la técnica de FRAP	25
Figura 3. 8.	Mecanismo aplicado para determinar el contenido fenólico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	26
Figura 3. 9.	Curva de calibración de ácido tánico	26
Figura 3. 10.	Mecanismo aplicado para determinar la actividad antimicrobiana de aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	28
Figura 4. 1.	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	28
Figura 4. 2.	Cromatograma.....	30

Figura 4. 3. Curva de calibración de TROLOX (ABTS).....	33
Figura 4. 4. Dilución de la muestra	34
Figura 4. 5. Curva de calibración de TROLOX (FRAP).....	36
Figura 4. 6. Análisis FRAP.....	37
Figura 4. 7. Inhibición de <i>Escherichia coli</i>	42
Figura 4. 8. Inhibición contra <i>Salmonella</i>	43

Índice de tablas

Tabla 4. 1. Parámetros de características fisicoquímicas del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	29
Tabla 4. 2. Composición de aceites esenciales volátiles de <i>L. alba del litoral ecuatoriano</i>	30
Tabla 4. 3. Absorbancia del reactivo ABTS	32
Tabla 4. 4. TROLOX (ABTS).....	32
Tabla 4. 5. Concentraciones de la curva de calibración de TROLOX	33
Tabla 4. 6. Absorbancia del reactivo FRAP	35
Tabla 4. 7. TROLOX (FRAP)	35
Tabla 4. 8. Concentraciones de la curva de calibración de TROLOX	36
Tabla 4. 9. Concentración de contenido fenólico en aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	37
Tabla 4. 10. Análisis de varianza aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (100%) aplicado a <i>E coli</i> y <i>Salmonella</i>	39
Tabla 4. 11. Análisis de varianza aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> aplicado a <i>E coli</i> y <i>Salmonella</i>	39
Tabla 4. 12. Análisis de varianza antibiótico aplicado a <i>E coli</i> y <i>Salmonella</i>	40
Tabla 4. 13. Análisis de varianza aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (50%), aplicado a <i>E coli</i> y <i>Salmonella</i>	40
Tabla 4. 14. Análisis de varianza aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (20%) aplicado a <i>E coli</i> y <i>Salmonella</i>	41
Tabla 4. 15. Inhibición de <i>Escherichia coli</i>	41
Tabla 4. 16. Inhibición contra <i>Salmonella</i>	42
Tabla 4. 17. Ecatograma.....	43

1 Introducción

1.1 Introducción

Los aceites esenciales son mezclas complejas de componentes volátiles (hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas etc.), los cuales se forman en el citoplasma de las plantas (Barbar, otros, 2015). La presencia mayoritaria de compuestos volátiles incide directamente en el tipo de actividad biológica (antioxidante, antimicrobiana entre otras), que estos extractos podrían poseer y que pueden ser importantes para la utilización en algunas industrias como la farmacéutica, alimentaria, terapeuta, cosmetología entre otras. (Ochoa, otros, 2017).

La proliferación de microorganismo en los alimentos y su influencia en la salud de los seres humanos, ha aumentado la incertidumbre en población en temas de seguridad alimentaria (Tajkarimi, Ibrahim, y Cliver, 2010), esto también despierta el interés de parte de la comunidad científica, a profundizar más las investigaciones en torno a la utilidad de especies vegetales como conservantes naturales debido a su fácil disponibilidad y eficacia lo cual es respaldado en estudios realizados (Dueñas y otros, 2014).

“Las enfermedades transmitidas por los alimentos representan un problema de salud pública que también ha repercutido en la economía de las naciones hasta los tiempos actuales” (Rodrigues y otros, 2015).

Los agentes antimicrobianos pueden aumentar la vida útil de los alimentos procesados y no procesados, reduciendo las tasas de crecimiento de microorganismos que pueden alterar su calidad nutricional y organoléptica, con lo cual también se evita que los consumidores sean víctimas de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Por lo que la utilización de extractos como los aceites esenciales se muestran como una importante alternativa de fuente de agentes antimicrobianos de origen natural (Sanchez Garcia y otros, 2016).

Existen plantas las cuales sintetizan y acumulan sustancias como metabolitos antioxidantes, los que cuentan con la capacidad de captar radicales libres, protegiendo al organismo de la acción de sustancias oxidantes. La acumulación de radicales libres en el organismo está asociada a patologías como: infartos cardiovasculares, arterosclerosis, envejecimiento prematuro, carcinogénesis, artritis entre otras. El organismo no cuenta con la capacidad de producir sustancias protectoras antioxidantes por lo cual que deben de ser suministradas por

medio de alimentos, por lo que ha crecido el interés en investigar fuentes de componentes bioactivos de origen natural (Sanches y Mendes, 2014).

“La utilización de conservantes sintéticos como terbutilhidroquinona (TBHQ), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP), y butilhidroxianiol (BHA) ha sido discutida por su fácil volatilidad a altas temperaturas, convirtiéndose en agentes tóxicos” (Valenzuela & Pérez, 2016)

La utilización de extractos obtenidos a partir de especies vegetales ha incrementado debido al crecimiento en la demanda de productos naturales por parte de los consumidores, quienes buscan alimentos seguros y de alta calidad. La aplicación de extractos de plantas podría significar un aporte muy importante en la conservación de los alimentos (Tajkarimi, Ibrahim, y Cliver, 2010).

“El Ecuador es un país que destaca por su gran diversidad en especies vegetales. Aproximadamente 17,000 especies empleadas en alimentos (gastronomía, infusiones), materiales de construcción, medicina y otros” (De la Torre y otros, 2008). De las que el 42% se encuentran en las tierras bajas de la región oriental, el 47% en la Cordillera de los Andes y el 11% en las regiones Costa e Insular.

Pese a su gran biodiversidad en especies vegetales, la mayoría no cuentan con estudios que evalúen la composición química de los componentes volátiles y actividades biológicas, lo que es una limitante a la hora de identificar los componentes bioactivos que podrían poseer y que aporten no solo en el campo de la medicina sino también en el de la seguridad alimentaria.

El aprovechamiento de las especies vegetales, tanto endémicas como nativas del país, podría fomentar el crecimiento y fortalecimiento de diferentes industrias, quienes lograrían abastecerse de aditivos naturales que puedan mejorar la calidad y seguridad de sus productos, atendiendo también las nuevas demandas del mercado local e internacional. Con esto también se incentivaría aún más la protección del hábitat el que crecen las especies vegetales aromáticas y a su cultivo y producción.

Lippia alba es una especie arbustiva de la familia verbenácea que crece en los países de centro y sur América. A los extractos obtenidos de esta planta se le atribuyen varias propiedades medicinales como antiespasmódico (Matos y otros, 2011), analgésico, hipoglucemiante, sedante, digestivo (Alonso y Desmarchelier, 2014).

Si bien los componentes volátiles y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba* han sido estudiados en otros países como ya se expuso, los mismos autores señalan que por las diferencias en condiciones agronómicas y edafoclimáticas de cada país, la estructura química puede influir en las actividades biológicas de sus extractos. Por lo antes expuesto se justifica la realización del presente trabajo de investigación en el cual se analizará por primera vez los componentes volátiles y actividades biológicas (antioxidante y antimicrobiana) de *Lippia alba* de Ecuador, lo cual será importante ya que se podrá comparar los resultados de estudios realizados de la misma especie en otros países latinoamericanos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Analizar la composición química (Volátiles), caracterización fisicoquímica, capacidad antioxidante y antimicrobiana de un aceite esencial obtenido de *Lippia alba* en Ecuador.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar las muestras obtenidas de *Lippia alba* mediante certificación de un herbario.
- Obtener el aceite esencial de *Lippia alba* mediante técnicas de extracción convencionales (hidrodestilación)
- Determinar las características fisicoquímicas (pH, densidad e índice de refracción) del aceite esencial obtenido de *Lippia alba*.
- Analizar la composición volátil del aceite esencial de *Lippia alba* empleando el método de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS)
- Evaluar la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Lippia alba* mediante los métodos de ABTS, FRAP y contenido fenólico (Folin Ciocalteu).
- Valorar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* por medio del método difusión y dilución en disco agar contra *Salmonella* y *Escherichia coli*.

2 Revisión de la literatura

2.1 *Lippia alba*

“*Lippia alba* es una especie arbustiva de la familia verbenácea que está compuesta por alrededor de 175 géneros y 2.800 especies” (Fitzgerald y otros, 2015).

Esta planta crece entre 0,5 a 2 metros de alto. Sus ramas son arqueadas, ascendentes y eventualmente trepadoras. Las hojas lanceoladas, ternadas o decusadas, ásperas. Su inflorescencia consta de espigas o cabezuelas cortas que pueden medir 25 mm de largo por 10 de ancho, las mismas que pueden estar unidas por un tubo blanquecino con garganta blanca o amarilla, lóbulos de matices azules o razados incluyendo tonalidades de moradas y lilas (Celi y otros, 2007).

2.2 Aceites Esenciales

“Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles de apariencia oleosa, derivados de plantas odoríferas, extraídos por métodos físicos de las glándulas intercelulares del tejido de las plantas” (Ríos, 2016). Entre las especies de las cuales se pueden extraer aceites esenciales, se encuentran: las aráceas, verbenáceas, geraniáceas, anacardiáceas, moráceas, lauráceas, anonáceas entre otras.

2.3 Extracción de aceites esenciales.

Los métodos de extracción de aceites esenciales fueron sofisticándose con el paso de los años debido al crecimiento de su demanda ya que su uso era muy frecuente para la obtención de productos como perfumes corporales y ambientadores por parte de los griegos, egipcios y romanos. En la actualidad existen métodos como la hidrodestilación, arrastre de vapor, por solventes orgánicos, fluidos supercríticos, ultrasonido, microondas, acción enzimática los cuales son aplicados en función al de su aplicación. (Ortuño, 2006).

2.3.1 Hidrodestilación.

Este método tiene como principio llevar a ebullición una suspensión compuesta por agua y el material vegetal con el fin de que los vapores sean condensados y recolectados en una fase fría.

Es uno de los métodos más utilizados se caracteriza por el contacto directo que existe entre el agua en ebullición y el material vegetal lo que evitaría el sobrecalentamiento del material de extracción. “También puede ser complementada con técnicas como: ultra sonido y radiación microondas lo que influirá en su rendimiento y composición como lo demuestra “(Torrenegra y otros, 2014).

2.4 Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales.

2.4.1 Densidad.

“La densidad es la magnitud que hace referencia a la cantidad de masa por unidad de volumen, esta se puede expresar en (Kg.m^{-3}) o (g.cm^{-3})” (Mott, 2014). En el caso de los aceites esenciales suele ser inferior a 1 g.cm^3 pero existen casos como el de los aceites de mostaza, perejil y canela cuya densidad es mayor.

2.4.2 Índice de Refracción.

“El índice de refracción es la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción. En el caso de los aceites esenciales oscila en un rango entre 1,4600 y 1,500” (Do, otros, 2015).

2.4.3 pH.

El pH indica la concentración de hidrogenoides, es decir estado álcali o ácido de una solución, esta se complementa con el valor pK el cual indica el equilibrio químico de una sustancia ácida en su capacidad de liberar iones álcalis y ácidos (Mensilla, 2014). El pH se mide en escalas de 0 a 14, los aceites esenciales de mayor calidad presentan pH en rangos de 5 a 5,8. Según (Romero Marquez, 2004).

2.5 Determinación de volátiles.

“En su composición volátil los aceites esenciales pueden presentar más de 100 sustancias en diferentes concentraciones, siendo 2 o 3 las que tienen mayor presencia, las cuales determinarán las propiedades biológicas del extracto. (Bakkali, otros, 2017)”. Por ejemplo carvacrol y *p* cimene son los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* estudiado por (Majolo, Barros da Rocha, otros, 2016) en Brasil.

Los componentes que pueden estar presentes se pueden dividir en sustancias volátiles (terpenos, fenilpropanoide, ácidos grasos, lactonas) y sustancias no volátiles como

(flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos). Los factores que pueden influir en la composición del aceite esencial pueden ser extrínsecos como la técnica de extracción y condiciones de extracción e intrínsecos como edafoclimáticos (clima, pluviosidad) y agronómicos (riego, época de cosecha, madures de la planta) (Dhifi, otros, 2016).

2.5.1 Cromatografía de gases y espectrofotometría de masas

Es uno de los métodos más importantes el cual permite identificar cualitativamente compuestos de interés científico. La alta resolución, sensibilidad, su reproducibilidad y la disposición de una base de datos de biomarcadores, permiten la identificación de componentes bioactivos los cuales su aplicación pueda significar en industrias como la alimentaria (Yee y otros, 2013).

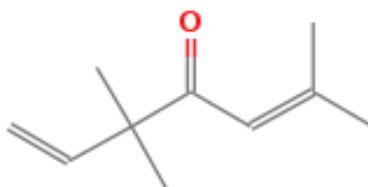


Figura 2. 1. Artemisia ketone

A continuación se muestra la tabla 2.1 que explica los quimiotipos encontrados en estudios ejecutados en países latinoamericanos sobre la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* y las técnicas empleadas para su caracterización.

Tabla 2. 1. Variedades de quimiotipos de aceite esencial de *Lippia alba* localizados en países latinoamericanos.

País	Método de análisis	Quimiotipo	Referencia
Cuba	(GC-MS)	Carvona	(Pino, otros, 1996)
Uruguay	(GC-MS)	Linalol,	(Lorenzo, otros, 2001)
Colombia	(GC-MS)	Carvona, limoneno y citral	(Duran, otros, 2007)
Argentina	(GC-FID) Cromatografía de gases acoplado a detector de ionización de llamas	Linalol, carvona	(Blanco, Ringuélet, Consolini, Viña, 2014)
Brasil	(GC-FID)	Grupo 1: Linalol, 1,8-cineol, y óxido de cariofileno Grupo 2: Neral y geranial Grupo 3: carvona y sabinene Grupo 4: <i>g</i> -muruleno y mircenol	(Fitzgerald, otros, 2015)
Brasil	(GC-FID)	Carvacrol y <i>p</i> cymene	(Majolo y otros, 2016)
Colombia	(GC-MS)	Accesión cítrica: Geranial neral y geraniol Accesión típica: carvona, limoneno y germacreno	(Delgado Ospina, otros, 2016)
México	(GC-FID)	(HD) Eucaliptol, mircenona (SF) Mircenona, α -terpineol,	(Reyes Solano, Brepsa, otros, 2017)

En la presente matriz se muestran algunos de los resultados de estudios realizados en algunos países de Latinoamérica en torno a la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, se presentan las técnicas de caracterización y los quimio tipos encontrados

2.6 Actividad antimicrobiana.

La utilización de los aceites esenciales se ha incrementado, debido a que se ha podido identificar varios componentes químicos con efecto anti microbiano (citral, eugenol), Como ya se ha mostrado existen diferentes métodos de análisis actividad antimicrobiana pero se debe realizar una selección de los más adecuados para aceites esenciales, entre los que se encuentran: difusión y dilución en agar, caja petri invertida y cámara hermética.

“El método de difusión y dilución en disco agar permite determinar la capacidad inhibitoria de un extracto ante un microorganismo, dicho procedimiento fue por adoptado por la National Committe for Clinical Laboratory Starndars (NCCLS)” (Sánchez Garcia, otros, 2016).

La *Salmonella* es una bacteria anaerobia facultativa gran negativa que puede medir de 2-5 micras de largo y de 0,5 a 1,5 de ancho de micras, se encuentra distribuida en toda la naturaleza pero principalmente en los intestinos de los seres humanos y animales, y es aquí donde se distribuye (Andino y Hanning, 2015). “Según datos de la Organización Mundial de la Salud para la salud *Salmonella tipi* es la responsable de 52000 muertes de personas al año.”

“La *E. coli* es una bacteria bacilo gran negativa, perteneciente a la familia de las entero bacterias y es trasmitido por los alimentos. Tienen un tamaño promedio de 5µm de ancho y 3 µm de largo. (Aderis, Leotta,y Galli, 2017). La *E. coli* es la responsable de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y de 5 a 6 millones de muerte al año.

A continuación se presenta una revisión bibliográfica en donde se muestran estudios realizados de actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Lippia alba* en algunos países.

Tabla 2. 2. Estudios de actividades antimicrobianas de aceite esencial de *Lippia alba* realizados en países latinoamericanos.

País	Método	Microorganismo testado	Resultado	Referencia
Brasil	Micro dilución en caldo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	(Majolo otros, 2016)
Colombia	Difusión en pozos	<i>Streptococcus mutans</i>	Concentración 0,01: Mortalidad: 95,8%	(Tofiño Rivera, otros, 2016)
Cuba	Diluciones seriadas en medio líquido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC: No hubo datos y MBC: No hubo datos	(Pino, otros, 1996)
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MIC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	MIC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	MIC: 0,63 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13088	MIC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 2,50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MIC: 0,31 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 0,63 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	MIC: 0,63 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 7001	MIC: 0,63 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433	MIC: 0,63 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y MBC: 1,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
Guatemala	Dilución en pozos	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio 1. Citral (50%): 0,084 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,112 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; carvona (50%): 0,087 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,118 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	(Aldana y Cruz, 2017)
			Estadio 2. Citral (50%): 0,106 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,219 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; carvona (50%): 0,148 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,437 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
			Estadio 3. Citral (50%): 0,285 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,447 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; carvona (50%): 0,304 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,509 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	
			Estadio 4. Citral (50%): 0,356 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,481 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; carvona (50%): 0,367 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y (95%): 0,506 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	

En la presente matriz se presentan estudios realizados en torno a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba*, se muestran las técnicas utilizadas y los resultados obtenidos.

2.7 Actividad antioxidante.

“La utilización de antioxidantes artificiales como butilhidroxitolueno (BHT) es común en la industria alimentaria, estos podría presentar efectos adversos en la salud de los seres humanos, pues se lo asocia con patologías como: rinitis, asma y edemas alérgicos” (Roncancio y otros, 2015).

Debido los altos niveles de agentes antioxidantes naturales como ácido ascórbico (vitamina C), glutatión (GCH), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides y flavonoides en algunas especies vegetales su estudio y el de sus extractos, se ha incrementado e incluso ya han sido aplicados en industrias como la alimentaria, obteniendo resultados favorables (Leos Rivas, otros, 2016).

La acumulación de radicales libres en el organismo podría causar un desequilibrio del balance de pro oxidantes ante los antioxidantes, lo que podría derivar en el incremento de la probabilidad de contraer patologías como accidentes cardiovasculares, artritis, infartos miocárdicos, arteriosclerosis, envejecimiento prematuro, carcinogénesis y entre otros. (Torres y otros, 2016).

“Los compuestos fenólicos son sustancias antioxidantes, representan al grupo de compuestos no energéticos de origen vegetal. “Una dieta rica de sustancias podría combatir enfermedades cardiovasculares” (Quiñones y otros, 2012). “Su clasificación dependerá de los anillos fenólicos que posea” (Galanakis, 2018). “Entre los métodos para determinar la actividad antioxidante se encuentran; el método ABTS donde la cantidad de antioxidantes en la muestra es inversamente proporcional al desarrollo del radical ABTS” (Valantina y otros, 2015) y el método FRAP sirve para determinar la capacidad que tiene un elemento antioxidante en reducir la el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El -2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Thaipong y otros, 2012)

Otros métodos para determinar la actividad antioxidante son: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo DPPH, Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Dimethylamine-4- phenylenediamine (DMPD) y contenido fenólico.

Tabla 2. 3. Estudios realizados de actividad antioxidantes de aceite esencial de *Lippia alba* realizados en países Latinoamericanos

País	Método	Resultados	Referencia
Colombia	Contenido fenólico Folin Ciocalteu	Quimiotipo carvona: 305 mg•L ⁻¹ , quimiotipo citral: 289 mg•L ⁻¹ ,	(Celi y otros, 2007)
Brasil	Contenido fenólico Folin Ciocalteu	330.22 mg/L	(Chies y otros, 2013)
México	DPPH	HD: 12,45 mg•L ⁻¹ ;; SFE: 17,35 mg•L ⁻¹ ,	(Solano y otros, 2017)
	ABTS	HD: 15,6 μmol/g ⁻¹ ;; SFE: 55,2 μmol/g ⁻¹	
	Contenido Fenólico	HD: 113,5 μmol/g ⁻¹ ;; SFE: 84,0 μmol/g ⁻¹	

En la presente tabla se muestran resultados de estudios realizados en países latinoamericanos en torno a la actividad antioxidante del aceite esencial de *Lippia alba*, se presentan las técnicas que se utilizaron y los resultados obtenidos.

2.4. Aplicación de aceites esenciales en la industria.

La utilización de perfumes corporales y ambientadores era muy frecuente por parte de civilizaciones como los egipcios, griegos y romanos quienes aumentaron el consumo de estos productos elaborados a partir de aceites esenciales cuyos métodos de extracción fueron desarrollados y sofisticados por los árabes así mismo la producción y comercialización de especias aumentaron lo que impulsó el desarrollo de la industria (Ortuño, 2006).

El uso de los extractos obtenidos de especies vegetales aromáticas, se aplica en la industria de alimentos, en la medicina, en la protección de medio ambiente y en la industria cosmética.

En el caso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* se han realizado diversos estudios como el presentado por (Ringuele, otros, 2014) quien analizó la actividad insecticida del extracto de la presente especie (quimiotipo carvona-limoneno) en *Tribolium castaneum* y su efecto repelente se mostró a una concentración de 52 μL L⁻¹ con lo que se concluye que el extracto se presenta como una gran alternativa no contaminante para controlar y prevenir del *Tribolium castaneum* en el trigo. “El efecto

protector del aceite esencial de *L alba* contra la toxicidad del mercurocromo en raíces de *Allium cepa* fue estudiada por (Vera y otros, 2010) encontrando un efecto protector del extracto a concentraciones de $100\mu\text{M}$ ". El aceite esencial de *L alba* también fue estudiado por (Agudelo y otros, 2010) quien demostró la actividad antiherpética sobre células He-La, infectadas con valores de $R_f 1 \times 10^{-1.5}$ en concentraciones de 125 y $250\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Las diferentes aplicaciones de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba*, presentadas en la presente revisión bibliográfica demuestran que existe un campo de estudio muy amplio, el cual permitirá realizar nuevos trabajos en torno a las actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba*. De confirmarse que el aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador presenta actividades biológicas (antioxidante y antimicrobiana) se podría presentar como una gran alternativa de fuentes de conservantes naturales y su potencial uso en la industria alimentaria, lo cual daría paso a nuevos estudios sobre su aplicación en alimentos y en el campo de la biotecnología.

3 Metodología.



Figura 3. 1. Plan de trabajo.

El presente estudio inicio con la identificación *Lippia alba* por parte del herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) de la ciudad de Quito, Ecuador, posteriormente se realizó la extracción del aceite esencial por la técnica de hidrodestilación. Se realizó la caracterización fisicoquímica del aceite esencial (pH, índice de refracción y densidad). Los componentes volátiles del extracto también fueron determinados bajo la técnica de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas y finalmente se establecieron las actividades antioxidantes por las metodologías ABTS, FRAP y contenido fenólico (Folin Ciocalteu), así como también la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión y dilución en disco agar.

3.1 Lugar de la investigación

El presente estudio inicio con la búsqueda especies vegetales con posibilidades potenciales de contener componentes volátiles, basada en una matriz con información realizada por el equipo de investigación, encontrándose en la parroquia Charapotó del cantón Sucre, provincia de Manabí, Ecuador. Las extracciones de los aceites esenciales fueron realizadas en el laboratorio de química orgánica del Instituto de Ciencias Básicas (ICB), en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Físicas y Matemáticas y en el centro de investigaciones de la Universidad Técnica de Manabí. Así también se realizaron análisis en el laboratorio de bromatología y química de la Facultad de Ciencias de la Tierra de la Universidad Estatal Amazónica, mientras que

la caracterización química del aceite esencial fue realizada en el departamento de química analítica de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) España.

3.2 Localización, Identificación y caracterización de la especie

Las muestras fueron localizadas en la comunidad San Ignacio de la parroquia Charapotó, cantón Sucre, provincia de Manabí, Ecuador a- 0,828675:-80,510000, en una zona con un bosque tropical seco, riparia y rodeada de cultivos de arroz, cebolla, tomate y melón. La recolección se la realizó en un lapso de 3 meses en los meses de noviembre 2017 y enero de 2018.



Figura 3. 2. Localización de la especie

En la recolección se utilizó tijeras de podar esterilizadas, fundas de papel y fundas de plástico. Los cortes se realizaron cuidadosamente con el fin de no estropear lo menos posible la especie vegetal. Las especies fueron lavadas con el objetivo de eliminar partículas ajenas a la planta. Las hojas fueron reducidas de tamaño mediante cortes laterales y almacenadas en fundas de papel, en lugares secos, con el fin de reducir su humedad mejorando las condiciones para realizar las extracciones de aceites esenciales.

3.2.1 Preparación de espécimen

Para obtener el certificado y la identificación del espécimen fue necesario trasladar individuos de la especie hasta el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), previamente preparados como indican las técnicas de colección y preparación de especímenes emitidos por el Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE).

3.2.2 Identificación y caracterización de la especie



Figura 3. 3. *Lippia alba*

Esta planta crece de 0,5 a 2 metros posee tallos ramificados y leñosos con brotes enraizadores y ramas arqueadas, ascendentes y eventualmente trepadoras sus hojas lanceoladas ternadas, ásperas con pubescencias por el envés que son inflorescencia con cabezuelas cortas, que pueden medir entre 25 mm de largo por 10mm de ancho, unidas por un tubo blanquecino o amarillo con lóbulos de matices entre rosadas y azules

3.3 Extracción de Aceites esenciales.

Se puede extraer los aceites esenciales empleando la técnica de hidrodestilación con trampa de Clevenger, los materiales que se usaron fueron los siguientes:

- Manta Eléctrica Heating Mantle, de 300 watts de potencia, 60 Hz
- Motor sumergible Jier 12 volteo, 60 Hz
- Balón de vidrio Glassco, Boro 3,3, cap. 1000 ml
- Trampa de Clevenger
- Refrigerante Glassco Boro 3,3, cap. 300 mm
- Micro pipeta
- Pera de Succión
- Vaso Glassco cap. 600 ml
- Papel Aluminio
- Soportes
- Pinzas

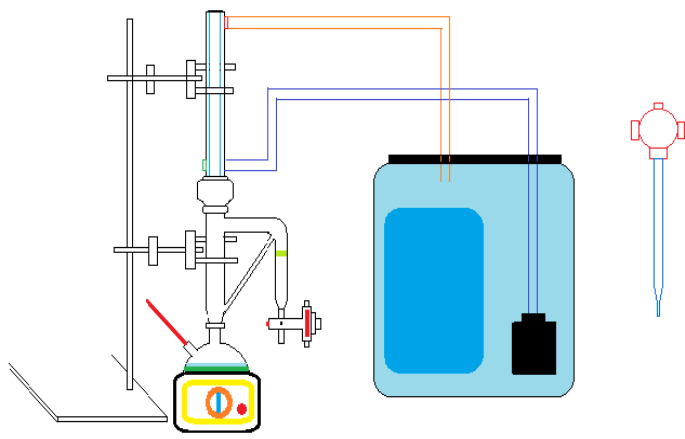
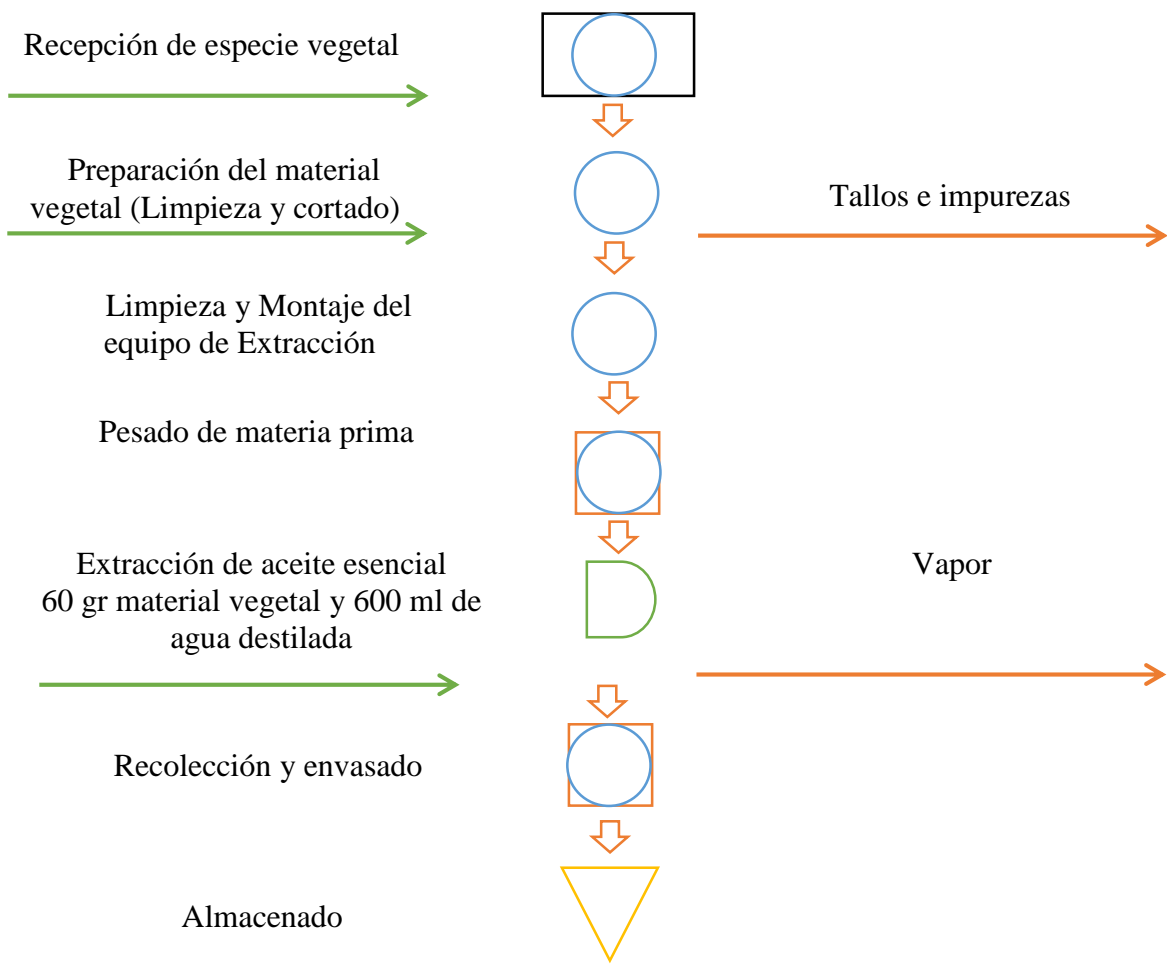


Figura 3. 4. Técnicas empleadas para la extracción de aceite esencial de *Lippia alba*.



Simbología.








Operación	
Operación con Inspección	
Demora	
Almacenamiento	
Transporte	
Entrada	
Salida	

Figura 3. 5. Flujograma para la extracción de aceite esencial.

3.3.1 Procedimiento para la extracción del aceite esencial.

a) Recepción de la especie vegetal y preparación del material vegetal

Una vez que la planta ha perdido humedad con el secado natural a la que la planta fue expuesta, se constata que el material vegetal se encuentra en estado ideal para proceder a realizar las extracciones.

b) Preparación de materia prima

Una vez que ha sido recolectada la planta se separa tanto las hojas y la florescencia del tallo, posteriormente se realiza la limpieza con el fin de eliminar las impurezas.

c) Montaje del equipo de Extracción

Cada una de las partes del equipo de extracción son instaladas, el material de vidriería, previamente es lavado con detergente, agua destilada y etanol comercial con el fin de eliminar olores no deseados.

d) Pesado

Se pesa el material vegetal en una balanza digital, así mismo como el volumen del agua, cuya proporción será 1:10.

e) Extracción.

La técnica utilizada para las extracciones fue la de hidrodestilación, la misma que tuvo una duración de 60 minutos, el peso de la planta por extracción fue de 60 gramos en 600 ml de agua destilada. Una vez que el agua entro contacto con el material vegetal se procede a elevar la hasta los 98°C, iniciando la ebullición mediante la cual se generan los vapores que se dirigen hasta el condensador donde entran en contacto con la fase fría y es ahí en donde se separan por condensación y diferencias de densidades los aceites esenciales y el hidrosol quedando atrapados en la trampa de Clevenger.

Para la separación de del aceite esencial y el hidrosol se utiliza una pera absorción y una pipeta capilar y se lo realiza desde la parte superior de la trampa, con lo cual se evita la pérdida de aceite esencial, el cuál puede quedar adherido en las paredes de la trampa.

f) Envasado.

El aceite esencial es envasado de manera inmediata, en envases de vidrio ámbar de 2,5 ml con una capacidad y son almacenados a una temperatura de 5°C.

3.4 Caracterización fisicoquímica.

Para determinar las características físicos y químicos del aceite esencial de *Lippia alba* se realizaron análisis de: densidad relativa, pH e índice de refracción.

3.4.1 Densidad Relativa.

La densidad relativa fue determinada mediante la técnica AFNOR NF T 75 111, para este análisis se utilizó un termómetro, una balanza analítica y un picnómetro de 1ml de capacidad. Para el procedimiento se toma el peso de un picnómetro de 1ml vacío con su tapón, se registra el peso de un picnómetro de 1 ml con agua destilada y finalmente realiza el mismo procedimiento reemplazando agua destilada con aceite esencial.

3.4.2 pH.

Este valor fue determinado por medio de la utilización de tirillas papel tornasol, indicadoras de pH. El procedimiento fue de tomar una tirilla y se la coloca en el aceite esencial, luego se realiza la lectura con la leyenda de la caja de tirillas.

3.4.3 Índice de refracción

Para la determinación del índice de refracción se lo realizó en un refractómetro abbe. En este procedimiento, se coloca una gota de aceite esencial en el prisma del refractómetro y registra el resultado.

3.5 Composición química.

Las muestras (0,2µL) fueron analizadas cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC modelo 6890 y MS modelo 5975) con estándares auténticos de limoneno, α tirpeneol, verbeneen, citral (nera-geranial) y eugenol. La columna DB-5 marca Agilen compuesta por 5% de fenil y 95% polidimetil siloxano con una longitud de 30 metros * 0,32 mL * 0,25 µm.

La inyección fue realizada por splitles. El programa del cromatógrafo se ajustó a 40°C mantenidos por 5 minutos, la temperatura aumentó 3°C por minuto hasta alcanzar los 240°C donde se mantuvo por 10 min; La temperatura del inyector fue de 220°C y la del detector de 250°C; El gas portador fue helio con un flujo de 1,0 mL/min⁻¹. Cada muestra fue analizada por triplicado. El modo impacto electrónico fue 70 eV se usó para el análisis de espectrofotometría de masas. El rango de masas vario de 35 a 300 u. La identificación de componentes volátiles en el aceite esencial de *Lippia alba* se realizó utilizando estándares auténticos y una librería de datos NIST del sistema GC-MS con sus características de m/2 (Moro y otros, 2011). La cuantificación del porcentaje de área se la realizó usando Scm Mode.

3.6 Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Lippia alba* fue determinada para las métodos de ABTS y FRAP y contenido fenólico, se tomaron 5 muestras de aceite esencial extraídos bajo las mismas condiciones. Las muestras fueron trasladadas hasta el laboratorio de Química y Bromatología de la Facultad de Ciencias de la Tierra de la Universidad Estatal Amazónica del Ecuador en la ciudad del Puyo. La metodología empleada para realizar los análisis de actividad antioxidante fue la misma que aplicaron (Abreu y otros, 2017).

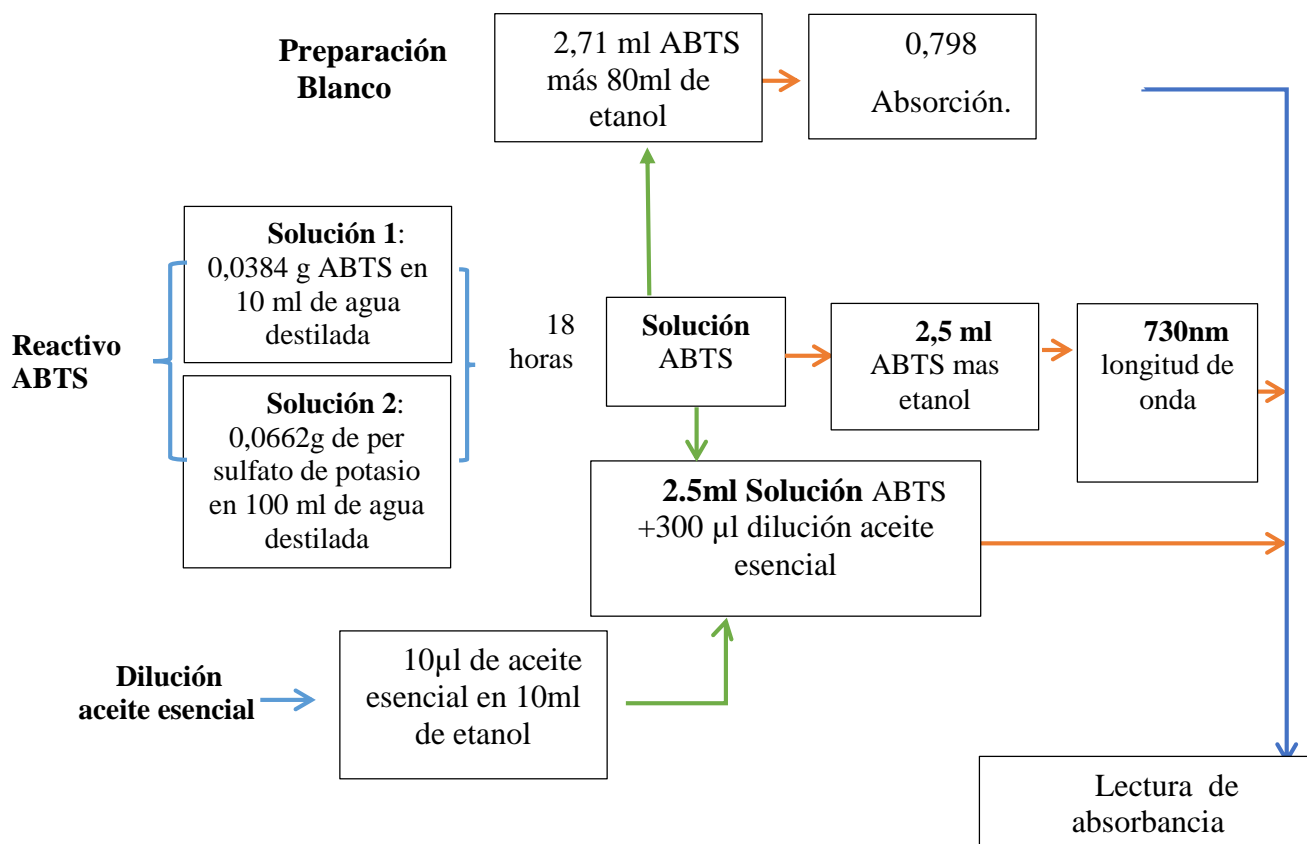


Figura 3. 6. Mecanismo aplicado para determinar la actividad antioxidante por la técnica de ABTS.

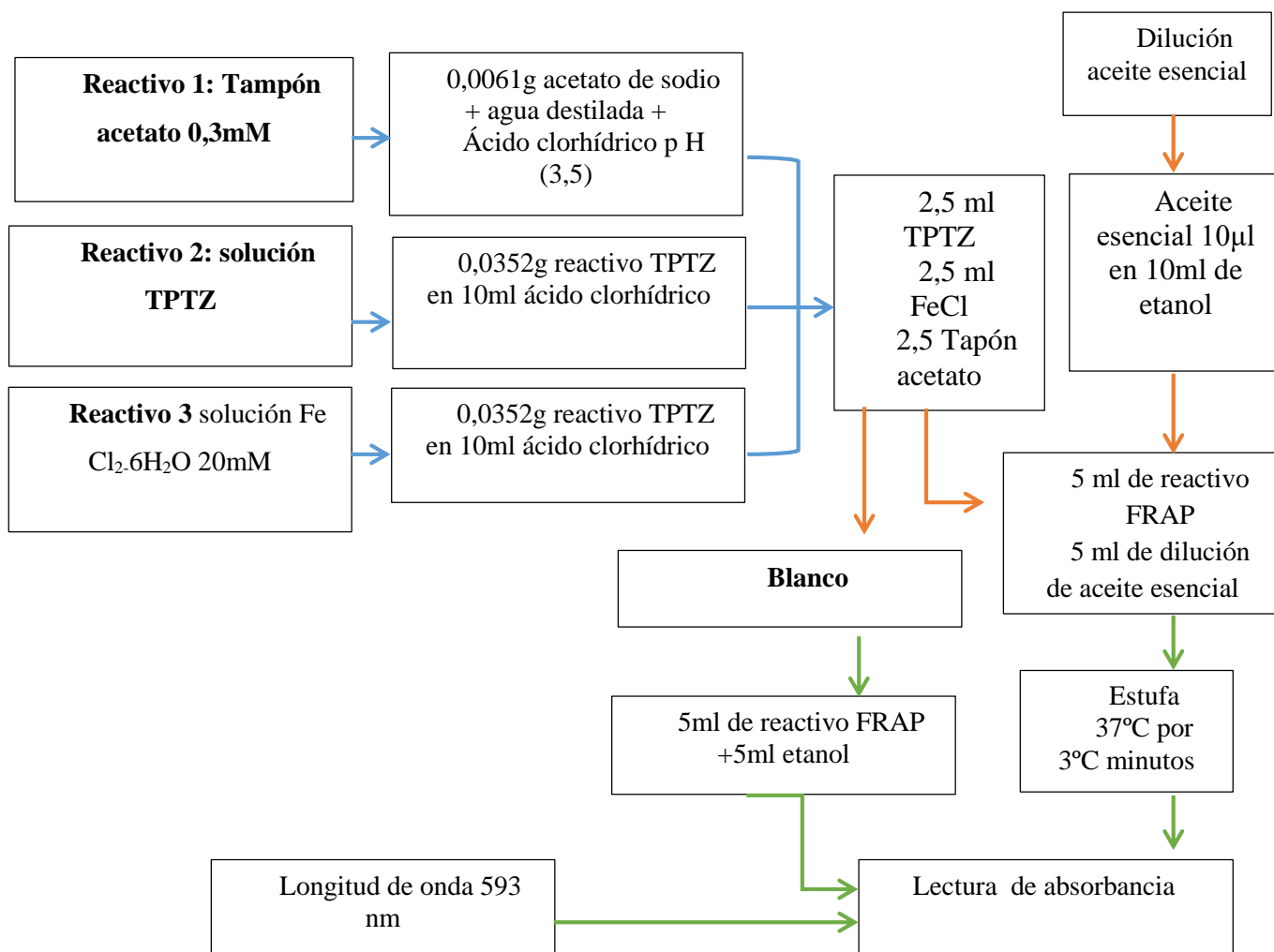


Figura 3. 7. Mecanismo aplicado para determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Lippia alba* con la técnica de FRAP.

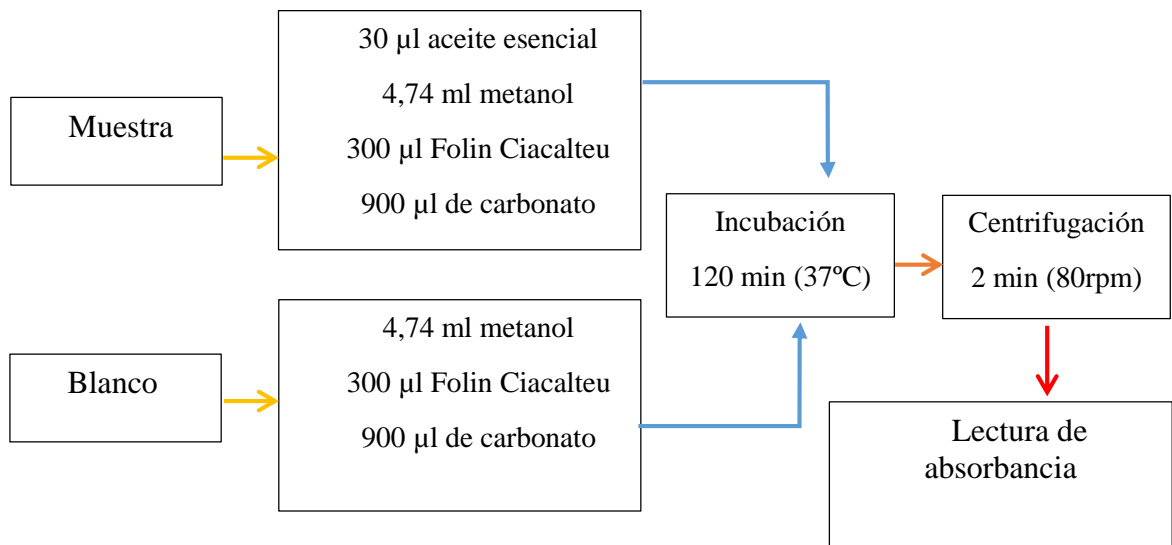


Figura 3. 8. Mecanismo aplicado para determinar el contenido fenólico del aceite esencial de *Lippia alba*

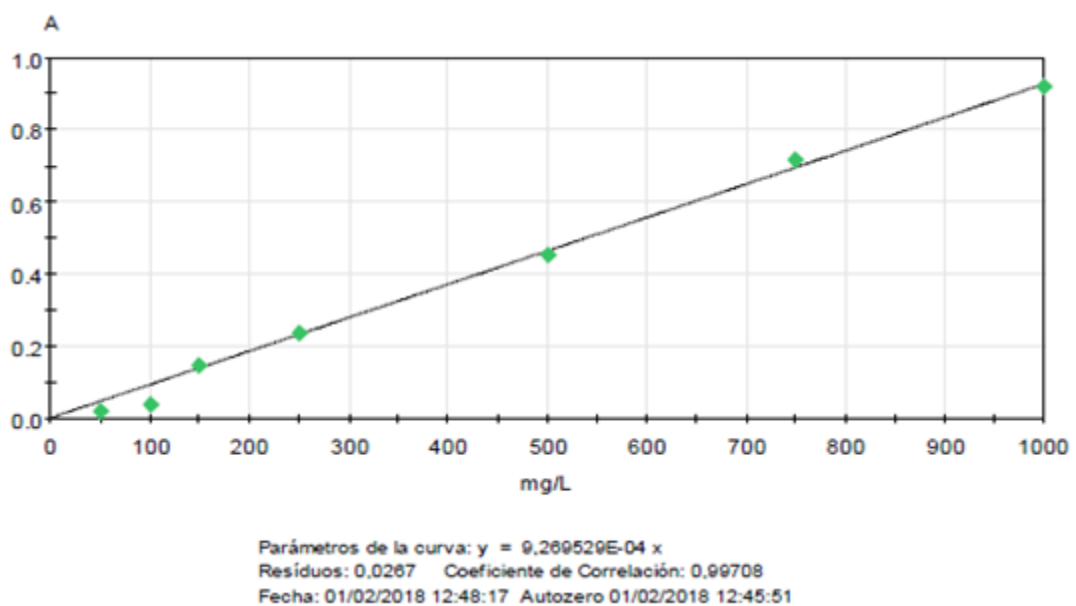


Figura 3. 9. Curva de calibración de ácido tánico.

3.6.1 Análisis estadístico.

El análisis de los datos obtenidos de la actividad antioxidante se lo realizó mediante el estadígrafo de análisis estadístico de correlación lineal

3.7 Actividad Antimicrobiana

Para la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión y dilución en disco agar, los resultados fueron comparados con los de un antibiótico comercial (amoxicilina en suspensión) y aceite esencial de *Mentha piperita*, obtenido

bajo las mismas condiciones del aceite esencial de *Lippia alba*. Entre microorganismos que fueron analizados se encuentran *E. coli* y *Salmonella*. El procedimiento aplicado para determinar la actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Lippia alba* fue aprobado por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Ortez, 2014).

Y los materiales usados fueron:

- Cajas Petri
- Pinzas
- Porta objeto
- Matraz
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Asas
- Regla
- Autoclave

Reactivos.

- Cloruro de bario (1%)
- Ácido Sulfúrico (1%)

Medio de cultivo.

- Muller Hilton

3.7.1 Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza ANOVA, con una probabilidad del 95%.

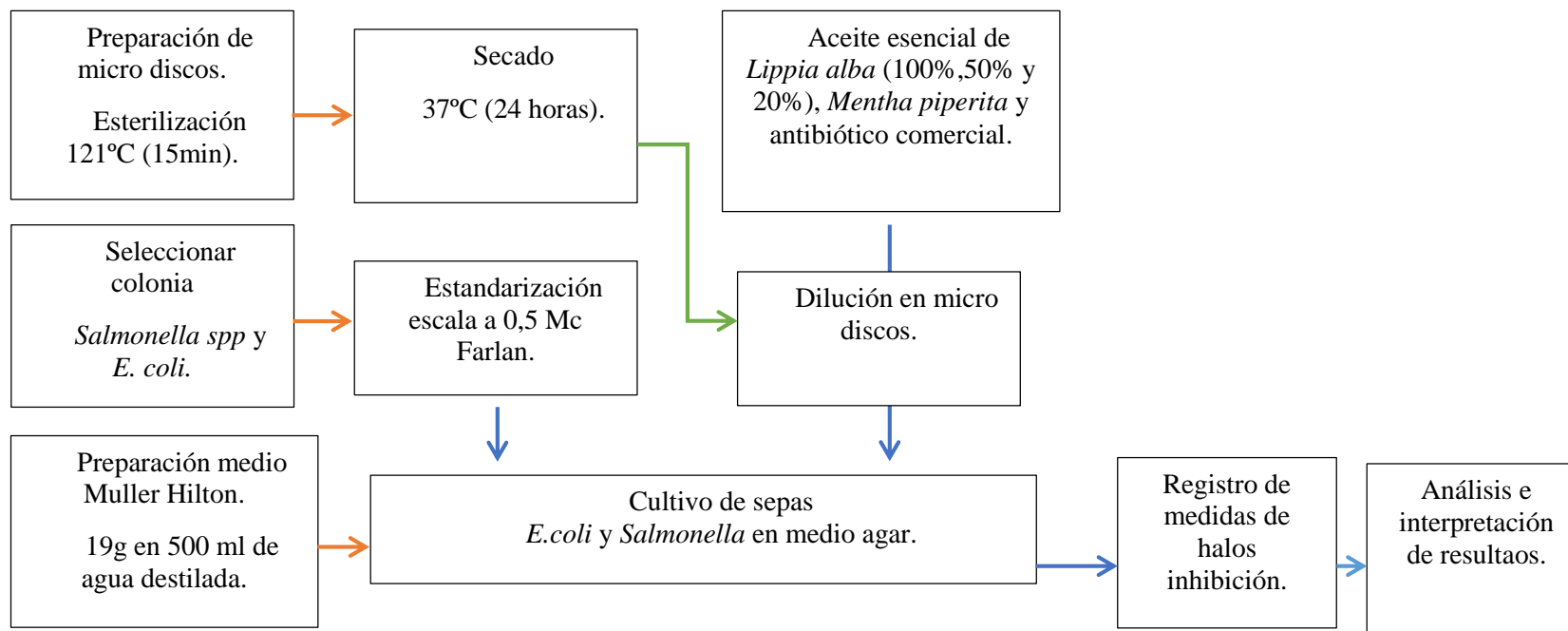


Figura 3. 10, Mecanismo aplicado para determinar la actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Lippia alba*.

4 Resultados y Discusión.

4.1 Extracción de Aceites esenciales.

A continuación se muestra el rendimiento de extracción para lo cual se aplicó la siguiente ecuación $\frac{a}{b} * 100$. Donde (a) es la cantidad de aceite esencial obtenido y (b) la cantidad de material empleado para la extracción y este resultado multiplicado por 100.

$$\%R. \textit{Aceite Esencial} = \frac{\textit{Aceite Esencial obtenido}}{\textit{Material vegetal empleado}} * 100,$$

$$\%R. \textit{Aceite esencial} = \frac{0,6ml}{60g} * 100.$$

$$\% R. \textit{Aceite esencial} = 1\% \pm 0,5.$$

El porcentaje obtenido se encuentra dentro de los rangos presentes en otras investigaciones, en una revisión bibliográfica realizada por (Linde y otros, 2016) se presentan estudios realizados con aceites esenciales de *Lippia alba* y en donde muestra como el estado de la hoja influye en el rendimiento del aceite esencial. En el caso de (Glamočlija y otros, 2011) presentó un rendimiento de 0,15%, (Heldwein y otros, 2012), de 0,35% y (Hennebelle y otros, 2008) 0,6%. En todos los casos la técnica de extracción fue hidrodestilación con trampa de Clevenger el material vegetal se encontraba en estado fresco. Mientras que (Yacamoto y otros, 2008) obtuvieron rendimientos entre 0,4 y 2,8% en el estado de material vegetal era seco.

El aceite esencial de *Lippia alba* presentó un rendimiento de 1% encontrándose entre los valores medios presentados por autores quienes obtuvieron el extracto por la técnica de hidrodestilación con trampa de Clevenger y el estado de hoja fue seco.



Figura 4. 1. Aceite esencial de *Lippia alba*

4.2 Caracterización fisicoquímica.

Tabla 4. 1. Parámetros de características fisicoquímicas del aceite esencial de *Lippia alba*.

Resultados		
Parámetro	Rangos	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i>
Densidad	≤ 1	$0,95 \text{ g.m}^{-1} \pm 0,4$
p H	5 a 5,8	$5,05 \pm 0,5$
Índice de Refracción	1,3 a 1,7	$1,510 \pm 0,4$

Por sus características los aceites esenciales suelen tener densidad inferior a uno, pero existen casos como los de canela, perejil y mostaza que superan este valor (Ortuño, 2006). El aceite esencial de *Lippia alba* del presente estudio presentó una densidad de $0,953 \text{ g.mL}^{-1}$, superior a los presentados por (Aular y otros, 2016) en el cual la densidad era de $0,83 \text{ g.mL}^{-1}$, y a los de (Pino y otros, 1996), el cual el valor fue $0,9218 \text{ g.mL}^{-1}$, a los de (Rodríguez y Segura, 2017) que fue de $0,9283 \text{ g.mL}^{-1}$. En el caso del pH del aceite esencial de *Lippia alba*, el valor obtenido fue de 5,05 semejante al presentados por (Rodríguez y Segura, 2017). Encontrándose también en el rango de 5 a 5,8 en donde según (Romero Marquez, 2004) se encuentran los aceites esenciales con mayor calidad. El valor obtenido para el índice de refracción del aceite esencial fue de 1,51, igual al presentado por (Rodríguez y Segura, 2017) cuyo valor fue de 1,49, a los presentados por (Pino, otros, 1996) con 1,50 de índice de refracción y a los de (Lorenzo, otros, 2001) con un valor de 1.

4.3 Composición química (Volátiles).

Tabla 4. 2. Composición de aceites esenciales volátiles de *L. alba del litoral ecuatoriano*.

Orden	Compuesto	RT(min)	% Área
1	Limoneno*	13,40	Min
2	Linalol*	16,95	Min
3	Artemisia Cetona	19,150	70,55
4	α tirpenol *	21,50	Min
5	verbenone*	22,06	Min
6	Citral*	23,26	14,47
7	Eugenol*	28,86	Min

*: Confirmado por patrón estándar

Min.: Compuesto minoritario con respecto al área total

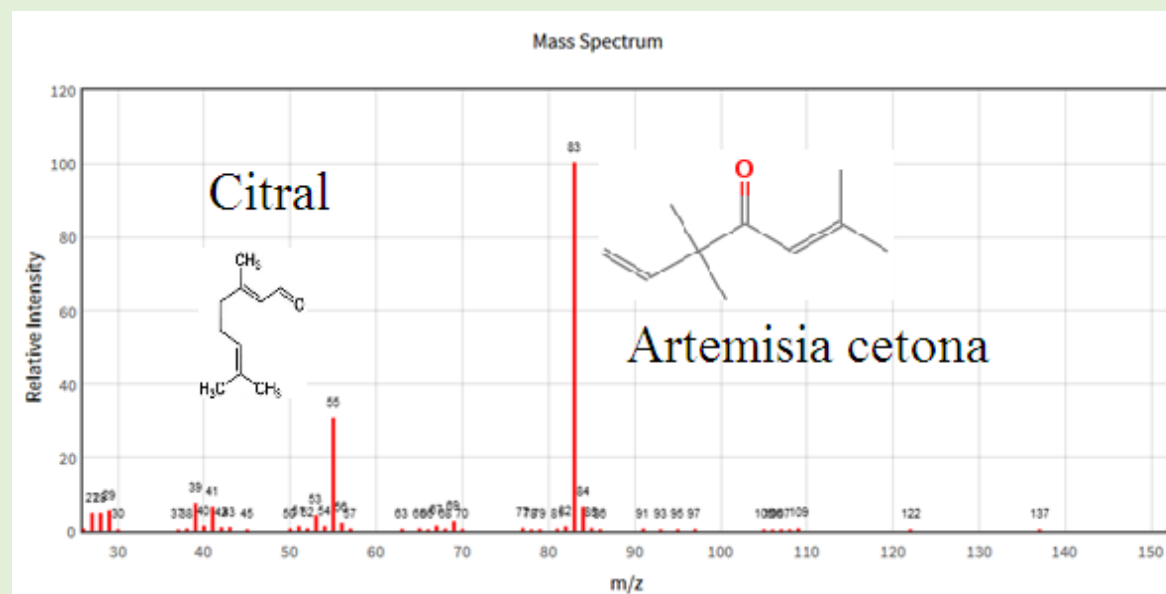
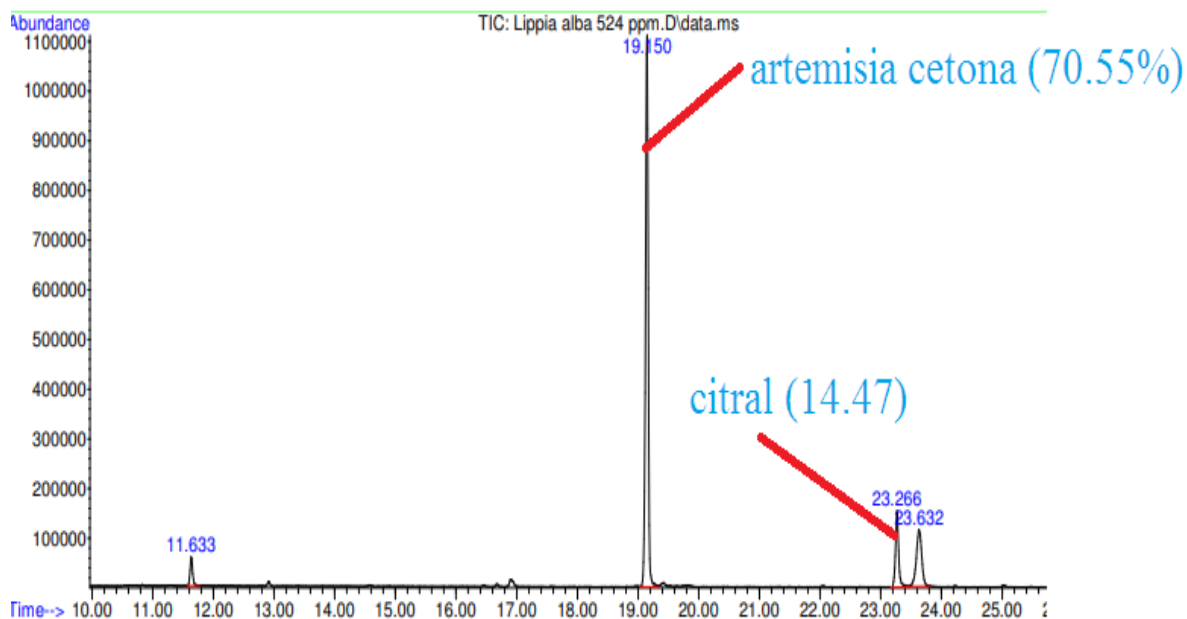


Figura 4. 2. Cromatograma.



Tal como lo muestra la tabla 2.1 estudios realizados en base a la composición volátil del aceite esencial de *Lippia alba* en algunos países latinoamericanos muestran como componentes mayoritarios a carvona en Cuba (GC-MS) (Pino y otros, 1996); a linalol en Uruguay (GC-MS) (Lorenzo y otros, 2001); Carvona (GC-MS) (Duran y otros, 2007), germanial (GC-MS) (Delgado y otros, 2016) en Colombia. Linalol en Argentina (GC-FID) (Blanco y otros 2014).

En Brasil limoneno, neral, carvona, *g*-muruleno, mirceno (Fitzgerald y otros, 2015), carvacol (GC-FID) (Majolo y otros, 2016). Y en México eucaliptol y mirceneno (GC-FID) (Reyes Solano y otros, 2017). Según los resultados de componentes volátiles por (GC-MS) los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador son Artemisa cetona con 70,55 y citral 14,47% respecto al porcentaje del área, lo cual supondría la presencia de un nuevo quimiotipo de los extractos de la especie. Esto deberá ser comprobado por técnicas como Orbitrap exactive, ya que la librería de NIST no contenía el estándar auténtico del compuesto en mención, que sería el responsable de la alta actividad antioxidante y que lo diferencia de los extractos de la misma especie estudiados en otros países.

4.4 Actividad Antioxidante.

4.4.1 ABTS.

Una vez que se han preparado las muestras, se registran los datos de absorbancia obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 4. 3. Absorbancia del reactivo ABTS

Replicas	Absorbancia
1	0,43
2	0,40
3	0,46
4	0,3
5	0,41
Total	2,01
Media	0,403
Des. Est.	0,05

Estas cinco muestras fueron tomadas de aceite esencial de *Lippia alba* obtenidas bajo las mismas condiciones.

Tabla 4. 4. TROLOX (ABTS)

Patrón diluido (2/10)	C (mg/L)	A1
μL		
0,01	0,66	0,64
0,02	1,32	0,57
0,03	1,98	0,46
0,04	2,63	0,38
0,05	3,28	0,29
0,06	3,92	0,21
0,07	4,56	0,14
0,08	5,19	0,05

Se prepararon diluciones con 0,1g de en 5ml de metanol y 5ml de agua destilada y aplicaron 8 diferentes concentraciones de la dilución, encontrándose los siguientes puntos en la curva de calibración.

Obteniendo la siguiente curva de calibración de TROLOX.

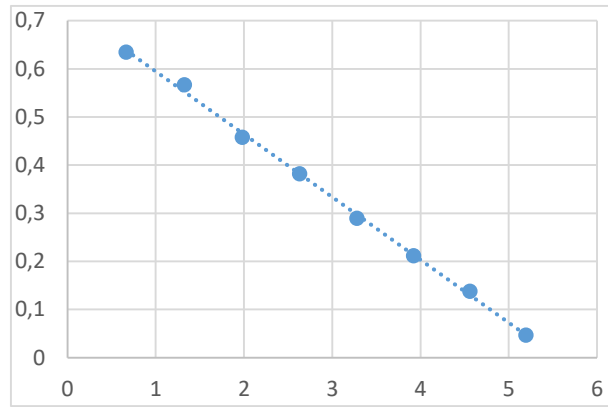


Figura 4. 3. Curva de calibración de TROLOX (ABTS).

De la curva de calibración se obtiene la siguiente ecuación:

$$y = 0,1304x + 0,725$$

$$R^2 = 0,998$$

$$C = \frac{a - b}{x}$$

$$C = \frac{a - 0,7252}{-0,1304}$$

Tabla 4. 5. Concentraciones de la curva de calibración de TROLOX.

Replicas	Absorbancia	C
1	0,427	2,287
2	0,398	2,509
3	0,456	2,064
4	0,32	3,107
5	0,413	2,394
Total		12,362
Media		2,472

Se toman los datos de absorvancia obtenidos de las cinco muestras y se aplica el modelo matematico obtenido de la curva de calibración de TROLOX para ABTS.

$$C1=$$

V1= Dilución aceite esencial más etanol

C2= Concentración

V2=Volumen de muestra

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$? * 0,3ml = 2,472 mg * 8mL$$

$$C = \frac{C2 * V2}{V1}$$

$$C = \frac{2,472mg/l * 2,8mL}{0,3mL}$$

$$\text{Concentración} = 23,07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{Concentración} = 23,08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} * 1000$$

$$\text{Concentración} = 23,08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$$



Figura 4. 4. Dilución de la muestra.

4.4.2 FRAP.

Las muestras son retiradas de la estufa y se inician las lecturas obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 4. 6. Absorbancia del reactivo FRAP

Replicas	Absorbancia
1	1,429
2	1,417
3	1,528
4	1,363
5	1,27
Total	5,74
Media	1,15
Varianza	0,01
Des. Est.	0,09

Se tomaron cinco muestras de aceites esenciales de *Lippia alba* obtenida bajo las mismas condiciones. Se muestra la media y la desviación estándar de 0,05.

Tabla 4. 7. TROLOX (FRAP)

Patrón diluido (2/10) μL	C (mg/L)	%I
0,01	0,66	8,90
0,02	1,32	18,65
0,03	1,98	34,29
0,04	2,63	45,19
0,05	3,28	58,39
0,06	3,92	69,58
0,07	4,56	80,20
0,08	5,19	93,26

Se prepararon diluciones con 0,1g de en 5ml de metanol y 5ml de agua destilada y aplicaron 8 diferentes concentraciones de la dilución, encontrándose los siguientes puntos en la curva de calibración.

Obteniendo la siguiente curva de calibración:

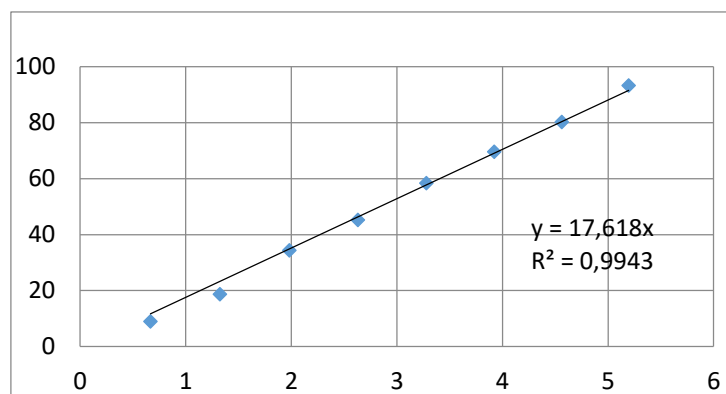


Figura 4. 5. Curva de calibración de TROLOX (FRAP).

$$A = 0,1879 * C$$

$$C = \frac{A}{0,1879}$$

Tabla 4. 8. Concentraciones de la curva de calibración de TROLOX

Muestra	Absorbancia	C
1	1,429	7,605
2	1,417	7,541
3	1,528	8,132
4	1,363	7,254
5	1,27	6,759
Total		37,291
Media		7,458

Se toman los datos de absorbancia obtenidos de las cinco muestras y se aplica el modelo matemático obtenido de la curva de calibración de TROLOX para FRAP

C1= Concentración

V1= Dilución aceite esencial más etanol

C2=

V2=Volumen de muestra.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$? * 5ml = 7,458mg * 10ml$$

$$C1 = \frac{C2 * V2}{V1}$$

$$C1 = \frac{7.458mg/l * 10ml}{5ml}$$

$$C1 = 14,916 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$C1 = 14,916 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100$$

Concentración 14,916g/L⁻¹

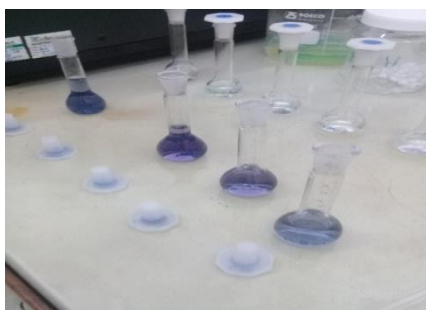


Figura 4. 6. Análisis FRAP

4.4.3 Contenido fenólico.

Los resultados fueron expresados en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido tánico.

Tabla 4. 9. Concentración de contenido fenólico en aceite esencial de *Lippia alba*.

Concentración	Des. Est.
968,18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\pm 0,48$

El aceite esencial de *Lippia alba* del litoral ecuatoriano presentó actividad antioxidante con valores de 23,97 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para ABTS, 14,91 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para FRAP $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y 968,18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para contenido fenólico. Valores iguales a los presentados por (Leon y otros, 2015). En aceites esenciales de orégano francés (*Plectranthus amboinicus L*) con la técnica de hidrodestilación, en el mismo estudio también se comparó la actividad antioxidante utilizando el mismo método de análisis pero con la modificación en la técnica de extracción la cual fue hidrodestilación asistida por radiación con microondas

obteniéndose valores superiores, con lo que se confirma que la técnica de extracción podría influir en la composición del aceite esencial.

En un estudio realizado por (Solano y otros, 2017) se comparó la actividad antioxidante de aceite esencial de *Lippia alba* en México, obtenido por las técnicas hidrodestilación y fluidos supercríticos. Para determinar la actividad antioxidante se emplearon las técnicas ABTS, DPPH y contenido fenólico por el método de Folin Ciocalteu. Tanto los aceites esenciales obtenidos por la técnica de hidrodestilación y fluidos súper críticos presentaron niveles de 12,45 y 17,35 mg•L⁻¹ con el reactivo de Trolox.

El contenido fenólico del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador fue superior al presentado por (Celi y otros, 2007) quienes evaluaron el contenido fenólico de dos quimiotipos de aceite esencial de *Lippia alba carvona* y *citral* obteniendo niveles de 289 y 305 mg•L⁻¹ respectivamente. El aceite esencial de *Lippia alba* del litoral ecuatoriano fue superior al presentado por (Nieto y otros, 2012) cuyo valor fue de 1,6 mg/L⁻¹, en el cual se determinó el contenido fenólico de un aceite esencial de ajo aplicado a carne de hamburguesas.

4.5 Actividad Antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana causada por el aceite esencial de *Lippia alba*, *M. piperita* y el antibiótico en los microorganismos testados (*Salmonella* y *E.coli*) la cual fue evidenciada por los halos de inhibición mostrados.

Tabla 4. 10. Análisis de varianza aceite esencial de *Lippia alba* (100%) aplicado a *E coli* y *Salmonella*.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>E. coli</i>	3	89	29,67	0,33
<i>Salmonella</i>	3	47	15,67	0,33

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	294	1	294	882	7,65	7,71
Dentro de los grupos	1,33	4	0,33			
Total	295,33	5				

Tabla 4. 11. Análisis de varianza aceite esencial de *Mentha piperita* aplicado a *E coli* y *Salmonella*.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>E. coli</i>	3	31	10,33	0,33
<i>Salmonella</i>	3	23	7,67	0,33

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	10,67	1	10,67	32	0,00	7,71
Dentro de los grupos	1,33	4	0,33			
Total	12	5				

Tabla 4. 12. Análisis de varianza antibiótico aplicado a *E coli* y *Salmonella*.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>E. coli</i>	3	89	29,67	0,33
<i>Salmonella</i>	3	53	17,67	0,33

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	216	1	216	648	1,41	7,71
Dentro de los grupos	1,33	4	0,33			

Tabla 4. 13. Análisis de varianza aceite esencial de *Lippia alba* (50%), aplicado a *E coli* y *Salmonella*

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>E. coli</i>	3	65	21,67	0,33
<i>Salmonella</i>	3	24	8	0

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	280,17	1	280,17	1681	2,11	7,71
Dentro de los grupos	0,67	4	0,17			

Tabla 4. 14. Análisis de varianza aceite esencial de *Lippia alba* (20%) aplicado a *E. coli* y *Salmonella*

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
<i>E. coli</i>	3	37	12,33	0,33
<i>Salmonella</i>	3	14	4,67	0,33

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	88,17	1	88,17	264,5	8,36	7,71
Dentro de los grupos	1,33	4	0,33			
Total	89,5	5				

Tabla 4. 15. Inhibición de *Escherichia coli*

<i>E.coli</i>	Antibiótico	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> 100%	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> 50%	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> 20%	Aceite esencial de <i>Mentha piperita</i>
Media	29,67	29,67	21,67	12,33	10,33
SD	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58
p<0,01	A	A	B	C	C

La tabla muestra las medias obtenidas de los halos de inhibición provocada por aceite esencial de *Lippia alba* en concentraciones de (100, 50 y 20%), el antibiótico y el aceite esencial de *M. piperita* en *E. coli*. También se muestra la desviación estándar (SD)

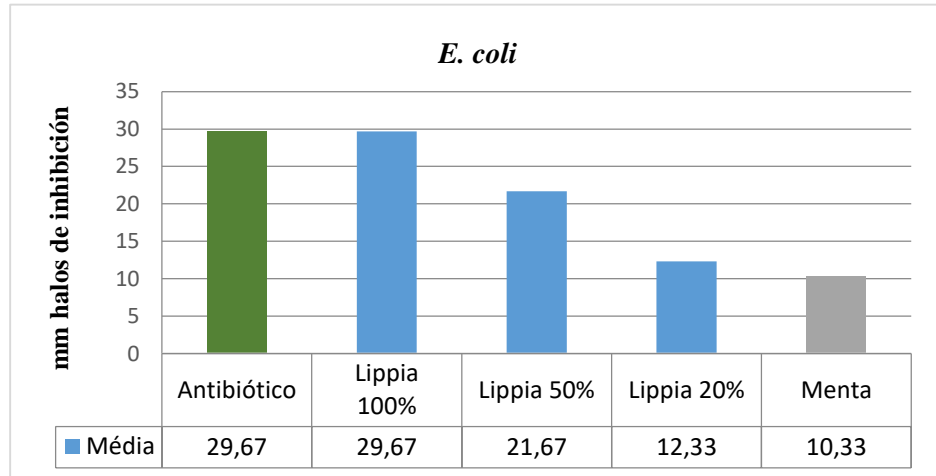


Figura 4. 7. Inhibición de *Escherichia coli*

Tabla 4. 16. Inhibición contra *Salmonella*

<i>Salmonella</i>	Antibiótico	Aceite esencial de Lippia 100%	Aceite esencial de Lippia 50%	Aceite esencial de Lippia 20%	Aceite esencial de Menta Piperita
Media	17,67	15,67	8	4,67	7,67
SD	0,58	0,58	0	0,58	0,58
p<0,01	A	A	B	C	B

La tabla muestra las medias obtenidas de los halos de inhibición provocada por aceite esencial de *Lippia alba* en concentraciones de (100, 50 y 20%), el antibiótico y el aceite esencial de *M. piperita* en *Salmonella*. También se muestra la desviación estándar (SD).

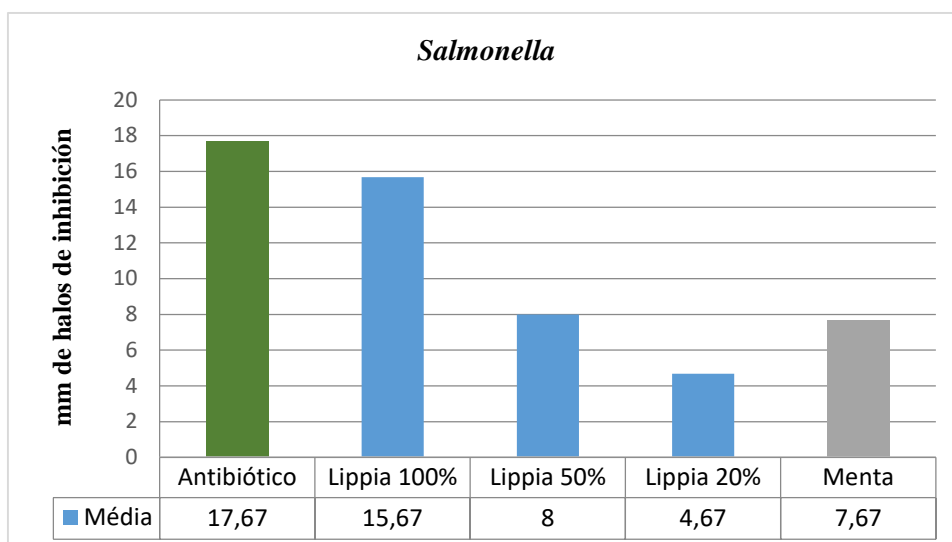


Figura 4. 8. Inhibición contra *Salmonella*

Tabla 4. 17. Ecatograma

Diámetro de halo de inhibición (mm)	Interpretación	CIM($\mu\text{g/ml}$)
6 – 15	Resistente	2
16 -19	Intermedio	4
20-34	Susceptible	8

En el presente ecatograma, se da una denominación de resistente, intermedio y susceptible en torno a la dimensión del diámetro del halo inhibición (mm), provocada por la sustancia inhibitoria, así también para cada denominación se da una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 2, 4 y 6 $\mu\text{. L}^{-1}$, Esto permitirá que los resultados puedan ser comparados con los obtenidos por otras técnicas

Aceite esencial de *Lippia alba* 100%

Variable	Halo de inhibición (Media)	Interpretación	CIM($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	29,67	Sensible	8
<i>Salmonella</i>	15,67	Intermedio	4

Aceite esencial de *Mentha piperita*

<i>E. coli</i>	10,33	Resistente	2
<i>Salmonella</i>	7,67	Resistente	2

Antibiótico

<i>E.coli</i>	29,67	Sensible	8
<i>Salmonella</i>	17,67	Intermedio	4

Diluciones

Aceite esencial de *Lippia alba* 50%

<i>E. coli</i>	21,67	Sensible	8
<i>Salmonella</i>	8	Resistente	2

Aceite esencial de *Lippia alba* 20%

<i>E. coli</i>	12,33	Resistente	2
<i>Samonella</i>	4,67	Resistente	2

En la tabla se interpretan los resultados (Resistente, intermedio y susceptible) y se presenta la concentración mínima inhibitoria en referencia a la medida de los halos provocados por la inhibición microbiana.

Como se detallan en las tablas 4.15 y 4.16 existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos del antibiótico. Como lo muestran las figuras 4.7 y 4.8 el aceite esencial de *Lippia alba* obtuvo mayor actividad inhibitoria en *E.coli* que en *Salmonella*. En el caso de *E. coli* la concentración al 100% del aceite esencial igualó a la del antibiótico comercial (amoxicilina) ambas presentaron halos de inhibición de 29,67 mm de diámetro. Las diluciones de 50 y 20% del aceite esencial de *Lippia alba* presentaron halos de inhibición de 21,67 y 12,33 mm de diámetro respectivamente, mientras que el aceite esencial de *Mentha piperita* presentó una media de inhibición de 10,33 mm de diámetro siendo el extracto con mayor grado inhibitorio. La figura 6.7 muestra que el antibiótico tiene mayor actividad inhibitoria que los aceites esenciales de *Lippia alba* en concentraciones de 100, 50 y 20% así también como en el caso de aceite esencial de *M. piperita*. Las medias de inhibición fueron 17,67 mm para el antibiótico, 15,67, 8, 00 y 4.67 mm para los aceites esenciales en concentraciones de aceites esenciales, mientras que el aceite esencial de *Mentha piperita* presentó una media de inhibición de 7.67 mm.

Para establecer los criterios de interpretación de los resultados de concentración Mínima Inhibitoria (CIM). El escatograma planteado por (Ortez, 2014), el cual dependiendo del diámetro del halo de inhibición clasifica la inhibición como resistente, intermedio y susceptible. El escatograma para cada denominación de una concentración mínima inhibitoria entre 2, 4 y 8 $\mu.L^{-1}$, tanto para los microorganismos que presentaron niveles de inhibición resistente, intermedia y susceptible. Con lo que es posible comparar los resultados con estudios en los cuáles se han aplicado otros métodos para determinar la actividad inhibitoria.

Por lo antes expuesto se puede interpretar que el aceite esencial de *Lippia alba* a concentración de 100% presento una mejor inhibición ($8 \mu\cdot L^{-1}$) por el aceite esencial estudiado en Colombia por (Pino y otros, 1996).

En otra investigación realizada por (Ortega y otros, 2012) sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido de orégano (*Lippia palmeri*) en que se hicieron diluciones 1:1 (6,6 mg por disco), 1:5 (2,6 mg por disco), 1:10 (1,3 mg por disco), entre los microorganismos evaluados estuvieron *E. coli 0157* y *Samonella typhimurium*, El primer microorganismo presentó halos de inhibición de 25 mm, 23,5mm y 19,0 mm, mientras que para el segundo la capacidad inhibitoria alcanzó los 22,5mm, 20,5mm y 12,5 mm, lo cual demuestra que el aceite esencial de *Lippia Lippia alba* de Ecuador presentó una mayor actividad inhibitoria ante los microorganismos evaluados.

5 Conclusiones y perspectivas futuras.

Se comparó las características de la especie vegetal con información detallada en la literatura confirmando la identidad de la especie, lo cual fue certificado por el herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador de la ciudad de Quito.

La aplicación de operaciones previas a la extracción como secado, molienda y macerado de la especie vegetal influye en el rendimiento de las aceite esencial. El rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba* fue de 1%, concordando con los obtenido por otros autores.

Las condiciones edafoclimáticas y agronómicas de las especie, así también como las de extracción influye en los componentes volátiles del aceite esencial, ya que los datos de identificación volátil (GC-MS), muestran a la artemisia cetona como compuesto mayoritario. Al no encontrarse el patrón autentico en la librería de datos de NIST se sugiere comprobar su presencia con patrones auténticos mediante la técnica de Orbitrap exactive. La presencia de artemisia cetona como compuesto mayoritario del extracto de esta especie significaría la existencia de un nuevo quimiotipo en *Lippia alba*.

El aceite esencial presentó una alta actividad antioxidante en comparación a la presentada por otros autores, lo cual se debe a la presunta presencia del compuesto mayoritario artemisia cetona considerado como un metabolito altamente antioxidante, por lo que se convertiría en una importante fuente de conservarte natural abriendo la posibilidad de que sea aplicado en diversos alimentos por técnicas como biofilms comestibles, envasado en atmosfera y otros.

El aceite esencial de *Lippia alba* presentó actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *E. coli* y *Salmonella* por lo que deberá estudiar su actividad inhibitoria frente a otros tipos de microorganismos, y aplicarlos como conservante de alimentos, lo cual sería muy importante pues impulsaría el desarrollo de la industria alimentaria satisfaciendo las demandas de conservantes naturales en el mercado nacional e internacional

6 Bibliografía.

Abreu Naranjo, R., Arteaga Crespo, Y., Bravo Sánchez, L. R., Pérez Quintana, M., & Quintana Garcia, Y. (2017). *Optimisation for response surface methodology of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from Maytenus macrocarpa bark by means of ultrasound-assisted extraction*. Rev. Phytotherapy Research

Aderis, S., Leotta, G., & Galli, L. (2017). *Detección y caracterización de Escherichia coli productor de toxina Shiga en niños atendidos en hospital pediátrico inter zonal de la ciudad de La Plata*. Revista Argentina de Microbiología, Vol. 1: 1-10.

Agudelo, L., Gómez Ríos, G., Durán García, D., Stashenko, H., & Betancur Galvis, L. (2010). *Actividad antiherpética del aceite esencial de Lippia alba* .Rev. Salud UIS, Vol.42, 230-240.

Aldana, F., & Cruz, S. (2017). *Larvicidal activity of essential oils of Lippia alba and Lippia graveolens, on Aedes aegypti L*. Rev. Revista Científica. Vol.26, N°2, 36-48.

Alonso, J., & Desmarchelier, C. (2014). *Salvia Morada. En Plantas Medicinales bases científicas para su aplicación en atención primaria para la salud* (pág. 575). Buenos Aires: Editora Corpus.

Andino, A.,y Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars*. Rev. The Scientific World Journal, Vol. 2015, 1-17.

Aular, Y., Villamizar, M., Pérez, J., & Pérez, V. (2016). *Composición química y toxicidad aguda oral del aceite esencial de Lippia alba en ratone*. Rev. Salud, Vol. 20, 43-51

Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M., (2008). *Biological effects essential oils*. Rev. Food and Chemical Toxicology. Vol. 46, 446-475

Barbar, A., Ali, N., Shans, S., Ahamad, A., Alam Khan, S., & Anwar, F. (2015). *Essential oils used in aromatherapy*. Rev. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedice, Vol. 8, 601-611.

Blanco, M., Ringuet, J., Consolini, A., & Viña, S. (2014). *Rendimiento de la biomasa biomasa y aceite esencial quimiotipos de Lippia alba (MILL) N.E. Braw en respuesta a las practicas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas*, Universidad Nacional de la Plata

Celi, C., Escobar, P., Isaza, J., Staskenco, E., & Martínez, J. (2007). *Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de Lippia alba, Lippia origanoides y Phyla dulcis, especies de la familia verbenacea*. Scientia et Technica, Vol. 1, N° 33, 103-105.

Chies, C., Branco, C., Scola, G., Agostini, F., Gower, G., & Salvador, M. (2013). *Antioxidant Effect of Lippia alba (Miller) N. E. Brown*. Rev. Journal Antioxidants, Vol. 2, 194-205.

Delgado Ospina, J., Sánchez Orosco, M. S., & Bonilla Correa, C. (2016). *Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y Lippia origanoides Kunth*. Rev. Acta Agronómica, Vol. 65, 170-175.

Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). *Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review*. Medicines. Rev. Medicines Vol. 3, 3-7.

Do, T., Antoniotti, S., Hadji Minaglou, F., & Fernandez, X. (2015). *Authenticity of essential oils*. Rev. Trends Analytical Chemistry, Vol. 66, 147-152.

Dueñas, A., Alcívar, U., Olazabal, E., & Cortez, R. (2014). *Efecto antioxidante de la Chuquiraga jussieui J. F. Gmel en el ensayo de hemólisis*. Revista Medicentro, Vol. 18: 57-64.

Duran, D., Monzalve, L., Martinez, J., & Stashenko, H. (Mayo de 2007). *Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de Lippia alba provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto de tiempo de destilación sobre su composición del aceite*. Rev. Scientia et Technica, Vol. 33, 435-438.

Fitzgerald, A., Alves, C., Arrigoni Blanck, M. d., Baldin Pinheiro, J., Mathos Andrade, T., dos Santos Nicolau, E., & Barreto Alves, P. (2015). *Chemical Diversity in Lippia alba (Mill.)*. Rev. The Scientific World Journal, Vol.2015, 1-11.

Galanakis, C. (2018). Structural diversity and classification of polyphenols, *Polyphenol: Properties, recovery and applications* (pag 5). Cambridge: Woodhead Publishing.

Glamočlija, J., Soković, M., Tešević, V., Linde, A., & Barros Colauto, N. (2011). *Chemical characterization of Lippia alba essential oil: an alternative to control green molds*. Brazilian Journal of microbiology, Vol.42, 1537-1542.

Heldwein, C., Silva, L., Reckziege, P., Barros, F., Bürge, M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. (2012). *Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown essential oil*. Rev. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Vol.45, 436-443.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Gressier, B., Joseph, H., & Bailleul, F. (2008). *Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from*. *Hytotherapy Research*, Vol.22, 256-258.

León, G., Osorio Fortich, M., Torrenegra, M., & Gil González, C. (2015). *Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de plectranthus amboinicus L. Bvs.* *Rev. Cubana de la farmacia*, Vol. 49, 708-718.

Leos Rivas, C., Rivas Morales, C., & García Hernández, D. (2016). *Actividad antioxidante y Toxicidad. En C. Rivas Morales, M. A. Oranday Cardenas, & M. J. Verde Star, Investigación de plantas e importancia médica* (págs. 43-70). Nuevo León: Omnia Science.

Linde, G., Colauto, N., Alberto, E., & Gazim, Z. (2016). *Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de Lippia alba*. *Rev. Brasileira de plantas medicinales*, Vol. 18, 1991-200.

Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigüeral, S., & Dellacassa, E. (2001). *Composition of a new essential oil type of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown from Uruguay*. *Rev. Flavor and fragrance Journal*, 356-59.

Majolo, C., Barros da Roccha, S., Campos Chagas, E., Mala Chaves, F., & Ribeiro Bizzo, H. (2016). *Chemical composition of Lippia spp. essential oil and antimicrobial activity against Aeromonas hydrophila*. *Rev. Aquiculture Research*, Vol. 16, 2380-2387.

Matos, A. d., Javier, F., Machado, L., María Aragao Craveiro, A., & Alencar, J. (2011). *Essential Oil Composition of two chemotypes of Lippia alba grown in northeast Brazil*. *Rev. Journal of Essential Oil Research*, 695-698.

Mensilla-Canela, G. (2014). *Potencial de Hidrogenoides*. Rev. Actualización Clínica Investiga, Vol. 40, 2076-2082.

Moro, A., Libran, C., Berruga, M., Carvona, M., & Zalacain, A. (2014). *Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making*. Rev. Food Agriculture, Vol.95, 1507-1513.

Moro, A., Zalacain, A, Hurtado de Mendoza, J., & Carmona, M. (2011). *Effects of agronomic practices on volatiles composition of hyssopus ofycinalis L. Esenssial Oils*. Rev. Molecules, Vol. 16, 4131-4139.

Mott, R. (2014). Densidad. En R. Mott, *Mecánica de fluidos aplicada* (págs. 12-15). México: 2001. Editora Pearson

Nieto, G., Skibsted, L., Andersen, M., & Ros, G. (26 de Febrero de 2012). *Actividad antioxidante y pro oxidantes del aceite esencial de baja por resonancia de spin electrónica* Rev. Veterinaria de Murcia, Vol. 16, 23-34.

Ochoa, A., Sergio, Sánchez Torres, L., Morillon, N., Virginia, Camacho, A., & Noguera Torres, B. (2017). *Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades*. Rev. Bio medica, Vol.37, 225-231.

Ortega Nieblas, M., Robles Burgueño, M., Acedo Felix, E., Gonzales , A., Morales Trejo, A., & Vásquez Moreno Luz. (2012). *Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil*. Rev. Revista de Fitoquímica, Vol. 34, Mexica, 1-17.

Ortez, J. (2014). Criterios de Interpretación. En S. Cavalieri, *Manual de Pruebas de Susceptibilidad de pruebas antimicrobiana* (págs. 29-30). Washinton. Coordinadora

Ortuño, M. F. (2006). *Manual Práctico de aceites esenciales y aromatizantes*. Pág. 8, Madrid: AIYANA.

Pino, A., Luis, A., Rodríguez, M., & Baluja, R. (1996). *Composición y propiedades antimicrobianas del aceite esencial de Lippia alba*. *Revista cubana de plantas medicinales*. Rev. Cubana de la farmacia, Vol. 30, 29-35.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural, con efectos saludables en el sistema cardiovascular.*, Rev. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 12, 76-89.

Reyes Solano, L., Breksa, P., Baldes Torres, B., & Heredia, J. (2017). *Chemical composition and antioxidant activity of Lippia alba essential oil obtained by supercritical CO₂ and hydrodistillation*. Rev. African Journal of biotechnology, Vol.16, 962-970.

Ringuele, J., Ocampo, R., Hennig, C., Padin, S., Urrutia, M., & Dal, G. (2014). *Actividad antiséptica del aceite esencial de Lippia alba (MILL.) N.E. Braw sobre on Tribolium castaneum Herbst. en granos de trigos Triticum aestivum L.* Rev. Brasileira de Agroecología, Vol.9, 214-222.

Rodríguez Torrez, H., Barreto Argilagos, G., Sedres Cabrera, M., Bertod Baldes, J., Martínez Saes, S., & Guevara Viera, G. (2015). *Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio*. Rev. Electrónica de veterinaria, Vol.16, 1695-7504

Rodríguez, J., & Segura, A. (2017). *Características fisicoquímicas de aceite esencial de hojas de Lippia alba en ileon aislado de Cavia porcellus*. Universidad Nacional de Trujillo.

Romero Márquez, D. (2004). *Distribución de aceites esenciales en el Reino vegetal*. Plantas Aromáticas (pág. 48). Buenos Aires: Kier. Editora CENIVAN

Roncancio Bejarano, J. J., & Suarez Latorre, L. (2015). *Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de alimentos de ventas en espacios públicos*. Rev. Salud Uis, Vol. 47, 355.

Sánchez García, E., Castillo Hernández, S., & García Palencia, P. (2016). *Actividad Antimicrobiana*. Pag.87 Barcelona. Editora Omnia Science

Tajkarimi, M., Ibrahim, S., y Cliver, D. (2010). *Antimicrobial herb and spice compounds in food*. Rev. Food Control, Vol.21, 1199-1218.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2012). *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. Rev. Journal of food composition and analysis, Vol. 19, 669-675.

Tofiño Rivera, A., Ortega Cuadros, M., Galvis Pareja, D., Jiménez Ríos, H., Merini, L., & Martínez Pabón, M. (2016). *Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells*. Rev. Journal Ethnopharmacology, Vol.194, 749-754.

Torrenegra, M., Granados, C., Osorio, M., & Leon, G. (2014). *Comparación de la hidrodestilación asistida por radiación microondas (MHWD) e hidrodestilación convencional en la extracción de aceite esencial de Minthostachys mollis*. Rev. Información Tecnológica, Vol. 26, 117-122.

Torres Marquina, I., Minchan , P., Martos , F., Bardales, J., Sanches, I., Alaya, D.,Tejada, R. (2016). *Actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de Satureja Sericea "Romrito de Campo" y Satureja Nuvigena " Pachanchacua" provenientes de la región de Cajamarca*. Rev. Perspectiva, Vol. 17, 13-31.

Valantina , R., & P, N. (2015). *Selective ABTS and DPPH radical scavenging activity of peroxide from vegetable oils*. International Rev. Food Research Journal, Vol. 22, 289-294

Valenzuela, C y Pérez, P. (2016). *Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos lácteos*. Rev. Chilena de nutrición, Vol. 43, 188-195

Vera, A., Olivero, J., Jaramillo, B., & Stashenko, E. (2010). *Efecto protector del aceite esencial de Lippia alba (MILL) N.E. en raíces de Allium cepa L*. Rev. Cubana de plantas medicinales, Vol.22, 27-37.

Yacamoto, P., Colombo, C., Azevedo Filho, J., Lourenção, A., Ortiz, M., Da Silva Morales, G., Siqueira, W. J. (2008). *Performance of ginger grass (Lippia alba) for traits related to the production of essential oil*. Rev. Scientia Agricola, Vol.65, 481-489.

Yee Yip, L., & Yong Chang, E. (2013). *Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Metabonomics. Proteomic and metabolic Approaches to biomarker discovery*, Vol 8, 131-134

